

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

**USO DE RECURSOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Manihot* NO PRÉ-
MELHORAMENTO GENÉTICO DE MANDIOCA**

LÍVIA DE JESUS VIEIRA

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
MARÇO - 2010

UTILIZAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Manihot* NO PRÉ-MELHORAMENTO GENÉTICO DE MANDIOCA

LÍVIA DE JESUS VIEIRA

Bacharel em Ciências Biológicas
Faculdade de Tecnologias e Ciências, 2007

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora (a): Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-orientador: Dr. Alfredo Augusto Alves Cunha

Co-orientador: Dr. Éder Jorge de Oliveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS – BAHIA - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

V657 Vieira, Livia de Jesus.

Utilização de recursos genéticos do gênero *Manihot* no pré-melhoramento genético de mandioca/ Livia de Jesus Vieira. - Cruz das Almas, BA, 2010.

f.61: il.

Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte de Souza.
Co-Orientador: Alfredo Augusto Alves Cunha

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

1. Mandioca – melhoramento genético. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. II. Título.

CDD 633.68

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LÍVIA
DE JESUS VIEIRA**

Dra Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical
(Orientadora)

Dr. Vanderlei da Silva Santos
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos
Genéticos
em..... Conferindo o
Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em.....

À minha querida mãe Maria Neuza, aos meus preciosos irmãos Letícia e André, ao meu querido Leandro, à minha sogra Maria Conceição, sobretudo por toda confiança e incentivo concedidos, essenciais para essa conquista.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar todos os meus sonhos em realidade.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, em especial ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade de realizar este curso.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pela parceria e apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza pelo amparo, incentivo e paciência concedida.

Ao meu co-orientador Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves, pelo carinho e atenção oferecidos.

Ao meu co-orientador Éder Jorge de Oliveira, pelo apoio.

À Sonia Cordeiro por toda ajuda e dedicação nas minhas buscas por bibliografias.

À Mônica Lánzoni Rossi, pelas fotomicrografias obtidas no MEV do NAP/ESALQ/USP.

Ao Dr. Kijama Elliot Watanabe, pela disponibilização do NAP para realização das fotomicrografias.

A Epaminondas pelo apoio laboratorial.

À amiga Vânia por toda força e incentivos oferecidos essenciais para minha caminhada.

Ao meu amigo Rodrigo Duran pela ajuda e companhia ao longo desses últimos anos.

Aos meus colegas de mestrado, Crispiniano, Ivonilda, Edeneide, Laurenice e Rosa Carla, pela união e grande companheirismo.

Aos amigos de estágio, Paulo Henrique, Helisson, Jaqueline, Jamile, Pâmela, Juliana, Janaira, Juraci, Everton Hilo, Taliane e Leônidas e todos aqueles que participaram de forma direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA DE ACESSOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Manihot</i>	21
CAPÍTULO 2 CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE MANDIOCA SILVESTRE.....	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

USO DE RECURSOS GENÉTICOS DO GÊNERO *Manihot* NO PRÉ-MELHORAMENTO GENÉTICO DE MANDIOCA

Autora: Livia de Jesus Vieira

Orientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-orientadores: Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves e Éder Jorge de Oliveira

RESUMO: A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) originária do continente americano é utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias. Ações voltadas ao pré-melhoramento são relevantes a fim de subsidiar a obtenção de híbridos com características superiores. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a produção, o tamanho e a viabilidade de grãos de pólen de acessos de diferentes espécies do gênero *Manihot*, assim como avaliar procedimentos para conservar grãos de pólen de mandioca silvestre. A estimativa da produção de pólen foi realizada pelo número de grãos de pólen produzidos por botão floral e o diâmetro foi determinado pelo comprimento transversal do grão. A viabilidade do pólen foi avaliada por testes *in vitro*, *in vivo* e testes colorimétricos. A produção média observada entre todos os acessos foi de 1.253 grãos de pólen. A maior produção foi observada no acesso DIC 587-05, com produção média de 3.638 grãos de pólen/flor enquanto que a menor foi no acesso FLA 029-01 com produção média de 579 grãos. Com relação ao tamanho do grão de pólen, verificou-se que nos acessos silvestres o tamanho variou de 132 a 163 μm e de 129 a 146 μm nas cultivadas. A viabilidade dos grãos de pólen foi elevada pelos testes colorimétricos, média nos testes *in vivo* e não houve germinação em meio de cultura. Estudos da ultraestrutura polínica foram realizados por microscopia eletrônica de varredura evidenciando diferenças estruturais entre as espécies silvestres. Pólen do acesso silvestre FLA-005-07 foi armazenado em quatro temperaturas distintas (27, 4, -20, -80°C) e por dois períodos diferentes (três e seis meses). Os grãos de pólen armazenados do acesso silvestre sofreram perda significativa da viabilidade, sendo necessários novos estudos nesse sentido.

Palavras-chave: Espécies silvestres, *Manihot esculenta* Crantz, pré-melhoramento.

USE OF GENETIC RESOURCES OF THE GENUS *Manihot* IN THE GENETIC PRÉ-IMPROVEMENT OF CASSAVA

Autora: Livia de Jesus Vieira

Orientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-orientadores: Dr. Alfredo Augusto Cunha Alves e Éder Jorge de Oliveira

ABSTRACT: The cassava (*Manihot esculenta* Crantz) native to the American continent is used in the human and animal feeding or as raw material for several industries. Actions directed to the pre-improvement are relevant in order to subsidize the obtainment of hybrids with superior characteristics. The objective of this work was to characterize the production, the size and the viability of pollen grains of accessions of different species of the genus *Manihot*, as well as to evaluate procedures to preserve pollen grains of wild cassava. The estimate of the pollen production was accomplished by the number of pollen grains produced per flower bud and the diameter was determined by the transversal length of the grain. The viability of the pollen was evaluated by 'in vitro', 'in vivo' and colorimetric tests. The average production observed among all the accessions was 1.253 pollen grains. The highest production was observed in the accession DIC 587-05, with a mean production of 3.638 pollen grains/flower, while the lowest was in the accession FLA-029-01 with a mean production of 579 grains. Regarding the size of the pollen grain, it was verified that in the wild accessions the size ranged from 132 to 163 μm and from 129 to 146 μm in the cultivated ones. The viability of the pollen grains was high through the colorimetric tests, medium in the 'in vivo' tests and there was no germination in the culture medium. Studies of the pollen ultrastructure were accomplished by sweeping electronic microscopy evidencing structural differences among the wild species. Pollen of the wild accession FLA-005-07 was stored in four different temperatures (27°C, 4°C, -20°C, -80°C) and for two different periods (three months and six months). The stored pollen grains of the wild accessions suffered significant losses of viability, being necessary new studies on that subject.

Key word: Wild species, *Manihot esculenta* Crantz, pre-improvement.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertence à classe das Dicotiledôneas, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot*. É nativa do Brasil e está distribuída em todo o território nacional (VALLE, 2005). Outras denominações como *M. utilíssima*, *M. dulcis*, *M. aipi* são consideradas sinônimos de *M. esculenta* (ROGERS e FLEMING, 1973). Quanto à ploidia, todas as espécies do gênero *Manihot* possuem $2n=36$ cromossomos (RAFFAILAC e SECOND, 2001).

Manihot é um gênero Neotropical com 98 espécies com plantas que variam de herbáceas a árvores. São reconhecidos dois centros de diversidade de espécies, um no Brasil com 80 espécies e outro no México. Quatro principais centros de diversidade de espécies são reconhecidos no Brasil. O Planalto Central (altitude superior 1000m) é o que tem maior número de espécies (58 das 80), seguido do Nordeste (8 em 80), Sudeste (8 em 80) e a Amazônia (6 em 80) como o centro de maior diversidade da mandioca e seu ancestral. A taxonomia de *Manihot* é um enigma devido à superposição dos caracteres morfológicos entre as espécies, da plasticidade fenotípica destes caracteres, da falta de variação no número de cromossomos entre as espécies e do número limitado de caracteres com informação taxonômica. A falta de caracteres morfológicos confiáveis dificulta os estudos sobre a origem da mandioca e em consequência várias espécies de *Manihot* originadas do México, América Central e América do Sul podem ser ancestrais potenciais da mandioca. As duas hipóteses de origem da mandioca sugerem que a mandioca é uma espécie híbrida que se fundamenta no complexo de espécies Mexicanas ou uma espécie oriunda de uma única espécie ancestral que se fundamenta no complexo das espécies de *Manihot* que ocorrem no Brasil, sendo a *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* esta espécie (CARVALHO, 2005).

Segundo Nassar (2003), a mandioca é uma cultura nativa da América do Sul que foi domesticada na Amazônia pelos índios brasileiros e a domesticação pode ter ocorrido de um híbrido natural entre duas espécies, e as raízes alargadas poderiam ser o resultado desta hibridação.

M. esculenta tem sido cultivada no continente americano desde tempos antigos (RAFFAILAC e SECOND, 2001). Relíquias dessas raízes tuberosas foram encontradas em sítios arqueológicos de 3.800 anos, descobertos ao longo da costa oeste do Peru e no Brasil (UGENT et al., 1986, PROUS, 1991). De acordo com Rogers e Appan (1973), os portugueses foram os primeiros a importar mandioca da costa leste do Brasil para a África. Após o século XVI, as espécies se difundiram progressivamente por várias regiões da África subsaariana. Hoje, a mandioca é distribuída em grandes áreas da África, Ásia e América do Sul e cresceu em mais de 60 países, a maioria deles em desenvolvimento (ADEYEMO, 2009).

A mandioca é uma das culturas alimentares mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. É a quinta mais importante fonte de energia alimentar classificada abaixo do trigo, arroz, milho e sorgo em termos de consumo calórico global (ADEYEMO, 2009).

Com uma produção de 228.138,068 milhões de toneladas, a mandioca se constitui em uma das principais explorações agrícolas do mundo. Entre os continentes, a África é o maior produtor mundial, seguido pela Ásia, América Latina e Oceania (FAO, 2008). Neste cenário, vale destacar a participação da Nigéria, maior país produtor de mandioca, com um volume de 45 milhões de toneladas. Em seguida, a Tailândia, segundo maior país produtor de mandioca, com uma produção de 30 milhões de toneladas de raízes. E em terceiro lugar, encontra-se o Brasil com produção de 26 milhões de toneladas (FAO, 2009).

A mandioca é produzida em todo o território brasileiro, mas a sua maior concentração é na Região Nordeste, cuja participação chega a 40%, destacando-se os estados da Bahia, Maranhão e Ceará. A Bahia representa 50% da produção nordestina, possui um centro de Pesquisa da EMBRAPA em Cruz das Almas, e conta com centenas de “casas de farinha” (SEAB, 2007).

Na Região Norte, destaca-se o Estado do Pará, sendo o maior produtor nacional, com cinco milhões de toneladas por ano, tem um grande número de pequenas fábricas de farinha e apresenta o maior índice de consumo nacional de farinha, com 33 kg per capita ao ano. Além de abastecer o mercado local, eventualmente exporta a farinha para os estados vizinhos do Nordeste.

No Centro-Oeste observa-se tendência de crescimento agrícola, puxada por algumas indústrias de fécula, principalmente no Mato Grosso do Sul. Já no

estado do Mato Grosso, praticamente toda a produção de mandioca destina-se ao consumo animal e humano.

No Sudoeste, aparece São Paulo com avançados Centros de Pesquisa, produção de fécula e farinha, com boa parte do mercado sendo abastecido com produtos do Paraná e Santa Catarina.

A Região Sul se destaca com o Paraná, que produz anualmente mais de três milhões de toneladas de raiz, e possui o maior e o mais moderno parque industrial do país. Santa Catarina ainda produz fécula e farinha, mas já foi mais importante antes dos anos 80, pois a partir desse período muitas indústrias foram transferidas para o Paraná. Já, o Rio Grande do Sul, apesar de destacado produtor de raiz, não a industrializa e destina toda a produção para o consumo animal (SEAB, 2007).

Entretanto, apesar de toda importância, o valor nutricional da mandioca está muito aquém do ideal, principalmente pelos baixos níveis de proteínas, gordura, fibras e minerais, somados ao teor de glicosídeos cianogênicos (COCK, 1985). Além disso, o cultivo tem grandes limitações, como o grande número de pragas, doenças e vírus, aos quais as principais variedades são suscetíveis (BELLOTTI et al., 1999). Demandando, dessa forma, o desenvolvimento de novas variedades que não apresentem tais características.

Em vista disso, programas de melhoramento genético em vários países do mundo vêm sendo conduzidos nessa direção, destacando-se o Brasil. Centro de origem e diversidade genética da espécie, o país possui um manancial de variabilidade genética a ser utilizada na obtenção de híbridos de interesse. Os recursos genéticos da espécie devem, portanto, ser melhor explorado por meio de trabalhos de pré-melhoramento, subsidiando, dessa forma os programas de melhoramento genético para a geração de novas variedades mais produtivas e resistentes às principais pragas e doenças.

Ao longo do tempo, a mandioca vem sendo propagada vegetativamente pela interferência humana, mantendo, entretanto, uma reprodução sexuada ativa, o que mantém e amplifica a variabilidade genética, possibilitando aos geneticistas a escolha de genótipos de interesse aos programas de melhoramento dessa espécie (SILVA, 2001). Dentro do gênero *Manihot*, já foram identificadas aproximadamente 98 espécies, das quais a *Manihot esculenta* Crantz é a única

cultivada comercialmente para a produção de raízes comestíveis ou para a indústria (FUKUDA, 2002).

Em diversas culturas, as espécies silvestres vêm sendo utilizadas pelos melhoristas como fonte de caracteres úteis, não encontrados nas variedades da espécie cultivada incorporados às variedades comerciais (NASSAR, 1986, BELLON et al., 2007). No caso específico da mandioca, as espécies silvestres são fundamentais para o trabalho de melhoramento genético, por representarem uma fonte de resistência a fatores de estresses bióticos e abióticos.

Entretanto, dentre os principais problemas na utilização de espécies silvestres de *Manihot* em programas de melhoramento, destaca-se a falta de sincronia nos períodos de florescimento e a dificuldade para propagação e manutenção dessas espécies em condições de campo.

Nassar (1986) trabalhando com hibridização interespecífica entre *M. esculenta* (clones catelo, vassourinha e branca-de-santacaterina) e espécies silvestres (*M. glaziovii* Muell-Arg., *M. pseudoglaziovii* Pax e Hoff, *M. caeruleascens* Pohl, e *M. pohlii*) mostrou que, embora em todas as espécies o número haplóide seja $n = 18$ cromossomos, foi observado incompatibilidade de várias espécies com *Manihot esculenta*. Isso mostra que ações de pesquisa, dirigidas aos estudos de caracterização do pólen tanto da mandioca cultivada, como da silvestre, são fundamentais para dar suporte aos programas de melhoramento genético de mandioca em que envolva hibridizações interespecíficas.

Estudos referentes à produção, tamanho viabilidade e conservação do pólen são, portanto, parte de uma demanda importante que visa subsidiar futuros cruzamentos entre variedades de mandioca e espécies silvestres do gênero *Manihot*.

A estrutura reprodutiva da mandioca é típica de espécies alógamas e as taxas de cruzamento são facilmente manejáveis, permitindo desde 100% de autofecundação até 100% de fecundação cruzada. O estigma é receptivo durante todo o período de abertura das flores, tornando-se inviável no período de 24 horas; já o pólen mantém-se viável por um período de seis dias, quando conservado em cloreto de cálcio. O período entre a polinização e a fertilização varia de 8 a 19 horas. A mandioca apresenta protoginia, ou seja, em uma mesma inflorescência, as flores femininas abrem antes das flores masculinas. O caráter protogínico da antese floral, a ocorrência de macho-esterilidade, a forte depressão

endogâmica causada pelas autofecundações, e a alta heterozigose da espécie são fatores que concorrem para que seja considerada preferencialmente uma planta alógama (DOMÍNGUEZ et al., 1984 *apud* Silva, 2001).

A mandioca apresenta flores apetaladas dispostas em panículas axilares ou terminais. As flores masculinas e femininas são separadas na panícula. As flores masculinas são imbricadas, coloridas ou não na parte ventral, e o cálice é constituído por cinco sépalas. O receptáculo é urceolado, com lobos, cada um deles bilobado.

Nas flores masculinas, o disco é intraestaminal e seus lobos opõem-se às partes do cálice. Os estames são em número de dez, dispostos em duas séries, cinco internos e cinco externos, inserindo-se sobre o disco. Os filetes dos estames do ciclo exterior são mais desenvolvidos. Os estames interiores alternam-se com as peças do cálice e inserem-se nos espaços mais profundos do disco. As anteras são birrimosas, voltadas ou inclinadas para o eixo da flor. O pólen é abundante, de cor amarelada. Os grãos são esféricos providos de exina e intina; exina revestida de cristais com aparentemente vários poros.

As flores femininas são maiores que as masculinas, de posição basal, primeiramente, voltadas para cima e após a fecundação, pêndulas. Estilete brevíssimo. Estigma largo, trilobado, repetidamente bilobulado, ondulado, carnoso (Figura 1). O ovário é súpero, com lojas, e cada loja com um óvulo (Figura 2). Estaminódios presentes às vezes, ou não. Disco na base do ovário de cinco lobos, cada lobo com dois lóbulos. O fruto é uma cápsula, tricoca, cada loja bivalva com uma semente. As sementes são carunculadas, lisas com desenhos. Os cotilédones são grandes, retos, maiores que a radícula. Possui endosperma portador de substâncias oleosas (VIÉGAS, 1976). Nas Figuras 3, 4, 5 e 6, é possível observar as diferenças dessas estruturas florais nas seguintes espécies silvestres do gênero *Manihot*: *M. flabellifolia*, *M. peruviana*, *M. violaceae*, *M. cecrobialifolia*, *M. anomala*, *M. tomentosa* e *M. dichotoma* e na espécie cultivada *M. esculenta* Crantz. Na Figura 7 pode-se observar a variação na morfologia dos frutos dessas espécies.

O pólen de mandioca apresenta dimorfismo, os maiores grãos medem de 130 a 150 μm de diâmetro, e os grãos menores variam entre 90 e 110 μm (PLAZAS, 1991). Segundo Chavarriaga-Aguirre e Halsey (2005), o pólen de mandioca perde a viabilidade rapidamente após ser liberado da flor masculina. Leyton (1993) obteve 97% de

semente em cruzamentos realizados com pólen fresco, 56% de semente com pólen armazenado por 24 horas e 0,9% de sementes oriundas de cruzamentos com pólen de mandioca cultivada após 48 horas de armazenamento.

Na mandioca, as flores masculinas desenvolvem-se perto da ponta, enquanto que as flores femininas desenvolvem-se mais perto da base da inflorescência (CHAVARRIAGA-AGUIRRE e HALSEY, 2005). A fertilização ocorre quando os grãos de pólen alcançam o estigma, aderem à sua superfície e ocorre a formação dos tubos polínicos. O tubo polínico cresce em direção ao ovário e penetra no óvulo, onde deposita seus dois núcleos reprodutivos e degenera em seguida. Posteriormente, ocorre a união de um dos gametas masculinos ao núcleo da oosfera para formar o zigoto (2n), e o outro núcleo reprodutivo se une aos dois núcleos polares do saco embrionário (fusão tripla), para formar o núcleo do endosperma (3n), caracterizando a dupla fertilização típica das angiospermas (MARCOS FILHO, 2005).

Ocorrido a fertilização, a semente resultante se torna viável dois meses após a polinização, e os frutos tornam-se maduros cerca de um mês depois disso, ou cerca de três meses após a polinização (CEBALLOS et al., 2002). O fruto é deiscente, trilocular, e as sementes são ovóides, com cerca de 100 mm de comprimento e 4 a 6 mm de espessura (ALVES, 2002).

Embora não seja muito difícil a obtenção de sementes, quer por cruzamentos abertos, ou controlados artificialmente, há vários fatores envolvidos no florescimento, frutificação e produção de sementes, tais como: variedade, clima, solo e idade das plantas, os quais podem alterar substancialmente a quantidade de sementes a ser produzida (MONTEIRO et al., 1984).

A produção de sementes e a viabilidade são variáveis dependendo em grande parte da qualidade do progenitor do sexo feminino (KAWANO, 1980). Sementes recém-colhidas são latentes, exigindo de três a seis meses de armazenamento antes de germinar (JENNINGS; IGLESIAS, 2002). Silva et al., (2001) observaram que após teste de germinação, sementes obtidas de frutos com apenas uma semente apresentam 53,49% de germinação, enquanto as oriundas de frutos com duas ou três sementes mostraram 32,5% e 40,32% de germinação, respectivamente.

Silva et al. (2001), constataram que a flor da mandioca é visitada por coleópteros, vespas, abelha irapuá (*Trigona spinipes*) e abelha (*Apis mellifera*). A abelha irapuá e as vespas raramente foram observadas fazendo polinização, e a espécie *Apis mellifera* foi o principal polinizador natural observado.

Quanto mais eficiente for o processo de polinização, ou seja, quanto maior for o número de grãos de pólen viáveis e compatíveis no estigma, maior será a competição entre eles para fecundar os óvulos, e maior será a porcentagem de fertilizações efetivas (FREITAS, 1997). Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas, é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade. Resultados de pesquisa mostram que as porcentagens de germinação e porcentagem de viabilidade do pólen estão em completa acordância (BOLAT, PIRLAK, 1999).

Scorza e Sherman (1995) consideram que um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Ainda que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação.

Para o monitoramento da viabilidade do pólen conservado, vários testes podem ser utilizados, destacando-se quatro tipos principais a seguir: a. pelo uso de corantes; b. germinação *in vitro*; c. germinação *in vivo*, e d. polinização *in vivo* e a porcentagem de frutificação efetiva (GALETTA, 1983).

Segundo Stanley e Linskens (1974), nenhum teste de viabilidade é completamente satisfatório, principalmente após o pólen ter sido armazenado, pelas seguintes razões: os testes químicos usam corantes que reagem com constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar; amostras de grãos de pólen que germinam bem *in vitro*, podem não produzir suficiente elongação do tubo polínico para afetar a fertilização. Por outro lado, amostras de pólen que parecem não-viáveis quando testadas *in vitro*, podem produzir boa porcentagem de sementes *in vivo*; o pólen armazenado pode germinar diferentemente em amostragens repetidas ou em diferentes meios.

Entretanto, independentemente do método usado para testar a viabilidade polínica, a conservação do pólen viável por períodos mais longos pode ser fundamental para a realização de alguns cruzamentos interessantes. Não são raras as situações em que o pólen a ser usado tenha sido colhido em outra

região, ou mesmo, fornecido por meio de intercâmbio com outros países (HANNA, 1994).

Vale destacar que, devido à falta de coincidência de floração entre espécies parentais de interesse, é preciso, muitas vezes, armazenar o pólen colhido em um ano, para ser utilizado no ano seguinte. Por isso, a importância do desenvolvimento de protocolos de conservação de pólen a curto, médio e longo prazo, e que permitam a manutenção da viabilidade, e a realização de cruzamentos entre essas espécies.

O emprego de baixas temperaturas influencia no armazenamento e normalmente está ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Pode-se conseguir redução de temperatura por meio de refrigeradores e *freezers*, que são de fácil acesso (PIO et al., 2007). Cuchiara et al. (2009), após armazenar grãos de pólen de mamona (*Ricinus communis* L.) em diferentes temperaturas (-196°C, -72°C, -18 °C e 4°C), concluiu que o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) é mais eficiente que os demais ambientes, no período estudado (até 30 dias), porém com baixo percentual de germinação *in vitro*.

Praticamente não existem referências de estudos de caracterização polínica ou de métodos de conservação de pólen em variedades silvestres de mandioca e que são potenciais parentais para o melhoramento genético de *Manihot esculenta*, caracterizando uma subutilização dos recursos genéticos existentes dentro do gênero e uma lacuna no melhoramento genético da espécie. Em vista disso, o objetivo desse trabalho é o estudo do pólen, considerando aspectos como a produção, morfologia, estrutura e a manutenção da viabilidade em diferentes espécies do gênero *Manihot*, a fim de gerar subsídios para a realização de futuros cruzamentos.

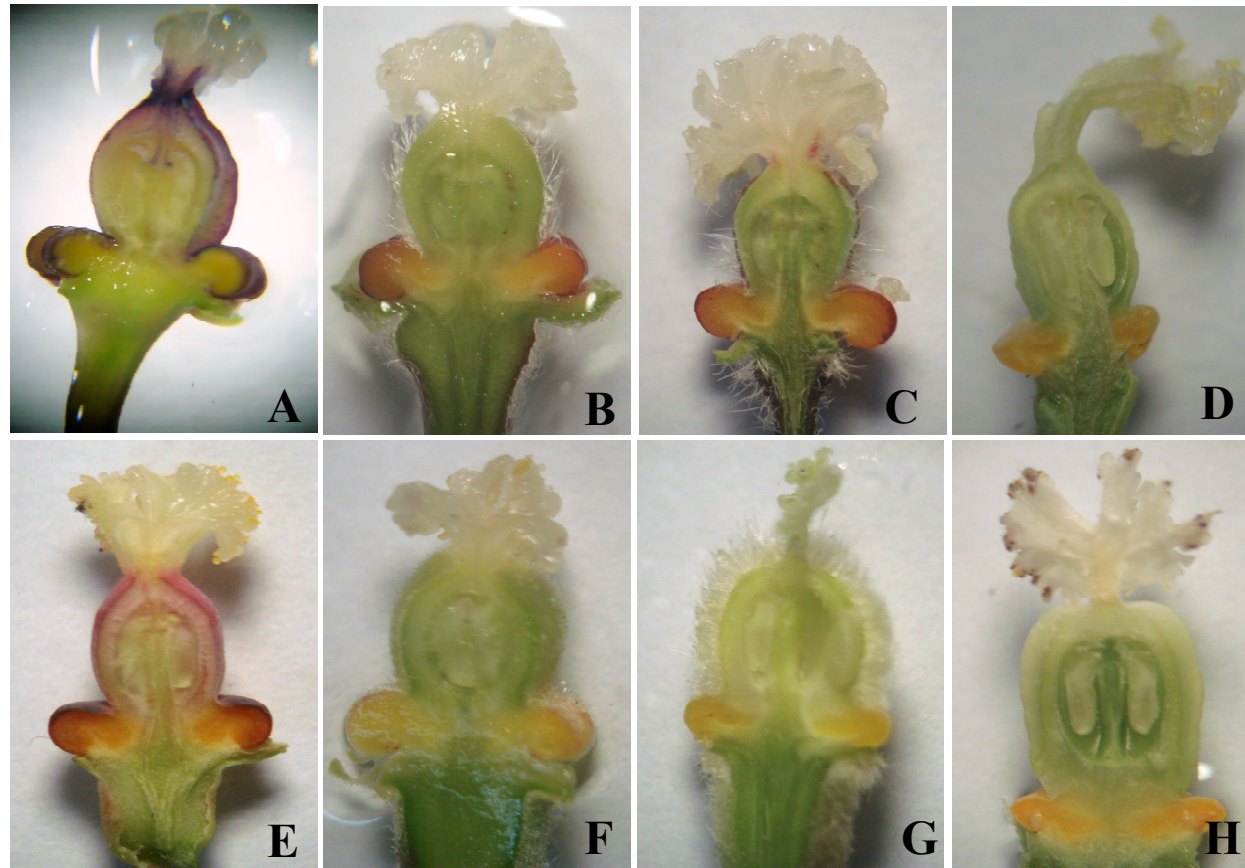


Figura 1) Corte longitudinal do ovário de diferentes espécies do gênero *Manihot*. A=*M. esculenta*, B=*M. flabellifolia*, C=*M. peruviana*. D=*M. violaceae*. E=*M. cecrobialifolia*. F=*M. anomala*. G=*M. tomentosa*. H=*M. dichotoma*.

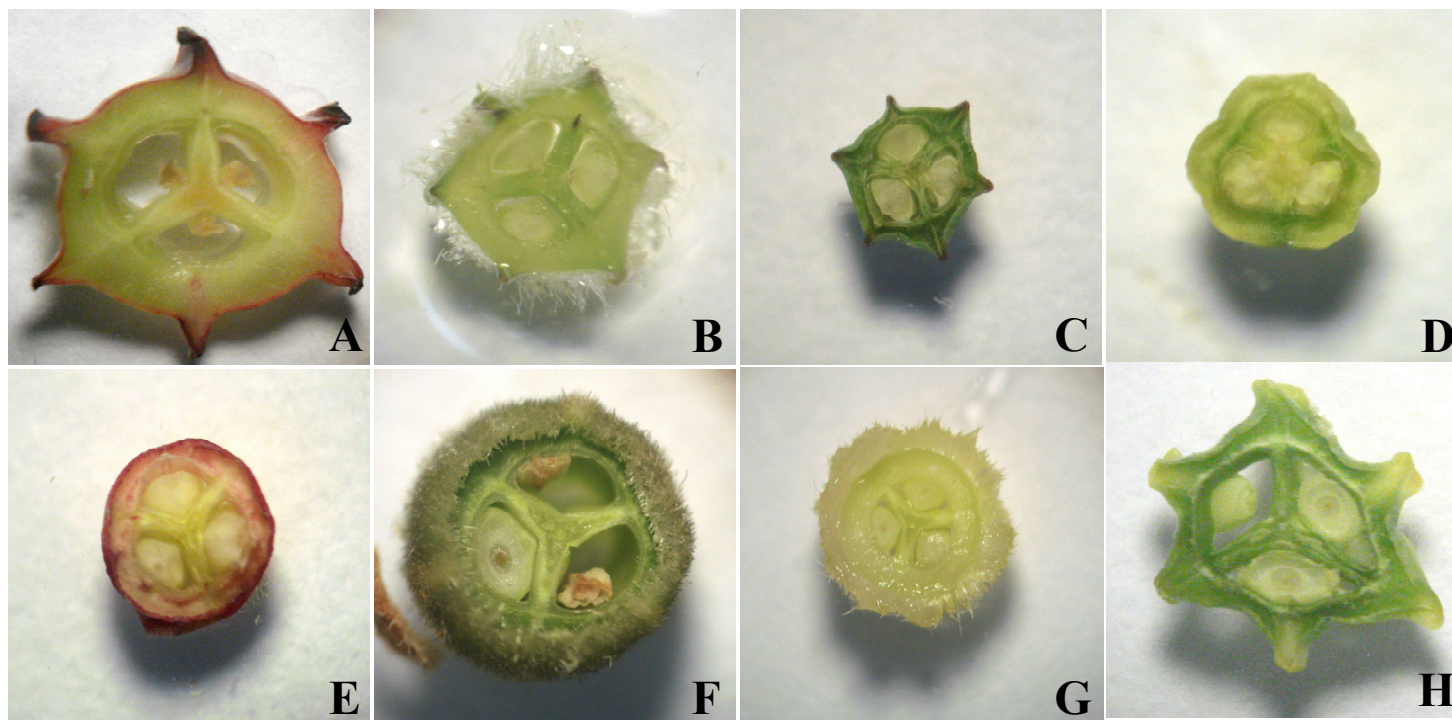


Figura 2) Corte transversal do ovário de diferentes espécies do gênero *Manihot*. A=*M. esculenta*, B=*M. flabellifolia*, C=*M. peruviana*. D=*M. violaceae*. E=*M. cecrobialifolia*. F=*M. anomala*. G=*M. tomentosa*. H=*M. dichotoma*.



Figura 3) A, B, C e D – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot dichotoma*.

E, F, G e H – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot violaceae*.

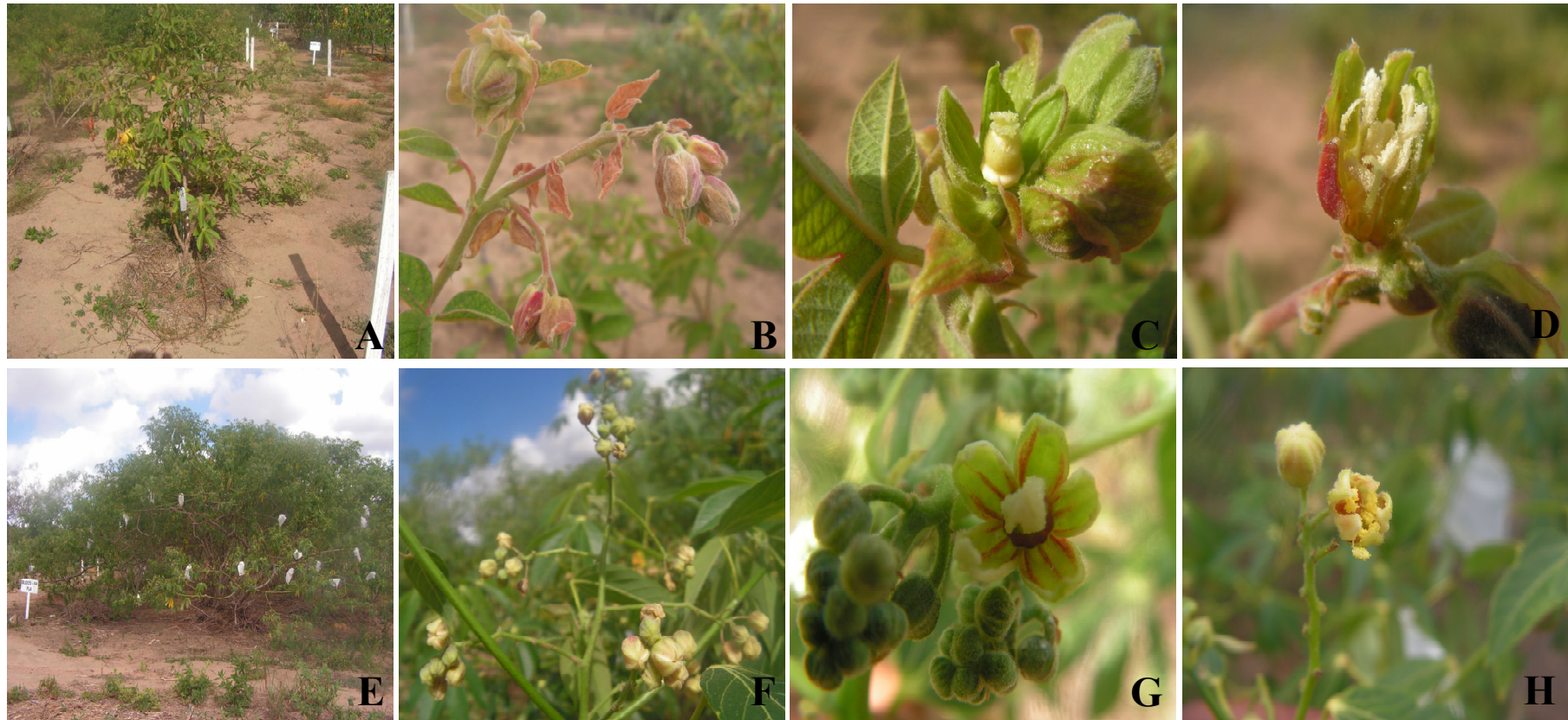


Figura 4) A, B, C e D – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot tomentosa*. E, F, G e H – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot flabellifolia*.



Figura 5) A, B, C e D – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot peruviana*. E, F, G e H – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot anomala*.



Figura 6) A, B, C e D – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot cecropiaepholia*.

E, F, G e H – Planta, inflorescência, flor feminina e flor masculina, respectivamente, da espécie *Manihot esculenta* Crantz.

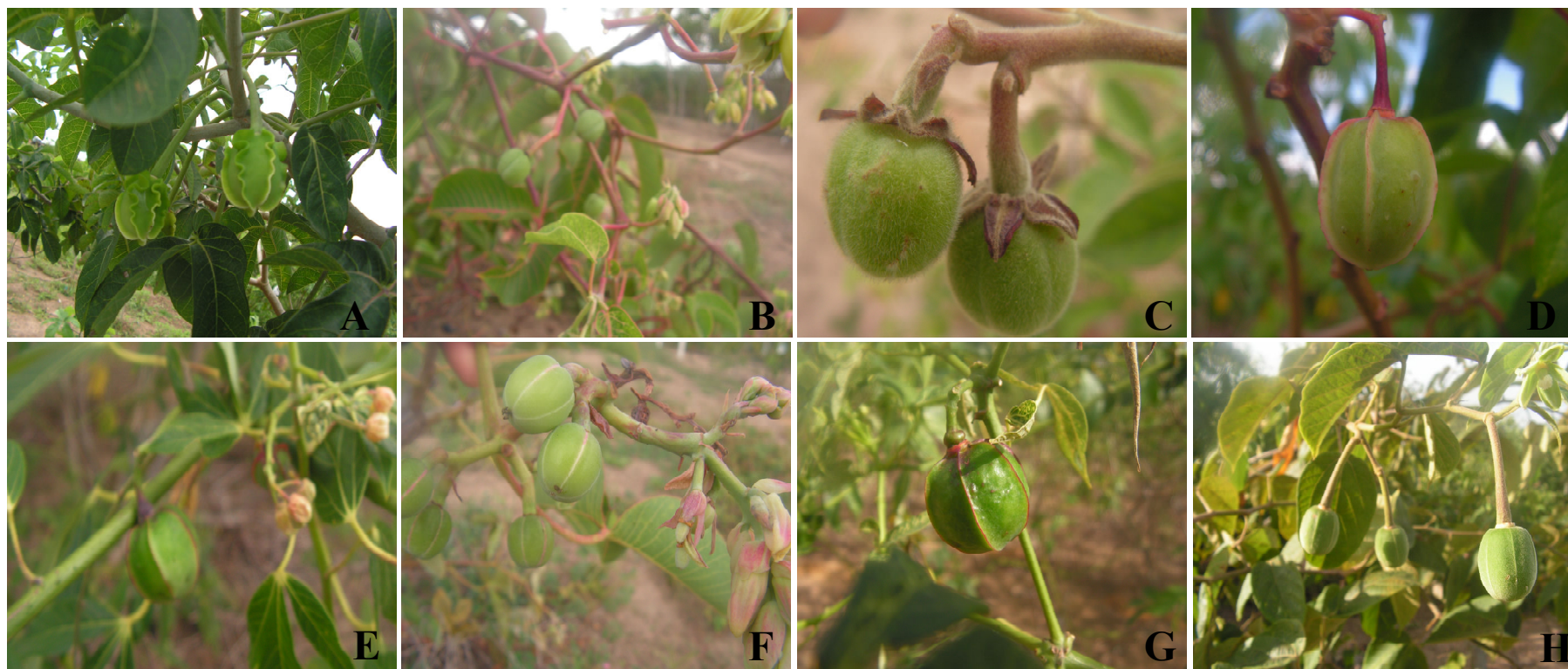


Figura 7) Frutos de diferentes espécies do gênero *Manihot*. A, B, C, D, E, F, G e H – *M. dichotoma*, *M. violaceae*, *M. tomentosa*, *M. esculenta*, *M. flabellifolia*, *M. cecropiaepolia*, *M. peruviana* e *M. anomala*, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMO, S. **Molecular genetic characterization of photoperiodic genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and attempts manipulate their expression to promote floral induction.** 2009. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universidade Koln, Ibadan. 2009.

ALVES, A. A. C. et al. Cassava botany and physiology. In CASSAVA: BIOLOGY, PRODUCTION AND UTILIZATION, 2002, Wallingford. **Anais...** Wallingford: CAB International. 2002. p. 67-89.

BELLON, G. et al. Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

BELLOTTI, A. C.; SMITH, L.; LAPOINTE, L.S. Recent advances in cassava pest management. **Annual Review of Entomology**, Cali, v. 44, p. 343-370, 1999.

BOLAT, Ý.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, Ankara, v.23, p.383-388, 1999.

CARVALHO, L. J. C. B. BIODIVERSIDADE e BIOTECNOLOGIA EM MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA. 11., 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Ciência e tecnologia para raiz do Brasil. Governo do Estado; Dourados: Embrapa Oeste, 2005. Disponível em: <http://www.cpaembrapa.br/11cbm/html/palestras/arquivoPDF/palestra_003.PDF>. Acesso em 12 jan. 2009.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; MALSEY, M. Cassava (*M. esculenta* Crantz): Reproductive biology and practices for confinement of experimental field trials: Program for Biosafety Systems. International Food Policy Research Institute 2005. **Crop Science**. Madson, v. 48, p. 49-58, 2008. Disponível em <<http://www.biovisionestafrica.com/publications/Cassava%20biology%20document.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2008.

CEBALLOS, H. ET AL. Mejoramiento Genetico de la Yuca. In: CEBALLOS, H. (Eds.). **La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de produccion, processamiento, utilization y comercializacion.** Call: CIAT, 2002. p. 295-325.

COCK, J. H. **Cassava: new potential for a neglected crop.** Colorado: Westview Press, 1985. 192p..

CUCHIARA, C. C.; SOUZA, S. A. M.; BORGES, C, de S.; LOPES, A.; RICKES, L. N.; ANJOS ; SILVA, S. D.; BOBROWSKI, V. L. Avaliação de indicadores de

viabilidade de pólen de mamona cultivar Lara armazenado sob temperaturas ultra-baixas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12. 2009, Fortaleza. **Anais....** : “Desafios para produção de alimentos e bioenergia”. Fortaleza: : Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2009. 1 CD-ROM.

DOMÍNGUEZ, E.C.; CEBALLOS, L.F.; FUENTES, C. Morfología de la planta de yuca. In: DOMÍNGUEZ, C.E. (Ed.) **Yuca**: investigation, production y utilization. Cali: CIAT, 1984. p.29-49.

FAO. **A produção mundial de mandioca.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/ak341e/ak341e06.htm#32>>. Acesso em 20 jul. 2008.

FAO – **A produção mundial de mandioca.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/ak341e/ak341e06.htm#32>>. Acesso em 29 jan. 2009.

FREITAS, B. M. Change with time in germinability of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains found on different body areas of its pollinator bees. **Review of Brazilian Biology**, Rio de Janeiro. v. 57. n. 2. p. 289-294. 1997.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. Melhoramento de mandioca no Brasil. In: AGRICULTURA: tuberosas amiláceas latino americano, 2. ed, São Paulo. 2002. v. 2, p. 242-257.

GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit Breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47,

HANNA, W.N. Pollen storage in frostless and conventional frostforming freezers. **Crop Science**, v.34, p.1681-1682, 1994.

JENNINGS, D. L. et al. Breeding for Crop Improvement. In: CASSAVA: BIOLOGY, PRODUCTION AND UTILIZATION, 2002, Wallingford. **Anais...** Wallingford: CAB International, 2002. p. 149-166.

KAWANO, K. Cassava. In: FEHR, W. R.; HADLEY, H. H. (Eds.). **Hybridization of crop plants**, Madison: ASA, CSSA, 1980. p. 225-233.

LEYTON, M. **Crioconservación de polen de yuca.** 1993. 113f. Tese (Mestrado em Biología) – Departamento de Biología, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Cali, Colombia, 1993.

MARCOS FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ. 2005. 495p.

MONTEIRO, D. A.; LORENZI, J. O.; VALLE, T. L.; PEREIRA, A. S. P.; SABINO, J. C. Produção de sementes de mandioca em plantas com um e dois ciclos vegetativos. **Bragantia**, Campinas, v. 43, n. 2, 1984. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S000687051984000200034;lng=en;nrm=iso>. Acesso em 13 fev. 2010.

NASSAR, N. M. A.; SILVA, J. R. D.; VIEIRA, C. Hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.38, p.1050-1053, 1986.

NASSAR, N. M. A. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz genetic resources: VI. anatomy of a diversity center. **Genetic and Molecular Research**, Brasília, v. 2, n. 2: p. 214-222, 2003.

PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, 2007.

PLAZAS, J. J. **Respuesta al cultivo in vitro de microsporas aisladas de variedades de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con fertilidad diferencial**. 1991. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Departamento de Biologia, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Cali, 1991.

PROUS, A. Alimentação e "arte" rupestre: nota sobre alguns grafismos pré-históricos brasileiros. **Revista de Arqueologia**, v.6, p.1-15, 1991.

RAFFAILAC, J.; SECOND, G. Cassava. In: TROPICAL plant breeding -. *Science*, Enfield and Cirad: Science Publishers, 2001, p. 30-54.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. ***Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): flora neotropica**. New York: Hafner Press, 1973.

ROGERS, D. S.; FLEMING, H. S. A monograph of *M. esculenta*. **Economic Botanic**. v. 27, n. 1, p. 1-113, 1973.

SEAB, **Análise da conjuntura agropecuária**. 2007. Disponível em: <www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/.../mandioca_2007_08.doc>. Acesso em 12 dez. 2009.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John Sons, 1995. p.325-440.

SILVA, R. M. et al. Biologia reprodutiva de etnovariedades de mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 101-107. 2001.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen**: biology, biochemistry, management. Berlin: Heidelberg, 1974.

VALLE, T. L. Mandioca: dos índios à agroindústria. **ABAM - Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca**, n.11, p. 24-25, 2005.

VIÉGAS, A. P. **Estudos sobre a mandioca**. São Paulo: Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo; IAC/Brascan. 1976.

CAPITULO 1

VIABILIDADE, PRODUÇÃO E MORFOLOGIA DE GRÃOS DE PÓLEN DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *Manihot*¹

¹ Artigo submetido ao comitê editorial do periódico Acta Botânica Brasileira

VIABILIDADE, PRODUÇÃO E MORFOLOGIA DE GRÃOS DE PÓLEN DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *Manihot*

RESUMO: A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), originária do continente americano, pertencente ao gênero *Manihot* e à família Euphorbiaceae. As espécies silvestres de mandioca são fundamentais para o programa de melhoramento genético, por apresentarem grande variabilidade e amplo espectro de adaptação. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a produção, o tamanho e a viabilidade de grãos de pólen, por meio de teste germinativo *in vitro*, *in vivo* e colorimétrico, de diferentes espécies do gênero *Manihot*. O trabalho foi realizado com mandioca silvestre e cultivada, oriundas dos bancos de germoplasma da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*. Botões florais em estágio de balão (pré-antese) foram retirados de 15 acessos distintos do gênero *Manihot*, sendo seis espécies de mandioca silvestres. A estimativa da produção de pólen foi realizada por meio da contagem do número de grãos de pólen produzidos por botão floral. O diâmetro do pólen foi determinado medindo-se o comprimento transversal do grão, utilizando-se uma ocular micrométrica. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. A viabilidade do pólen foi avaliada por testes *in vitro*, *in vivo* e testes colorimétricos. Estudos da ultraestrutura polínica foram realizados por meio de microscopia eletrônica de varredura. A produção média observada entre todos os acessos foi de 1.253 grãos de pólen. A maior produção foi observada no acesso DIC 587-05, com média de 3.638 grãos de pólen/flor, enquanto que a menor foi no acesso FLA 029-01, com média de 579 grãos. Com relação ao tamanho do grão de pólen, verificou-se que nos acessos silvestres, o tamanho variou de 132 a 163 μm e de 129 a 146 μm nas cultivadas. Os acessos silvestres, de maneira geral, produzem mais pólen e apresentam pólen de maior tamanho, quando comparadas com as cultivadas. A viabilidade dos grãos de pólen foi elevada nos testes colorimétricos, intermediária nos testes *in vivo* e não houve germinação em meio de cultura.

Palavras-chaves: *Manihot esculenta* Crantz, pré-melhoramento, recursos genéticos.

VIABILITY, PRODUCTION AND MORPHOLOGY OF POLLEN GRAINS OF DIFFERENT SPECIES OF THE *Manihot* GENUS

ABSTRACT: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) originated from the American continent, belongs to the *Manihot* genus and Euphobiacea family. Wild species of cassava are fundamental for the genetic breeding program due to their variability and broad adaptation spectrum. Therefore, the objective of the present work was to characterize production, size and viability of pollen grains through *in vitro*, *in vivo* and colorimetric germination test of different species of the *Manihot* genus. The work was carried out at Embrapa Cassava and Tropical Fruits. Floral buds in balloon stage (pre-anthesis) were taken from 15 distinct accessions of the *Manihot* genus, whereas six were wild species. The estimation of pollen production was carried out by the number of pollen grains produced per floral bud of flowers. Pollen diameter was determined by the transversal length of the pollen using a micrometric ocular. The experimental design was in complete random blocks, the data was submitted to the analysis of variance and averages compared by the Scott-Knott test at 5% probability. Pollen viability was assayed through *in vitro*, *in vivo* and colorimetric tests. Studies of pollen ultra-structure were carried out by scan electron microscopy. The average production observed for all the accessions was 1.253 pollen grains. The greatest production was observed for the accession DIC 587-05 with average of 3.638 pollen grains/flower; whereas the lowest production was for accession FLA 029-01 with average of 579 grains. In regard to pollen grain size, the wild accessions varied between 132 to 163 μm and from 129 to 146 μm for the cultivars. The wild accessions, in general, produced more pollen and presented larger pollen grains in comparison to the cultivated ones. Pollen grain variability was elevated for the colorimetric tests, and intermediate for the *in vivo* test and no germination occurred in the culture medium.

Key-words: *Manihot esculenta* Crantz, pré-breeding, genetic resources.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) originária do continente americano é uma planta heliófila, perene, arbustiva, pertencente à família das Euphorbiaceae. É tolerante à seca e possui ampla adaptação às mais variadas condições de clima e solo. A parte mais importante da planta são as raízes, tuberosas, ricas em amido, e utilizadas na alimentação humana e animal, ou como matéria-prima para diversas indústrias (TIRITAN et al., 2009).

A mandioca vem sendo propagada vegetativamente pela interferência humana, mantendo, entretanto, uma reprodução sexuada ativa, o que conserva e amplifica a variabilidade genética, possibilitando aos geneticistas a escolha de genótipos de interesse para os programas de melhoramento dessa espécie (SILVA, 2001).

As espécies silvestres de mandioca são fundamentais para o programa de melhoramento genético, por apresentarem grande variabilidade e amplo espectro de adaptação, oferecendo assim, muitas possibilidades de aproveitamento de seus genes em hibridação interespecífica para o desenvolvimento de tipo mais produtivo, resistente às pragas e doenças e mais tolerantes à condição de estresse (HORSFALL e ABIA, 2003; NASSAR 2007a, NASSAR 2007b).

Entretanto, dentre os principais problemas na utilização de espécies silvestres de *Manihot* em programas de melhoramento, destacam-se a falta de sincronia nos períodos de florescimento e a dificuldade para propagação e manutenção no campo dessas espécies (CEBALLOS et al., 2002).

Existem poucas informações sobre a fertilidade dos grãos de pólen de espécies silvestres de mandioca, apesar do seu potencial de uso em cruzamentos dirigidos visando à criação de novas cultivares. Portanto, faz-se necessária a intensificação de trabalhos relacionados aos aspectos da biologia floral, principalmente, os que se referem aos grãos de pólen e suas propriedades.

Pesquisas com variedades silvestres de mandioca envolvendo estudos da morfologia, viabilidade e conservação dos grãos de pólen, estão sendo conduzidas na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical com o propósito de gerar subsídios para o uso dessas variedades em futuros cruzamentos (VIEIRA et al., 2008; VIDAL et al., 2008; SOARES et al., 2009; VIEIRA et al., 2009).

Dentre os aspectos que devem ser considerados nesses estudos, destacam-se o estabelecimento de condições de cultivo adequadas para os ensaios de

viabilidade de pólen (germinação *in vitro*), assim como a adequação de métodos colorimétricos que permitam a identificação de gametas masculinos com alto potencial de fertilidade. Não menos importantes são os estudos referentes à produção, o tamanho e a morfologia dos grãos de pólen dessas espécies.

A viabilidade dos grãos de pólen pode ser estimada por vários métodos colorimétricos, utilizando-se diversos corantes, como solução de lugol, método de reação fluorocromática (Fluorochromatic Reaction - FCR), solução tripla de Alexander e corantes vitais, como o carmim acético, carmim propiônico, sudan IV, 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Aliadas a esses métodos podem ser realizadas ainda a germinação *in vivo* e *in vitro*, como ferramentas para teste de viabilidade. O método *in vitro* é o mais apropriado e utilizado em trabalhos dessa natureza, para diferentes espécies (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996, GEETHA et al., 2004; CHIAI et al., 2009).

Entretanto, em mandioca, os resultados da aplicação metodologias de avaliação da viabilidade do pólen não se mostraram animadores, demandando novos esforços nesse sentido (ORREGO e HERSLEY, 1984; MBAHE e HAHN, 1994).

Estudos referentes à produção, morfologia e viabilidade do pólen são, portanto, parte de uma demanda importante no melhoramento genético da mandioca, podendo subsidiar futuros cruzamentos entre mandioca cultivada e espécies silvestres do gênero *Manihot*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a produção, o tamanho e a viabilidade de grãos de pólen pelo teste germinativo *in vitro*, *in vivo* e colorimétrico de diferentes espécies do gênero *Manihot*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com acessos de mandioca silvestre e cultivada, oriundas dos respectivos bancos de germoplasma da **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**.

Botões florais em estágio de balão (pré-antese) foram retirados de 15 acessos distintos do gênero *Manihot*, sendo seis espécies de mandioca silvestres: *M. violacea* (VIO-A001-14), *M. dichotoma* (DIC-587-05 e DIC-001), *M. peruviana* (PER-005-01), *M. tomentosa* (TOM-001-18 e TOM-001-24), *M. anomala* (ANO-

049V-05), *M. flabellifolia* (FLA 005-01, FLA 005-05 e FLA 029-01) e cinco variedades da *M. esculenta* (BGM 549, BGM 116, COL 2215, BGM 001 e ROSA).

1) *Produção e tamanho de pólen*

A estimativa da produção de pólen foi realizada por meio da contagem do número de grãos de pólen produzidos por botão floral. Para cada genótipo utilizou-se três flores coletadas e que foram posteriormente acondicionadas em frasco de polietileno 3,5 cm x 2 cm. Os grãos de pólen foram lavados em 1,0 mL de etanol 70% e centrifugados por um minuto a 2000 rpm. Após a realização desse procedimento, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente, para evitar perda do material precipitado. Finalmente, os grãos de pólen foram ressuspensos em 1,0 mL de glicerol 50%.

De cada flor coletada, foram preparadas cinco lâminas contendo 30,0 µL da suspensão glicerol 50% com os grãos de pólen, perfazendo um total de 15 lâminas por acesso. Os grãos de pólen que permaneceram aderidos aos estames das flores foram colocados em uma lâmina de vidro, cobrindo-se imediatamente com a lamínula para contagem e inclusão no número total de pólen. A contagem do pólen foi realizada em microscópio óptico e visualizada no aumento de 10x.

O diâmetro do pólen foi determinado pelo comprimento transversal do grão utilizando-se uma ocular micrométrica. Posteriormente, foram selecionados aleatoriamente e mensurados 15 grãos de pólen para cada acesso de mandioca avaliado.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. De cada acesso, foram avaliadas três repetições, sendo cada repetição formada por cinco lâminas, na estimativa da produção, e cinco grãos de pólen na estimativa do tamanho. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa SAS (2000).

2) *Viabilidade do pólen*

2.1) *Teste germinativo in vitro*

Foram utilizados grãos de pólen oriundos de flores coletadas na pré-antese pela tarde, dos acessos de mandioca listados na Tabela 2.

Os grãos de pólen de aproximadamente 10 flores, sem qualquer processo de desinfestação, foram retirados e imediatamente transferidos para placas de Petri contendo três diferentes meios de cultura: **Meio 1:** 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$; 0,02% de $\text{Mg}(\text{SO}_4)_7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% de KNO_3 ; 0,01% de H_3BO_3 ; 15% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0; **Meio 2:** 0,08% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$; 0,02% H_3BO_3 ; 10% de sacarose, solidificado com 1,0% de ágar, com pH ajustado para 6,5; **Meio 3:** 0,015% de H_3BO_3 ; 0,045% de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 25% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar e pH ajustado para 6,5.

Após a inoculação dos grãos de pólen, as placas foram mantidas em condições controladas de temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro por 24 horas, antes de realizar a contagem dos grãos de pólen germinados, mediante observação em um estereomicroscópio na magnitude de 10x.

2.2) Teste germinativo *in vivo*

Na germinação *in vivo*, todos os genótipos foram cruzados com o mesmo progenitor feminino, a variedade 'ROSA' (BGM 260) devido a grande quantidade de flores femininas disponíveis. Dez flores femininas foram cobertas com sacos de tecido, e no momento da abertura floral foram realizados cruzamentos manuais (no período mais quente do dia) das 12:00 às 14:00 horas. Os grãos de pólen utilizados foram coletados de flores das diferentes espécies de *Manihot* em estágio de balão. A estimativa da viabilidade foi determinada por porcentagem, e foram considerados viáveis os grãos de pólen que formaram frutos.

2.3) Teste colorimétrico

Para análise de viabilidade por meio de corantes, foram utilizados os mesmos acessos testados *in vitro*. O pólen foi aspergido sobre a lâmina de vidro e corado com três tipos de corantes: carmim acético (KEARNS e INOUYE, 1993), Sudan IV (BAKER e BAKER 1979) e de Alexander (ALEXANDER, 1980), para investigar o corante mais eficiente para estimar a viabilidade polínica.

Após o preparo das lâminas, os grãos de pólen foram observados 10 minutos após a adição dos corantes. A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com três repetições cada, perfazendo um total de

300 grãos de pólen para cada corante investigado, com auxílio de um microscópio óptico *Leica* usando-se uma lente objetiva de 10x.

Considerou-se grãos de pólen viáveis todo aquele que apresentasse as seguintes características: corados, formato circular de tamanho grande ou médio e uniformes; os que não se enquadravam nessa classificação foram considerados inviáveis.

As fotomicrografias dos grãos de pólen foram realizadas com auxílio de um fotomicroscópio marca Zeiss modelo Axioskop 2, acoplado a uma câmara fotográfica AxiosCamMR3 e um microcomputador (PC), empregando o software Image Pro-Plus, versão 3.0 para Windows.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 9 x 3 (acessos x corantes) com três repetições, sendo cada repetição formada por 3 lâminas. Antes da análise de variância, os dados expressos em percentagem, foram transformados em $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})$, para atendimento das pressuposições da ANOVA. As médias foram comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, com o uso do programa computacional SAS (2000).

3. Ultraestrutura Polínica

Para esse estudo, foram coletadas flores masculinas dos acessos em estudo para a retirada e tratamento dos grãos de pólen, que foram colocados em tubos de *ependorf* contendo a solução fixadora de Karnovsky modificada, glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão cocodilato de sódio (0,05 M pH 7,2) por 48 horas. As amostras foram desidratadas em série etílica crescente (35%, 50%, 60%, 75%, 85%, 95% e 100%). A secagem das amostras foi realizada ao ponto crítico utilizando CO₂ líquido. Em seguida, os grãos de pólen foram depositados diretamente nos "STUBS", metalizados com ouro e observados em microscópio MEV marca LEO 435 VP no laboratório do NAP/MEPA – ESALQ/USP, sendo tiradas eletromicrografias para análise posterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e tamanho de pólen

Foi observada uma variação altamente significativa entre os acessos de mandioca avaliados, no que se refere à produção de grãos de pólen. A produção média observada entre todos os acessos foi de 1253 grãos de pólen. Dentre os genótipos silvestres, o que apresentou maior produção foi DIC 587-05, com média de 3.638 grãos de pólen/flor, enquanto que os menores valores foram obtidos no acesso FLA 029-01, com produção média de 579 grãos. Já para as variedades cultivadas de mandioca, verificou-se que o número de grãos de pólen por flor variou de 613 a 1193, sendo o maior valor obtido expressivamente menor que o maior valor obtido no acesso silvestre (Tabela 1).

Silva et al. (2001), avaliando a produção de pólen de variedades etnobotânicas de mandioca encontraram uma média de 1.666 grãos de pólen/flor e uma variação de 1.295,5 a 2.186,5 grãos de pólen/flor entre as variedades estudadas, o que pode ser considerado próximo ao resultado observado nesse trabalho, para as variedades cultivadas, embora estes sejam ligeiramente menores.

De maneira geral, registrou-se maior produção de pólen nos acessos silvestres do que nas variedades de mandioca cultivadas estudadas neste trabalho.

Os resultados deste trabalho são consistentes com os estudos preliminares sobre produção e viabilidade de pólen em espécies de *Manihot*, realizados na **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, que relatam uma variação na produção de pólen de 1056 a 2692 grãos de pólen por flor, onde espécies silvestres, em geral, produziram mais pólen que a espécie comercial (VIDAL et al., 2008)

A menor produção de pólen nas espécies cultivadas de mandioca pode ser uma das conseqüências do processo de domesticação, que privilegia totalmente a propagação vegetativa da espécie, em detrimento da propagação sexuada e conseqüentemente, do uso do pólen. Outro aspecto a ser considerado é que nesse processo de domesticação, a ação da seleção sobre o caráter floração pode ter sido reduzida drasticamente. Dessa forma, um progenitor que possua esta característica (baixa produção de pólen) irá mantê-la durante sucessivas gerações.

No melhoramento genético da mandioca, principalmente no que concerne ao uso de variedades silvestres, a produção de pólen pode ser uma característica de relevância, principalmente se houver a necessidade de armazenamento do pólen

por questões de assincronia de florescimento. Por outro lado, as taxas de pegamento envolvendo cruzamentos em mandioca são baixas, de maneira geral (NASSAR et al., 1986; NASSAR, 2003), e dessa forma, a realização de muitos cruzamentos envolvendo os mesmos parentais, vai depender diretamente da quantidade de pólen disponível e viável.

Com relação ao tamanho do grão de pólen, verificou-se que nos acessos silvestres, o tamanho variou de 132 a 163 μm , e de 129 a 146 μm para as variedades cultivadas. Diferenças significativas foram observadas em relação ao diâmetro do pólen, entre espécies e entre os acessos de uma mesma espécie (Tabela 1). Estes valores de tamanho de pólen estão dentro da variação observada por Vidal et al. (2008), onde o diâmetro dos grãos de pólen variou de 128 a 169 μm . Existem poucos estudos referentes à morfologia de grãos de pólen de mandioca, e o tamanho é uma das variáveis que devem ser consideradas, uma vez que pode ter influência na compatibilidade entre genótipos.

Tabela 1. Produção média de grãos de pólen/flor e tamanho médio (μm) de grãos de pólen de genótipos silvestres e variedades de mandioca.

Genótipo	Produção média	Diâmetro do pólen (μm)
DIC-587-05 (<i>M. dichotoma</i>)	3637,6 a	160,6 a
DIC-001 (<i>M. dichotoma</i>)	1963,0 b	163,0 a
VIO-A001-14 (<i>M. violacea</i>)	1823,0 b	143,0 b
TOM-001-18 (<i>M. tomentosa</i>)	1351,7 c	140,0 b
BGM 001 (<i>M. esculenta</i>)	1193,3 d	129,0 c
ANO-049V-05 (<i>M. anomala</i>)	1165,0 d	142,0 b
TOM 001-24 (<i>M. tomentosa</i>)	1156,0 d	135,0 c
BGM 116 (<i>M. esculenta</i>)	932,0 d	132,0 c
COL-2215 (<i>M. esculenta</i>)	863,7 d	146,0 b
FLA-005-01 (<i>M. flabellifolia</i>)	730,0 d	147,0 b
FLA-005-05 (<i>M. flabellifolia</i>)	697,7 d	136,0c
PER-005-01 (<i>M. peruviana</i>)	634,3 d	138,0c
BGM 549 (<i>M. esculenta</i>)	613,3 d	142,0b
FLA-029-01 (<i>M. flabellifolia</i>)	579,3 d	153,0a
ROSA (<i>M. esculenta</i>)	965,5 d	145,3 b
Média	1253,36	143,3
CV (%)	25,67	6,47

*Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo agrupamento ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Foi considerado pólen grande os que apresentaram tamanho $\geq 150 \mu\text{m}$, intermediários de 140 a 147 μm , e pequenos $\leq 138 \mu\text{m}$. Os maiores tamanhos de

pólen foram observados nas espécies *M. dichotoma* (em ambos os acessos: DIC 587-05 e DIC 001 e *M. flabellifolia* (acesso 029-01). Esta última foi a que apresentou maior variação em relação a tamanho, entre os acessos avaliados, com grãos de pólen, também de tamanho intermediário (FLA 005-01) e pequeno (FLA 005- 05). Nos acessos avaliados de *M. esculenta*, os grãos de pólen variam entre intermediário e pequeno, enquanto em *M. peruviana*, o acesso avaliado foi agrupado com aqueles em que os grãos de pólen apresentaram o menor diâmetro.

Diferenças significativas entre tamanhos de grãos de pólen de diferentes espécies podem sugerir distância evolutiva, o que dificultaria ainda mais a obtenção de híbridos entre esses materiais. Por outro lado, a especificidade entre as características morfológicas do gameta masculino e a morfologia da estrutura reprodutora feminina podem se tornar uma limitação em caso de diferenças significativas no tamanho do pólen.

Dessa forma, é possível afirmar que a capacidade de produção de pólen, assim como o tamanho do grão de pólen produzido são características importantes e que acabam por ser determinantes no comportamento reprodutivo das variedades, afetando diretamente o fluxo gênico e o potencial de fertilização de cada variedade.

Esse tipo de avaliação, portanto, é muito importante para gerar dados que possam ser usados na determinação de hibridações controladas. Entretanto, as implicações práticas em relação a essas características só podem ser efetivamente comprovadas por meio da tentativa de cruzamentos entre as variedades estudadas.

Viabilidade do pólen

Teste de viabilidade *in vitro*

Não foi observada germinação *in vitro* para as espécies estudadas em nenhum dos meios propostos. Esse fato provavelmente ocorreu devido aos grãos de pólen de mandioca silvestre e cultivada possuírem necessidades específicas que não foram atendidas pelos meios avaliados. Uma hipótese provável é que alguma substância específica encontrada no estigma da planta seja a indutora para a emissão do tubo polínico. O resultado encontrado no presente trabalho não diferiu do que foi obtido por Orrego e Hersley (1984), que estudando a germinação *in vitro* de pólen de mandioca, não verificaram crescimento do tubo polínico em nenhum dos meios de cultura testado, enquanto que Mbahe et al., (1994)

observou uma variação de 0,4 a 5,7% de germinação após avaliar 42 meios de culturas.

Outro problema observado foi o rompimento do pólen e a liberação de exsudatos do líquido interno frequentemente observados. Existem vários relatos sobre a eclosão de grãos de pólen *in vitro*, cultivados em meio contendo apenas água ou baixas concentrações de sacarose e de alta percentagem de germinação em concentração de sacarose variando de 20-30%. A freqüente eclosão dos grãos de pólen e tubo polínico é uma das dificuldades em trabalhos de cultura de pólen (BALOCH et al., 2001).

São raros os relatos de germinação *in vitro* de pólen de espécies da família Euphorbiaceae. No entanto, estudos de germinação *in vitro* de pólen de mamona (*Ricinus communis* L.), planta pertencente à mesma família da mandioca, têm sido realizados com resultados satisfatórios. Cuchiara et al. (2009), após avaliar a germinação dos grãos de pólen *in vitro* de mamona em diferentes temperaturas, observou que a de 20°C mostrou ser mais eficiente com 78% dos grãos de pólen apresentando crescimento de tubo polínico. Já Vargas (2006), obteve baixo percentual de germinação *in vitro* de mamona em todos os tratamentos avaliados, com a variação de 0,04 a 0,82% de grãos germinados.

Teste colorimétrico

Entre os acessos estudados, houve a formação de diferentes agrupamentos pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, em relação aos corantes avaliados, para percentagem de viabilidade de pólen, ocorrendo também a interação entre corante e acesso.

Dos oito acessos estudados, cinco não apresentaram diferenças significativas entre os três corantes utilizados. Os valores mais altos, acima de 90% para os três tipos de corante, foram obtidos com os acessos CEC A 019-13 (*M. cecropiaepholia*) e VIO A 001 -14 (*M. violacea*), que por sua vez no teste de viabilidade *in vivo* apresentaram 40% de formação de frutos (Tabela 2).

Não se observou uma correspondência entre os testes colorimétricos e o teste de viabilidade *in vivo*, reforçando teorias de outros autores, quanto à ineficiência do uso desses corantes como comprovantes de viabilidade polínica (MUNHOZ et al., 2008). Entretanto, os testes com esses corantes permitem inferências importantes sobre a integridade dos grãos de pólen avaliados, e por

isso não devem ser ignorados. A integridade da cromatina foi confirmada com carmim acético, com uma média de 88% dos grãos de pólen corados de vermelho intenso (Tabela 2 e Figura 1a). Já o teste com o corante Alexander sugeriu que em média 90% dos grãos de pólen possuíam protoplasma e parede celular íntegras, indicados pela coloração rosa do protoplasma e um fino contorno verde da parede celular (Tabela 2 e Figura 1b). Os grãos de pólen não corados com os corantes utilizados apresentam tonalidade acinzentada (Figura 1c).

Com relação ao Sudan IV, os grãos de pólen de todos os acessos estudados reagiram positivamente com o corante, apresentando coloração vermelha (Figura 1d), indicando que a natureza histoquímica dos grãos de pólen é lipídica.

Tabela 2. Percentagem de viabilidade de pólen de mandioca mediante o uso de três corantes distintos e testes *in vivo*.

Genótipos	Camim acético	Sudan IV	Alexander + 6 ml de ácido láctico	<i>In vivo</i> (%)
Rosa (<i>M. esculenta</i>)	75,00 aC	62,7 abD	76,0 aC	40 B
Aipim Bravo (<i>M. esculenta</i>)	83,0 aC	80,0 aC	90,7 aB	40 B
DIC-602-06 (<i>M. dichotoma</i>)	95,00 aA	72,0 bD	91,7 aB	0 D
FLA-005-05 (<i>M. flabellifolia</i>)	90,7 aB	87,3 aB	88,6 aB	71 A
TOM-001-06 (<i>M. tomentosa</i>)	84,7 bC	91,0 abB	95,0 aA	25 C
PER-002-02 (<i>M. peruviana</i>)	98,0 aA	98,0 aA	88,0 bB	60 A
CEC-A019-13 (<i>M. cecropiaepholia</i>)	95,7 abA	97,3 aA	95,0 abA	40 B
VIO-A 001-14 (<i>M. violacea</i>)	92,3 abB	91,3 abB	95,3 aA	40 B

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo agrupamento a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

De acordo com Souza (2002), valores acima de 70% são considerados como alta viabilidade do pólen, de 31 a 69% como média e até 30%, baixa. Os resultados aqui apresentados corroboram os discutidos na literatura sobre mandioca, segundo os quais a taxa de viabilidade de pólen é superior a 60% (SILVA et al., 2001; VIDAL et al., 2008).

Com base nessa afirmação, e de acordo com os resultados obtidos, todos os acessos avaliados apresentaram alta viabilidade, considerando o conjunto das técnicas colorimétricas, enquanto que o teste de germinação *in vivo* mostrou alta viabilidade (71%) para FLA 005-05 (*M. flabellifolia*) e viabilidade mediana para os demais acessos, com exceção do resultado obtido com DIC 602-06 (*M. dichotoma*)

onde não se registrou a formação de nenhum fruto. Uma das sugestões para explicar essa não formação de frutos nos cruzamentos desse acesso pode ser o tamanho do pólen observado neste acesso (Tabela 1), que foi significativamente maior que a da variedade de *M. esculenta* usada como progenitora feminina nos testes *in vivo*.

O DIC 602-06 (*M. dichotoma*) foi o acesso que obteve características de tamanho e produção de grãos de pólen mais discrepantes, em comparação com a mandioca cultivada. Essa diferença parece esta relacionada com a incompatibilidade genética entre DIC 602-06 e o acesso 'ROSA' de mandioca cultivada, já que o genótipo silvestre apresentou alta viabilidade nos três corantes utilizados, e ainda possui grande produção e tamanho de pólen. Essas informações são importantes quando se deseja selecionar progenitores para hibridizações interespecíficas.

Uma consideração a ser feita é que foi observada a presença de uma bolha lipídica aderida à parede do grão de pólen (Figura 1a), sugerindo a presença de *pollenkit* nos pólen de mandioca. O termo *pollenkit* refere-se a uma substância presente na superfície do grão de pólen contendo componentes voláteis, e atrativos para os polinizadores, garantindo dessa forma sua dispersão (PACINI e HESSE, 2005). Essa substância é altamente hidrofóbica, homogênea, fica envolta da exina do pólen maduro, e contém lipídeos, carotenóides, flavonóides e ácidos graxos, todos secretados pelas células tapetum (STANLEY e LINSKENS, 1974). De acordo com Lush (1999), os lipídeos restringem a perda de água no estigma e nos grãos de pólen, devido à sua natureza hidrofóbica. Parés et al. (2002), afirmam que quando o estigma é seco, como no caso de mamão, requer substâncias nos grãos de pólen para umedecê-lo durante a interação pólen x estigma (RODRIGUES-GARCIA et al., 2003).

Em cultivares de maracujazeiro, Souza et al. (2002), observaram a existência da substância *pollenkitt* nos grãos de pólen, que dentre outras funções, atua como protetor, minimizando a desidratação e conseqüentemente a perda da viabilidade do grão de pólen nessa espécie. Já Vargas (2006), trabalhando com pólen de mamona que também pertence à família Euphorbiaceae, constataram a presença dessa substância ao redor da exina do pólen, que parece exercer a mesma função.

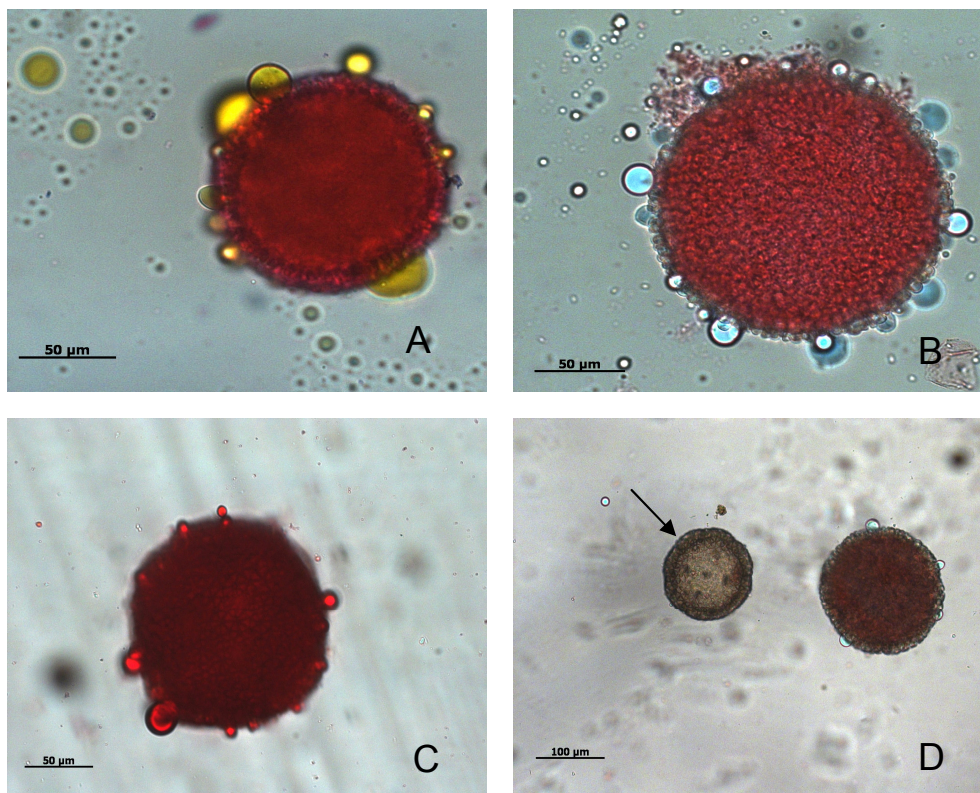


Figura 1. Viabilidade de pólen de mandioca. A) Grão de Pólen corado com carmim acético; B) Pólen corado com solução de Alexander; C) Pólen corado com Sudan IV; D) Aspecto do pólen não corado (inviável – seta) com a solução de Alexander; E) Detalhe da *pollenkitt* (seta).

Ultraestrutura de Pólen

Na Figura 2 é possível observar microfotografias feitas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de grãos de pólen de cinco diferentes acessos de mandiocas silvestres e um acesso de mandioca cultivada.

O estudo de características morfológicas é importante, principalmente para identificações e separações de natureza taxonômica, permitindo inferências sobre a capacidade de cruzamento entre os materiais estudados.

No que se refere à morfologia dos grãos de pólen avaliados e em relação à polaridade e simetria, verificou-se que em todos os acessos, os grãos de pólen se apresentaram isolados, esféricos e apolares, uma vez que não foi possível discernir os polos distal e proximal, assim como não se acham reunidos em tríades ou

tétrades, como pode ocorrer em algumas espécies (GONSALVES-ESTEVEVES e LIMA et al.,2008).

Os grãos de pólen apresentam formato esférico com uma relação $P/E = 1$, onde P é a medida do eixo polar e E, do eixo equatorial. A vista polar dos grãos de pólen recebe o nome de âmbito, que pode apresentar formas variadas e que, no caso da mandioca, mostrou-se circular.

Não foi possível observar a abertura na parede dos grãos de pólen. A abertura, na realidade, pode corresponder a uma região mais estreita, e não necessariamente a orifícios na parede do grão. É uma região importante, pois é responsável pela projeção do tubo polínico para fora do grão, quando o mesmo cai na superfície do órgão feminino, alcançando e fertilizando a oosfera.

As diferenças observadas entre os acessos se concentraram, principalmente, nas estruturas e esculturas da parede do grão de pólen, que podem ser descritas a partir da camada externa, denominada exina e da camada interna, intina.

A ornamentação da exina se constitui em um dos principais componentes morfológicos para a caracterização dos grãos de pólen. A exina, por sua vez, apresenta uma porção externa, denominada sexina e uma porção interna, a nexina, a partir da qual, os elementos estruturais da sexina se projetam. Esses elementos estruturais, ou ornamentações, são muito variados entre espécies e nesse trabalho se apresentaram em formato triangular com variações, onde os arranjos ou distribuição são diferenciados entre os acessos, assim como o tamanho e a distância entre essas estruturas.

Maior semelhança na ornamentação da exina foi observada entre *M. flabellifolia* (FLA 005-07) e a *M. esculenta* Crantz na variedade ROSA (Figuras 2-1C e 7C), respectivamente. Considerando que os resultados referentes à produção e tamanho de pólen de ambas as variedades são similares também, é possível sugerir que há uma proximidade evolutiva maior entre elas, o que explicaria o resultado obtido com o teste de viabilidade *in vivo*, quando 70 % dos cruzamentos realizados geraram frutos. Estes resultados corroboram com a teoria de que a *M. flabellifolia* constitui um dos ancestrais da *M. esculenta* (ALLEM, 1999). A mesma discussão pode ser feita para *M. peruviana* (PER 002-02) com 60% de cruzamentos viáveis e dados de produção, tamanho e ultraestrutura de pólen bem próximos.

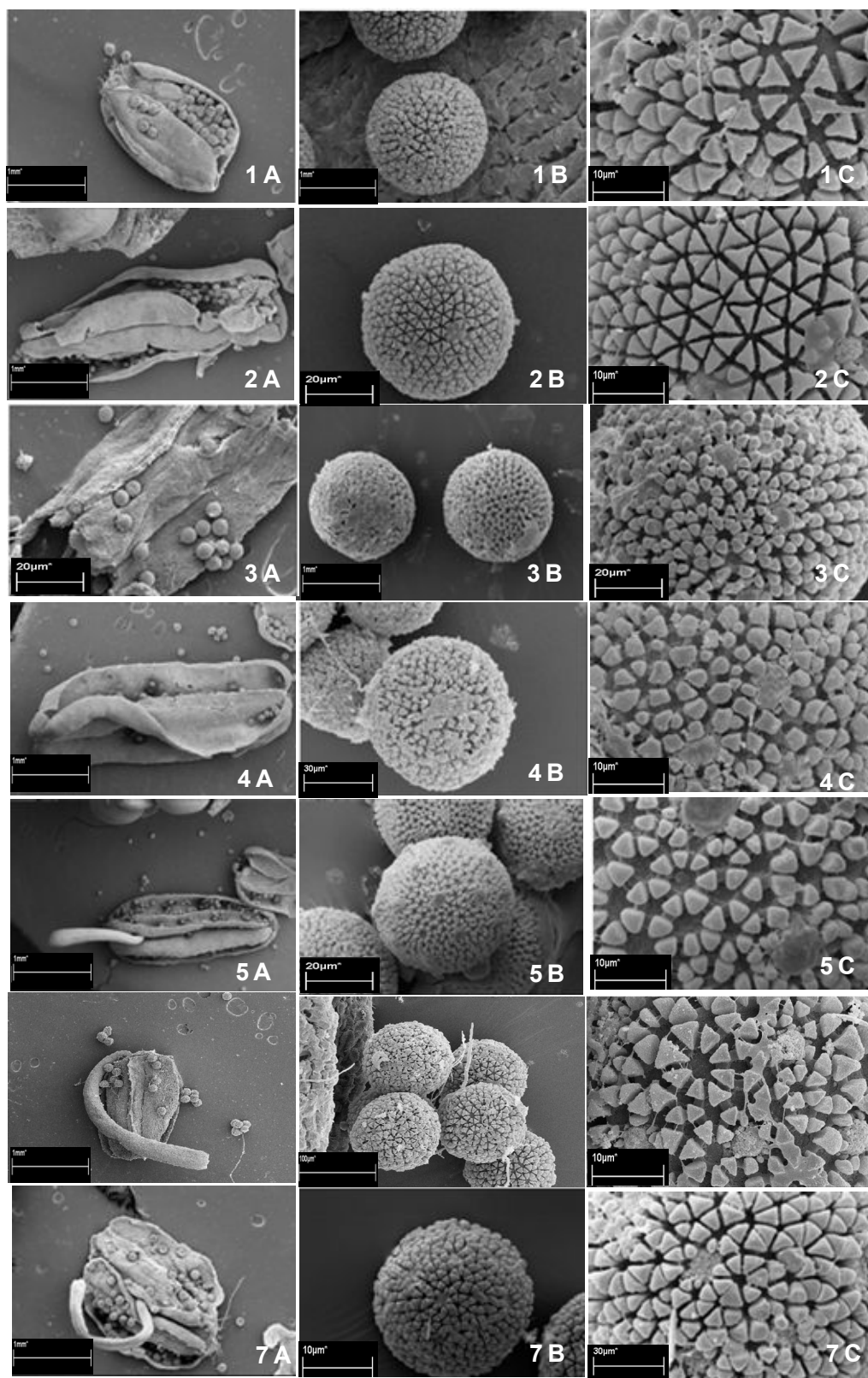


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de grãos de pólen de seis espécies do gênero *Manihot*. A. estame, B. grão de pólen, C. ornamentação da exina. 1) *M. flabellifolia* (FLA 005-07); 2) *M. dichotoma* (DIC 602-06); 3) *M. tomentosa* (TOM 001-18); 4) *M.*

violaceae (VIO A 001-14); 5) *M. cecropiapholia* (CEC A 019-13); 6) *M. peruviana* (PER 002-02); 7) *M. esculenta* Crantz (ROSA).

Nos acessos *M. tomentosa* (TOM 001-18) e *M. violaceae* (VIO A 001-14) (Figuras 2-3C e 2-4C, respectivamente), as estruturas de ornamentação já aparecem mais globulares, no caso da primeira, e amorfas, no caso da segunda, ainda que a disposição seja similar na *M. tomentosa*.

Finalmente, a *M. cecropiapholia* (CEC A 019-13) apresenta uma ornamentação diferente das demais, com espaços bem definidos entre as estruturas triangulares (Figura 2-5C).

Uma observação interessante que a microscopia de varredura permitiu foi a presença de *pollenkit* apenas nas variedades silvestres, não tendo se observado a presença dessa substância e nenhum dos acessos de *M. esculenta* avaliados. Essa ausência, de forma semelhante ao que foi discutido em relação às quantidades de pólen, pode estar relacionada ao processo de domesticação da espécie, considerando-se as funções específicas que o *pollenkit* possui.

CONCLUSÕES

As variedades silvestres, de maneira geral, produzem mais pólen e apresentam pólen de maior tamanho quando comparadas com as cultivadas;

Não ocorreu germinação *in vitro* de pólen nas condições testadas;

Os testes colorimétricos superestimaram a viabilidade dos grãos de pólen, quando comparados com a germinabilidade polínica *in vivo*, porém são úteis para determinação da integridade celular;

A ultraestrutura polínica mostrou diferenças no arranjo estrutural da ornamentação da exina entre os acessos avaliados, podendo constituir-se em uma ferramenta importante para estudos de taxonomia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEM, A. C. The closest wild relatives of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v. 107, p.123–133. 1999.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v 55, p. 13-18. 1980

BAKER, H.G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v. 66, p. 591-600, 1979.

BALOCH, M. J. et al. Impact of concentrations on *in vitro* pollen germination of okra, *Hibiscus esculentus*. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 402-403, 2001.

CHIAI, G. S. et al. Germinação *in vitro* de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 39, n. 5, 2009.

CUCHIARA, C. C. et al. Avaliação da viabilidade polínica de genótipos de mamoneira em diferentes temperaturas. Conhecimento sem fronteira. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17. ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 10. 2009. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB_00104.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2010.

GEETHA, K.; VIJAYABASKARAN, S.; JAYARAMAN, N. *In vitro* studies on pollen germination and pollen tube growth in maize. **Food, Agriculture, Environment**. v. 2, p. 205-207, 2004.

GONCALVES-ESTEVEZ, V.; MELHEM, T. S. Palinotaxonomia de espécies brasileiras de *Cheiloclinium* Miers (Hippocrateaceae Juss.). **Acta Botanica Brasílica**. São Paulo, v. 18, n. 3, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext;pid=S010233062004000300010;lng=en;nrm=iso>. Acesso em 12 fev de 2010.

HORSFALL, M.; ABIA, A. A. Sorption of Cd(II) and Zn(II) ions from aqueous solutions by cassava waste biomass (*Manihot sculenta* Cranz). **Water Research**, vol. 37, n. 20, p. 4913-4923, 2003.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado. 579p. 1993.

LIMA, L. C.; MAGALHAES e SILVA, F. M.; SANTOS, F. A. R. Palinologia de Espécies de Mimosa L. (Leguminosae-Mimosoideae) do Semi-Árido Brasileiro. **Acta Botanica Brasílica**. v. 22, n. 3, 2008.

LUSH, W. M. Winter chemotropism and pollen tube guidance. **Trends Plant Science**, London, v. 4, p. 413-418, 1999.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v. 67, p.101-104. 1996.

MBAHE, R. E., AKEN'OVA, M. E. AND HAHN, S. K. Germination of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) pollen. **Acta Horticulturae**. p. 172-177. 1994.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, 2008.

NASSAR, N. M. A.; SILVA, J. R. D.; VIEIRA, C. Hibridação interespecífica entre mandioca e espécies silvestres de *Manihot*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 38, p.1050-1053, 1986.

NASSAR, N. M. A. Gene flow between cassava, *Manihot esculenta* Crantz, and wild relatives. **Genetics and Molecular Research**, p. 334–347. 2003.

NASSAR, N. M. A.; KALKMANN, D. COLLEVATTI, R. G. A further study of microsatellite on apomixis in cassava. **Hereditas**, n. 144, p. 01-04, 2007a.

NASSAR, N. M. A.; VIZZOTO, C. S.; SCHWARTZ, C. A. PIRES, O. R. J. Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**. n. 6, v. 1, p. 116-121, 2007b.

ORREGO, J. I.; HERSHEY, C. H. Almacenamiento del polen de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por medio de liofilización y varios regimenes de humedad y temperatura. **Acta Agronomica**, v. 34, p. 21-24, 1984.

PACINI, E.; HESSE, M. Pollenkit – its composition, forms and functions. **Flora** **200**. p. 399-415. 2005.

PARÉS, J.; BASSO, C.; JÁUREGUI, D. Momento de anthesis, dehiscencia de anteras y receptividad estigmática en flores de lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena Amarilla. **Bioagro**. Barquisimeto, v. 14, n. 1, p.17-24, 2002.

RODRÍGUEZ-GARCIA, M. I.; M'RANI-ALAOUI, M.; FERNÁNDEZ, M. C. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma**, Vienna, v. 221, p. 237-244, 2003.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide**: statistics, Version 8 ed. SAS Institute, Cary, NC. 2000.

SOARES, T. L. et al. Viabilidade de pólen em mandioca silvestre. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13. 2009, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP. 2009. p. 741.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974.

SOUZA M. M.; 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**, Lavras. v. 26, n.6, p.1209- 1217, 2002.

SILVA, R. M. et al. Biologia reprodutiva de etnovarietades de mandioca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 101-107. 2001.

TIRITAN, C. S. et al. *Avaliação dos parâmetros de desenvolvimento de doze cultivares de mandioca na região oeste paulista*. In: Congresso Brasileiro de Mandioca, 13. 2009. Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP. 2009. 1 CD-ROM.

VARGAS, D. P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2006.

VIDAL, M. et al. A. Preliminary studies on pollen production and viability in wild relatives and cultivated cassava. In: FIRST SCIENTIFIC MEETING OF THE GLOBAL CASSAVA PARTNERSHIP. 2008, Ghent, Belgium. **Anais...**Ghent, Belgium:Institute of Plant Biotechnology for Developing Countries. p. 62, 2008. 1 CD-ROM.

VIEIRA, L. de J.; SOUZA, F. V. D.; VIDAL, M. das G. Estudos de viabilidade e conservação de pólen de mandioca (*Manihot esculenta*) e de espécies silvestres de *Manihot* para desenvolvimento de híbridos interespecíficos. In. JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 2. 2008, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas, p. 43, 2008. 1 CD-ROM.

VIEIRA, L. de J. Produção e tamanho de pólen de variedades domésticas e espécies silvestres de mandioca. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13. 2009, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP. 2009. p. 727-230. 1 CD-ROM.

CAPITULO 2

CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE MANDIOCA SILVESTRE²

² Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico Ciência e Agrotecnologia

CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE DE PÓLEN DE MANDIOCA SILVESTRE

RESUMO: A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), planta da família Euphorbiaceae e nativa do Brasil, se destaca como fonte de renda e no desenvolvimento social e econômico, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Espécies de mandioca silvestres são fundamentais para o trabalho de melhoramento genético por representarem fonte de resistência a fatores de estresses bióticos e abióticos para a espécie de mandioca cultivada. Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre a compatibilidade e a possibilidade da realização de cruzamentos com essas espécies, demandando estudos diversos. A conservação de pólen é importante para pesquisas básicas, assim como para o intercâmbio e preservação de germoplasma. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da conservação de grãos de pólen da espécie de mandioca silvestre *Manihot flabellifolia* (FLA 005-07) em diferentes temperaturas por meio do estudo da viabilidade dos grãos de pólen em um período de três e seis meses de armazenamento. Foram coletadas flores masculinas em pré-antese, do acesso silvestre FLA 005-07 da coleção de trabalho de mandioca silvestre estabelecida na *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*. O pólen retirado foi depositado em envelopes de papel alumínio de 5 x 5 cm, e uma amostra foi submetida a desidratação prévia. Após a desidratação, todas as amostras foram submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento: 27°C, 4°C, -20°C e -80°C, durante dois diferentes períodos de tempo: três e seis meses de armazenamento. A viabilidade antes e após armazenamento foi estimada por testes *in vivo* e colorimétrico. Para comparação entre as médias utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% pelo programa estatístico SAS (2000). Diferentemente do que foi observado no cruzamento controle, os cruzamentos realizados com pólen armazenado geraram apenas frutos, e não apresentaram formação de sementes em nenhum dos tratamentos. Já no teste com o corante carmim acético, mostrou que mesmo após seis meses de armazenamento o grão de pólen do acesso avaliado continua moderadamente viável.

Palavras-chaves: *Manihot esculenta* Crantz, pré-melhoramento, recursos genéticos.

STORAGE AND VIABILITY OF POLLEN WILD CASSAVA

ABSTRACT: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plant Euphorbiaceae and native of Brazil, stands out as a source of income and social and economic development, especially in the North and Northeast. Wild species are fundamental to the work of genetic improvement because they represent a source of resistance to factors of biotic and abiotic stresses for the species of cultivated cassava. However, few information is available about the compatibility and the possibility of carrying out crosses with these species, requiring several studies. The preservation of pollen is important for basic research as well as for the exchange and preservation of germplasm. The aim this study was to evaluate the efficiency of conservation of pollen grains of wild species of cassava *Manihot flabellifolia* (FLA 005-07) at different temperatures for studying the viability of pollen grains in a period of three and six months of storage. Male flowers of wild access FLA 005-07 were collected in pre-anthesis in work collection of wild cassava established at Embrapa Cassava and Tropical Fruits. The pollen removed was placed in aluminum foil 5 x 5 cm and a sample was submitted prior to dehydration. After dehydration, all samples (with and without dissection) were submitted to different storage temperatures: 27°C, 4°C, -20°C and -80°C during two different time periods: three and six months of storage. The viability before and after storage was estimated by *in vivo* tests and colorimetric. For comparison between means used the Tukey test group, the level of 5% by the statistical program SAS (2000). Unlike what was observed in the control beam, the crosses made with pollen stored generated only fruit, and showed formation of seeds in any of the treatments. In the test with acetic carmine showed that even after six months of storage the pollen grain access still rated moderately feasible.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz, pre-breeding, genetic resources.

INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), planta da família Euphorbiaceae e nativa do Brasil, se destaca como fonte de renda e no desenvolvimento social e econômico, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Devido à sua robustez e tolerância a condições ambientais adversas, como a baixa fertilidade dos solos ácidos, a espécie é muitas vezes cultivada como cultura de subsistência em solos marginais (ATEHNKENG et al., 2006).

Entretanto, a busca por variedades melhoradas, resistentes às principais doenças, com características diferenciadas e produtivas cresce à medida que surgem novas demandas em relação à cultura, principalmente no continente africano. Em vista disso, juntamente com melhorias no sistema de cultivo, o melhoramento genético é de extrema relevância para aumentar a qualidade do produto obtido, ou criar novas variedades, seja ele voltado para alimentação humana, animal ou para a indústria (FUKUDA, 2002).

As espécies silvestres do gênero *Manihot* se constituem em uma fonte de genes que podem ser usados para a obtenção de novas variedades, ainda que poucos esforços tenham sido realizados nessa direção, a fim de gerar dados e subsídios para o aproveitamento desses materiais. Ainda assim, alguns estudos mostraram combinações interessantes de proteínas com baixas concentrações de ácido cianídrico, assim como estudos em habitats naturais revelaram resistência à seca e ao alumínio e boa adaptação às baixas temperaturas (NASSAR, 2000).

Essas espécies são fundamentais para o trabalho de melhoramento genético, por representarem uma fonte de resistência a fatores de estresses bióticos e abióticos para a espécie de mandioca cultivada.

Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre a compatibilidade e a possibilidade da realização de cruzamentos com essas espécies, demandando estudos diversos. Dentre essas demandas, destacam-se estudos referentes à conservação do pólen, considerando que a falta de sincronia nos períodos de florescimento está entre os principais problemas detectados para a realização de cruzamentos com espécies cultivadas.

Dessa forma, são necessários esforços para o desenvolvimento das técnicas mais adequadas à conservação de pólen de mandioca, em vista da falta de trabalhos realizados nessa direção. Além dos objetivos relacionados ao melhoramento, a conservação de pólen é importante para pesquisas básicas,

assim como para o intercâmbio e preservação de germoplasma (HANNA, 1994; EINHARDT, 2006; FERES, 2009).

A conservação, no entanto, deve preservar a viabilidade do pólen armazenado e por isso, a necessidade de monitorar essa capacidade antes, durante e depois da conservação. Dessa forma, pode-se estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar e fertilizar, tornando-se dessa forma uma importante ferramenta para o melhoramento e para o intercâmbio entre instituições (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008).

O sucesso da preservação do pólen, além do período de conservação, depende principalmente de fatores como o estágio fisiológico da flor, a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, e do grau de umidade do grão de pólen (AKIHAMA et al., 1979; GIORDANO et al., 2003). O teor de umidade no grão de pólen pode ser determinante para sua sobrevivência e para a manutenção de sua viabilidade, pois a formação de cristais de gelo durante o período de armazenamento pode causar rompimento de tecidos. Por outro lado, a retirada excessiva de água dos tecidos pode inviabilizar de forma permanente o grão de pólen, ficando evidente a necessidade de cuidados na etapa de dessecação. Outro aspecto que deve ser considerado é que em condições de baixa umidade há redução da proliferação de microrganismos, o que minimiza a deterioração do grão de pólen (FRANÇA, 2008).

Entretanto, atingir o ponto ideal de dessecação demanda esforços dirigidos a cada espécie em particular. No caso de mandioca, não existem dados anteriores que evidenciem os teores ideais de umidade em grãos de pólen, principalmente em variedades silvestres.

Outro fator que influencia significativamente na germinação de grãos de pólen é o tempo necessário para sua germinação. O conhecimento do início da emissão do tubo polínico e de sua estabilização em trabalhos de palinologia é de grande importância, pois permite determinar o tempo ideal para avaliações dos testes de viabilidade após a inoculação, o que proporciona melhor qualidade das polinizações controladas (CHAGAS et al., 2009).

No que se refere à viabilidade do pólen, considera-se que um bom pólen deve apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos (SCORZA e SHERMAN, 1995). À medida que o pólen envelhece, a porcentagem

de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. O objetivo, com a conservação é que não ocorra esse processo de envelhecimento e o pólen possa manter sua viabilidade dentro dos limites aceitáveis para seu posterior uso.

Para o monitoramento da viabilidade do pólen conservado, vários testes podem ser utilizados, destacando-se quatro tipos principais, a seguir: a. pelo uso de corantes; b. germinação *in vitro*; c. germinação *in vivo*, e d. polinização *in vivo* e a porcentagem de frutificação efetiva (GALETTA, 1983).

Entretanto, algumas observações devem ser consideradas na escolha do teste a ser usado. Nenhum teste de viabilidade pode ser considerado totalmente confiável, já que no caso do uso de corantes, estes podem reagir com estruturas ou constituintes químicos, confundindo os resultados obtidos (STANLEY e LINSKENS, 1974). A germinação *in vitro* não é conclusiva, e não garante o sucesso da fertilização, além de implicar na dificuldade adicional de estabelecimento do meio de cultivo ideal. É um método influenciado por diferentes fatores, que variam de acordo com a espécie, envolvendo principalmente os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação.

Em mandioca, alguns trabalhos realizados já deixaram evidente essa dificuldade, quando entre mais de 40 meios de cultura testados, o que apresentou os melhores resultados registrou pouco mais de 5% de germinação (ORREGO e HERSLEY 1984; MBAHE e HAHN, 1990).

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da conservação de grãos de pólen da espécie de mandioca silvestre *Manihot flabellifolia* (FLA 005-07) em diferentes temperaturas, por meio do estudo da viabilidade dos grãos de pólen armazenados pelos períodos de três e seis meses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas flores masculinas em pré-antese, do acesso silvestre FLA 005-07 (Figura 1 A, B e C) oriundo da coleção de trabalho de mandioca silvestre estabelecida na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

A coleta foi realizada de março a maio de 2009, sempre no horário de 13:30 horas, e as flores colocadas em tubos plásticos de 3,5 x 2 cm de tamanho.



Figura 1. A - Planta de FLA-005-07 em condições de campo; B - Inflorescência e C - Flor masculina. Cruz das Almas – BA.

A retirada do pólen de aproximadamente 20 flores foi realizada utilizando-se pincéis e papel alumínio. O pólen retirado foi depositado em envelopes de papel alumínio de 5 x 5 cm, para armazenamento nas condições estabelecidas.

2) Desidratação dos grãos de pólen

O grau de umidade do grão de pólen foi determinado adotando-se a metodologia utilizada por França (2008). Foram pesados inicialmente recortes de papel alumínio em balança de precisão com quatro casas decimais (Pt). Logo após, foram acrescentados os grãos de pólen e foi procedida então a segunda pesagem (Pu). Os grãos de pólen no papel alumínio foram submetidos a desidratação por 30 minutos em câmara de fluxo laminar. Após esse procedimento, os recortes foram fechados como envelopes e levados à balança analítica para a terceira pesagem (Ps). Foi armazenado um envelope com grãos de pólen de aproximadamente 20 flores para cada tratamento.

Dessa forma a umidade foi determinada por meio da seguinte equação:

$$U = \frac{(P_u - P_s)}{(P_u - P_t)} \times 100$$

Onde:

U – Grau de umidade do grão de pólen (%)

P_u – Peso úmido (g)

P_s – Peso seco (g)

P_t – Peso da tara (g)

A umidade foi determinada pela média observada entre três amostras.

3) Armazenamento do pólen

Após a desidratação, todas as amostras foram submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento: 27°C (temperatura ambiente), 4°C (em geladeira), -20°C (em freezer) e -80°C (em ultra freezer), durante dois diferentes períodos de tempo: três e seis meses de armazenamento.

4) Estimativa da viabilidade polínica

Antes e após o armazenamento, foi realizado o teste de viabilidade polínica com os grãos de pólen por meio de dois diferentes métodos: viabilidade *in vivo* e viabilidade com uso de corante carmim acético 1%. Como testemunha, foi utilizado pólen fresco sem armazenamento e desidratação prévia.

4.1) Teste de viabilidade *in vivo*

Para o teste de viabilidade *in vivo* utilizou-se como parental feminino a variedade de mandioca cultivada 'ROSA' de *M. esculenta* Crantz, devido, principalmente ao grande número de flores femininas que havia disponíveis. Outra razão para a escolha dessa variedade deveu-se principalmente à compatibilidade com o genótipo silvestre, já que em ensaio preliminar com pólen fresco, registrou-se 70% de pegamento nos cruzamentos em campo, com a formação de frutos e sementes.

Para a realização das hibridizações, foram eliminadas todas as flores masculinas das inflorescências com flores femininas aptas a serem polinizadas. Os cruzamentos foram realizados de setembro a outubro de 2009, no período mais quente do dia (de 12:00 às 14:00 horas), quando ocorre a abertura da flor feminina e os estigmas encontram-se mais receptivos (CREPALDI, 1987). As flores femininas foram encobertas com sacos de tecido antes e após os cruzamentos, para evitar a contaminação por pólen exógeno. A porcentagem de pólen viável foi estabelecida pelo número de frutos formados após a realização de cruzamentos com grãos de pólen armazenado.

4.2) Teste de viabilidade com corante carmim acético

Para o teste de viabilidade com uso de corante, foi utilizado carmim acético a 1%. Os grãos de pólen oriundos dos diferentes tratamentos foram retirados do papel alumínio e depositados sobre lâminas de vidro, onde foram acrescentadas três gotas do corante e encobertos com lamínula. Após cinco minutos, as lâminas

foram levadas ao microscópio óptico, para estimativa do número de grãos de pólen viáveis.

Foram considerados viáveis aqueles grãos que apresentaram tamanho médio ou grande, com formato regular e corados de vermelho. Os grãos de pólen considerados inviáveis foram os que apresentaram-se com o citoplasma pouco corado, tamanho pequeno e com rompimentos na membrana. O cálculo da percentagem de viabilidade polínica foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de grãos de pólen corados}}{\text{N}^\circ \text{ total de grãos pólen}} \times 100$$

5) Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial (4 x 2 x 2), sendo 4 temperaturas (27°C, 4°C, -20°C, -80°C), 2 pré-tratamentos (com e sem dessecação) e 2 períodos de armazenamento (3 e 6 meses). Para os testes de viabilidade *in vivo*, o número de repetições se constituiu de 10 flores por tratamento, enquanto que para o teste com o carmim acético avaliou-se quatro lâminas, e de cada uma delas foram considerados 200 grãos de pólen, totalizando 800 grãos de pólen por tratamento.

Para comparação entre as médias dos dados de viabilidade por carmim acético, foi realizada a análise de variância e utilizou-se o teste de agrupamento Tukey, ao nível de 5% de probabilidade pelo programa estatístico SAS (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de umidade após os 30 minutos de dessecação em câmara de fluxo laminar foi estabelecido em torno de 30% para todo o material armazenado.

Na tabela 1, é possível observar a porcentagem de formação de frutos a partir dos cruzamentos realizados com o pólen armazenado. A maior produção de frutos foi observada na temperatura de -80°C, com um total de 21 frutos, enquanto que a menor quantidade de frutos foi observada na temperatura de -20°C, com sete frutos produzidos. Os resultados obtidos com o pólen armazenado após três meses a 27°C chamaram a atenção pela não formação de fruto, com e sem o pré-tratamento (desidratação). Já após seis meses de armazenamento, 30% e 90%

dos cruzamentos formaram frutos sem e com a realização do pré-tratamento respectivamente, na temperatura de 27°C.

O fato de, aos seis meses, a formação de frutos ter sido muito superior ao observado aos três meses, de certa forma surpreendeu, já que, à medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos tendem a decrescer. Uma hipótese para os resultados obtidos pode ter sido devido a um processo de desidratação lento, atingindo índices de umidade mais favoráveis para a conservação do pólen.

O pré-tratamento parece ter favorecido o pólen armazenado apenas em temperaturas positivas, 27°C e 4°C, visto que os resultados com as temperaturas negativas não mostraram efeito significativo, ao contrário da expectativa. A retirada de água (desidratação/dessecação) dos tecidos a serem congelados, garante a integridade do mesmo, evitando a formação de cristais que causam rompimento e morte celular. De acordo com a literatura, o conteúdo de água ideal para congelamento, está em torno de 20%, que corresponde à quantidade de água não congelável da amostra (ENGELMAN, 2008).

Tabela 1. Percentagem de frutos formados a partir de pólen submetido a quatro temperaturas e dois períodos de armazenamento (três e seis meses) com e sem desidratação (CPT e SPT).

Temperatura	3 meses		6 meses	
	SPT	CPT	SPT	CPT
27°C	0 cC	0 cA	30 bB	90 aA
4°C	20 aB	30 aA	10 aC	50 aA
-20°C	0 cC	20 bA	30 aB	20 bA
-80°C	70 aA	50 bA	40 cA	50 bA

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha, ou de uma mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo agrupamento a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Diferentemente do que foi observado no cruzamento controle, os cruzamentos realizados com pólen armazenado geraram apenas frutos, e não apresentaram formação de sementes em nenhum dos tratamentos. Crepaldi (1987), em trabalho com biologia floral das variedades de mandioca cultivada cv. Branca de Santa Catarina e cv. Taquri registrou que 14,6 % dos botões florais protegidos formaram frutos e 1,25% formaram sementes, portanto os frutos

iniciavam o desenvolvimento (partenocarpia), sem apresentar formação de sementes.

Devido à ocorrência de partenocarpia no gênero *Manihot*, não é possível calcular com precisão a taxa de pólen viável após o armazenamento, visto que pode ter ocorrido a formação do fruto mesmo sem a germinação do pólen utilizado. Apesar disso, como foi gerado um grande número de frutos, pode-se deduzir que pelo menos parte desses deve ter sido oriundo do cruzamento com o pólen conservado, ainda que não tenha formado sementes. Vale destacar ainda que a taxa de formação de sementes em cruzamentos com mandioca, de maneira geral é baixa, o que deve ocorrer, principalmente pela formação de óvulos anormais (SILVA et al., 2001). Na prática, deve ser realizado um grande número de cruzamentos e com grande quantidade de pólen para garantir a formação de sementes verdadeiras e com boa taxa de germinação.

Neste trabalho foram avaliados segmentos de flores femininas, para se observar o comportamento do pólen quando depositado sobre os estigmas. Foi possível observar a germinação dos grãos de pólen sobre a superfície do estigma, ainda que não muito abundante após 24 horas (figura 2B). No entanto não é possível afirmar que houve penetração na micrópila, já que não foi realizado nenhum estudo histológico da estrutura, assim como fazer qualquer inferência sobre a porcentagem de pólen viável.

O crescimento do tubo polínico sob o estigma mostra que o pólen é viável, e que a baixa formação de sementes precisa ser estudada de forma mais detalhada. Além disso, cruzamentos abertos no campo, realizados pelos insetos, resultam em um número de frutos com sementes maior do que cruzamentos artificiais. Isso sugere que existe alguma lacuna na metodologia utilizada que necessita ser ajustada para obtenção de maior número de sementes após os cruzamentos.

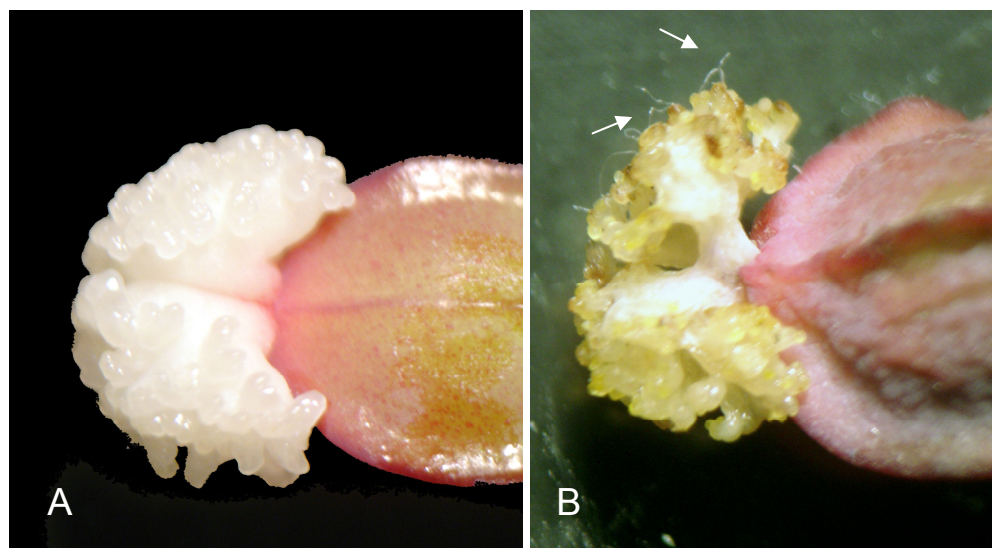


Figura 2. Estigma e parte do ovário de mandioca (A); Estigma com pólen aderido à sua superfície e tubos polínicos (seta) alongando para o exterior (B).

Dessa forma, decidiu-se não considerar o teste *in vivo* como um indicador da viabilidade do pólen, destacando-se a necessidade de uma melhoria na metodologia usada, a fim de torná-la uma ferramenta para a realização de testes de viabilidade *in vivo*.

Já a estimativa da viabilidade do pólen com o uso do corante carmim acético não apresentou grande diferença entre os tratamentos (Tabela 2). A maior viabilidade foi observada na temperatura de -20°C , na qual a porcentagem de grãos de pólen viáveis variou de 79,0 a 87%, e a menor viabilidade, na temperatura de 27°C , na qual a viabilidade foi de 59,0 a 68,8%.

Tabela 2) Viabilidade por teste colorimétrico (%) de pólen armazenado em diferentes temperaturas), com e sem desidratação (CPT e SPT).

Temperatura	3 meses		6 meses	
	SPT	CPT	SPT	CPT
27°C	68,0 aB	59,0 aB	66,8 aA	68,8 aA
4°C	63,0 bB	61,0 bB	74,0 aA	78,0 aA
-20°C	81,0 aA	79,0 aA	87,0 aA	81,0 aA
-80°C	61,0 bB	76,0 aA	62,5 bA	77,0 aA

*Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na linha, ou de uma mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo agrupamento a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Apesar de o corante superestimar a viabilidade do pólen, pôde-se observar em microscópio que após o armazenamento, grãos de pólen apresentaram formato regular, tamanho médio ou grande, e com o protoplasma corado de vermelho, indicando que parte do material armazenado manteve sua integridade.

Pelo teste colorimétrico, o pré-tratamento não implicou em melhores resultados no que concerne à viabilidade do pólen armazenado, nem aos 3 ou 6 meses, com exceção do tratamento de -80°C , onde a dessecação mostrou efeitos benéficos para a manutenção da viabilidade. As mesmas considerações feitas para a formação de frutos, em relação aos teores de água na amostra servem para esse resultado. Os danos que a água pode causar ao tecido aumentam à medida que as temperaturas decrescem, assim como as chances de conservação e manutenção da integridade dos tecidos, aumentam à medida que as medidas de proteção do tecido são mais eficientes.

Em experimento realizado com conservação de pólen de mamona, uma planta da família Euphorbiaceae, como a mandioca, a temperatura que mais favoreceu a conservação da viabilidade polínica foi a de -80°C , e ainda assim, a porcentagem média de viabilidade do pólen foi abaixo de 10% (Vargas, 2006). O único registro acerca de conservação de pólen, não menciona o uso de tratamentos de temperatura, mas o estudo de viabilidade do grão de pólen após 24 horas (54%) e 48 horas (0,9%), deixando claro que a perda de viabilidade na espécie se dá de forma acelerada (LEYTON, 1993).

Para dar seguimento a esse trabalho, novos ensaios de desidratação deverão ser realizados a fim de se testar diferentes teores de umidade nas amostras conservadas. Outros procedimentos, considerando pré-tratamentos usados também para criopreservação, devem ser delineados com a finalidade de proteger mais a integridade do pólen. A interação desses tratamentos com teores adequados de água nas amostras costumam dar bons resultados na conservação de pólen em temperaturas ultra-baixas (GANESHAN et al., 2008), caso específico da criopreservação.

Na tabela 3, se encontram os resultados referentes ao ensaio preliminar realizado com nitrogênio líquido (-196°C). A ausência de equipamento específico para manter o pólen criopreservado por períodos prolongados foi a causa desse tratamento não estar inserido no delineamento estatístico adotado no trabalho.

Tabela 3. Estimativa da viabilidade média (%) de pólen criopreservado por dois métodos diferentes (corante carmim acético e *in vivo*).

Temperatura	Tipo de teste	Tempo de armazenamento	Viabilidade média (%)	Controle (%)
-196°C	Carmim acético	3 horas	66	80
-196°C	<i>In vivo</i>	3 horas	66	70

Para o ensaio preliminar, considerou-se um tempo de armazenamento de 3 horas em nitrogênio líquido, procedendo-se em seguida às polinizações e ao teste colorimétrico. O ultra congelamento de 3 horas, em teoria é suficiente para a paralisação total do metabolismo celular, garantindo, dessa forma, uma conservação de longo prazo (REED, 2008).

Os resultados mostram uma queda de viabilidade no pólen criopreservado, ainda que os valores observados sejam bastante promissores, considerando as vantagens que a criopreservação pode trazer.

Vale destacar que não existem registros na literatura de conservação de pólen de mandioca, usando temperaturas variadas, evidenciando a necessidade de levar adiante e aprofundar o trabalho realizado. Com base nos resultados obtidos, é possível delinear novos experimentos, a fim de realizar os ajustes necessários

CONCLUSÕES

Foi observada germinação do pólen no teste *in vivo*, mas, em virtude da ocorrência de parthenocarpia não foi possível inferir sobre a porcentagem de viabilidade;

Ficou evidente a necessidade de ajustes na metodologia usada para o teste de germinação *in vitro*;

De acordo com os resultados observados com os testes de viabilidade por carmim acético, é possível armazenar pólen do acesso silvestre de mandioca FLA 005-07 e manter sua viabilidade após 6 meses de estocagem nas quatro temperaturas avaliadas neste trabalho;

A melhor temperatura de armazenamento para conservação de pólen do acesso silvestre avaliado nas condições estabelecidas é a de -20°C.

O pré-tratamento favoreceu a manutenção da viabilidade do pólen apenas na temperatura de -80°C .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**. v. 4, p. 238-241, 1979.

ATEHNKENG, J.; ADETIMIRIN, V. O.; NG, S. Y. C. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 14, p. 1324-1329, 2006.

CHAGAS, E. V.; BARBOSA, W.; PIO, K.; DALL'ORTO, F. A. C.; TIZATO, L. H. G.; SOITA, A. CHAGAS, P. C.; FILHO, J. A. S. Germinação in vitro de grãos de pólen de *Prunus persica* (L) Batsch vulgaris. **Bioscience**. Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 8-14. 2009.

CREPALDI, C. I. **Biologia da reprodução em *Manihot* Mill.** 1987. 160f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Campinas. Campinas, 1987.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. *Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.)*. **Ceres**. Rio de Janeiro. n. 55, v. 5, p. 433-438, 2008

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de Pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

ENGELMANN, F.; ARNAO, M. G.; WU, Y.; ESCOBAR, R. The development of Encapsulation Dehydration. B. M. REED (Ed), **Plant Cryopreservation – A practical Guide**. Springer. p. 59-75. 2008.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.**: Implicações para a conservação. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FUKUDA, W. M. G.; SILVA, S. O. **Melhoramento de Mandioca no Brasil**. In: Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americano, 2ª Ed., São Paulo. v. 2, p. 242-57, , 2002

FRANÇA, L. V. **Secagem e conservação de grãos de pólen de berinjela**. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências Agrárias. Brasília, 2008.

GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J. N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit Breeding**. Indiana: Purdne Universitz Press. p. 23-47, 1983.

GANESHAN, S. et al. W. Cryopreservation of pollen. B. M. Reed (ed), **Plant Cryopreservation – A practical Guide**. Springer. p. 443-447. 2008.

GIORDANO, L. B. ARAGÃO, F. A. S., BOITEUX, L. S. **Melhoramento genético do tomateiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 24, n.219, p. 43-57, 2003.

HANNA, W. N. Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. **Crop Science**, v. 34, p. 1681-1682, 1994.

KHAN, M. N.; HEYNE, E. C.; GOSS, A. E. Effect of relative humidity on viability and longevity of wheat pollen. **Crop Science**, v. 11, p.125-127, 1971.

LEYTON, M. **Crioconservacion de polen de yuca**. 1993. (Monografia). Universidade. do Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biologia, Cali, 1993.

LINSKENS, H. F. **Pollen physiology**. **Annual Review Plant Physiology**, v. 14, p. 225-226, 1964.

MBAHE, R. E., AKEN'OVA, M. E. AND HAHN, S. K. Germination of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) pollen. **Acta Horticulturae**. p. 172-177. 1994.

NASSAR, N. M. A.; Selvagens da mandioca, **Manihot** spp.: Biologia e potencialidades para o melhoramento genético. **Genetic and Molecular Biology**. Brasília, vol. 23, n.1, p. 201-212, 2000.

OLIVEIRA, M. S. P; MAUÉS, M. M.; KALUME, M, A. A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasileira**, São Carlos, v. 15, n.1, p 63-67, 2001.

ORREGO, J. I.; HERSHEY, C. H. Almacenamiento del polen de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por medio de liofilizacion y varios regimenenes de humedad y temperatura. **Acta Agronomica**, v. 34, p. 21-24, 1984.

REED, B. M. Cryopreservation – Practical Considerations. B. M. Reed (ed), **Plant Cryopreservation – A practical Guide**. Springer. p. 3-11. 2008.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT user's guide**: statistics, Version 8 ed. SAS Institute, Cary, NC. 2000.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John; Sons, p. 325-440, 1995.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974.

VARGAS, D. P. et al. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de manona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae): conservação e viabilidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p.115-120, 2006.

YOGEESSHA, H. S., NAGARAJA, A., SHARMA, S. P. Pollination studies in hybrid tomato seed production. **Seed Science and Technology**. Zurich, v. 27, p.115-122, 1999.