

COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES CORANTES
NA ESTIMATIVA DA VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN EM ESPÉCIES DOS
GÊNEROS *ERIOSEMA* (DC.) G. DON E *RHYNCHOSIA*
LOUR (LEGUMINOSAE - FABOIDEAE), NATIVAS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF DIFFERENT STAINING ON
THE ESTIMATE OF THE VIABILITY OF POLLEN GRAINS IN THE SPECIES
OF GENUS *ERIOSEMA* (DC.) G. DON AND *RHYNCHOSIA*
LOUR. (LEGUMINOSAE - FABOIDEAE) NATIVE TO SOUTHERN OF BRAZIL

Elaine BIONDO*
Alice BATTISTIN*

RESUMO

Utilizando três diferentes corantes, em espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour. (Faboideae - Leguminosae), nativas na Região Sul do Brasil, este trabalho teve por objetivo estimar a viabilidade dos grãos de pólen e indicar o corante mais eficiente para estas espécies. Botões florais foram coletados nos locais de ocorrência das espécies. Os corantes usados foram carmin propiônico 2%, orceína acética 2% e reativo de Alexander. Foram feitas comparações da porcentagem de viabilidade do pólen, entre os corantes, dentro de cada espécie e entre as espécies em cada gênero. Com exceção de *Eriosema glabrum* as espécies estudadas, nos dois gêneros apresentaram alta viabilidade de grãos de pólen, acima de 90%, em todos os corantes. O corante reativo de Alexander foi o mais eficiente na distinção dos grãos de pólen viáveis e inviáveis, seguindo carmin propiônico, enquanto que orceína acética não é indicada para estas espécies.

Palavras chaves: *Eriosema*, *Rhynchosia*, viabilidade do pólen, corantes.

ABSTRACT

Three different kinds of staining in species of *Eriosema* (DC.) G. Don and *Rhynchosia* Lour. (Faboideae - Leguminosae), native to southern Brazil, were utilized. The purpose of this work was to estimate the fertility of pollen grains and indicate the most efficient staining, for these species. The flowers-buds were collected from their native places. The types of staining used were: 2% acetic orcein, 2% propionic carmine and Alexander reactive. Comparisons between the staining on the viability of the pollen grain in each species, and among every species in the genus, were made. With the exception of *Eriosema glabrum*, the species analyzed in two genus showed a higher viability of pollen grains above 90% in all the staining. Alexander reactive was more efficient in distinguishing the viable and non viable pollen grains, followed by propionic carmine, while acetic orcein was not effective for these species.

Key word: *Eriosema*, *Rhynchosia*, pollen viability, stain.

(*) Laboratório de Citogenética Vegetal e Biotecnologia. Departamento de Biologia - CCNE da Universidade Federal de Santa Maria/Santa Maria RS. CEP 97105-900.
Endereço para correspondência: General João Telles, 453/32. Bairro Bonfim. Porto Alegre/RS CEP 90035-121 - E-mail: pittyzinho@zipmail.com.br

INTRODUÇÃO

Eriosema (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour. são os únicos dois gêneros da subtribo Cajaninae, tribo Phaseoleae, subfamília Faboideae (Leguminosae), que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais de ambos hemisférios (GREAR, 1970, 1978; BURKART, 1987; MIOTTO, 1988).

O gênero *Eriosema* é composto de 72 espécies distribuídas na África e Austrália e 38 na América tropical, ocorrendo em maior abundância na África (BURKART, 1952; GREAR, 1970). Nos estados da região sul do Brasil foram encontradas onze espécies (GREAR, 1970). MIOTTO (1988) citou cinco espécies para o Rio Grande do Sul.

O gênero *Rhynchosia* compreende aproximadamente 200 espécies na África e 52 espécies na América, ocorrendo desde os Estados Unidos até a Argentina (GREAR, 1978; BURKART, 1987). Na região sul do Brasil foram identificadas quatorze espécies deste gênero (GREAR, 1978), e para o Rio Grande do Sul são citadas nove espécies (MIOTTO, 1988).

As espécies dos dois gêneros são componentes da fisionomia dos campos gaúchos, podendo algumas apresentar bom potencial forrageiro (GIRARDI-DEIRO *et al.* 1992). Algumas espécies são utilizadas como medicinais, como é o caso de *Rhynchosia edulis* utilizada no Paraguai para curar resfriados, bronquites e como expectorante (BASUALDO *et al.*, 1995) e *Rhynchosia cana* (Willd.) D.C. com propriedades antiinflamatórias e antipiréticas (VIMALA *et al.*, 1997). MORRIS (1997)

fez referência a um fitoquímico, prodelfinidin, extraído do “feijão de bico” (*Rhynchosia minima* (Linn.) de Candole), que é utilizado como antibiótico.

A qualidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo das plantas, pois além de refletir a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos e, na agricultura para o planejamento de algum tipo de programa de melhoramento (ALEXANDER, 1980; ARROYO, 1981; GUINET & FERGUSON, 1989). Uma das maneiras de medir a viabilidade do pólen, é pela coloração citoquímica dos grãos (HESLOP-HARRISON, 1992; MENDES, 1994).

Este trabalho objetivou estimar a viabilidade do pólen e indicar qual o corante mais eficiente na estimativa da viabilidade, em seis espécies do gênero *Eriosema* e cinco espécies do gênero *Rhynchosia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1 estão registradas as espécies dos gêneros *Eriosema* e *Rhynchosia*, utilizadas neste trabalho.

Os botões florais foram coletados e fixados em etanol e ácido acético (3:1), por um período de 24h em temperatura de aproximadamente 2°C. Após transferidos para álcool 70% mantidos em geladeira para posterior análise. Na preparação das lâminas utilizaram-se dez botões florais maduros, em cada espécie, escolhidos ao acaso. No esmagamento das anteras, os corantes utilizados foramorceína acética 2%, carmim propiônico

Tabela 1. Espécies, locais de coleta (L.C.), número do registro no Herbário (R.G.) do Departamento de Biologia do CCNE - UFSM (SMDB) de seis espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don e cinco espécies do gênero *Rhynchosia* Lour. nativas nestes estados.

Espécies	L. C.	R. G.
<i>Eriosema glabrum</i> Mart. ex Benth.	Porto Amazonas/PR	6816
<i>Eriosema heterophyllum</i> Benth.	Ponta Grossa/PR	6815
<i>Eriosema campestre</i> Benth. var. <i>campestre</i>	Palmeira/PR	6819
<i>Eriosema rufum</i> (H.B.K.) G. Don var. <i>macrophyllum</i>	Santa Maria/RS	6813
<i>Eriosema crinitum</i> (H.B.K.) G. Don var. <i>macrophyllum</i>	Porto Amazonas/PR	*
<i>Eriosema tacuarembense</i> Arech.	Santa Maria/RS	6808
<i>Rhynchosia corylifolia</i> Mart. ex Benth.	Palmeira/PR	6823
<i>Rhynchosia diversifolia</i> M. Mich. Var. <i>diversifolia</i>	Pantano Grande/RS	*
<i>Rhynchosia lineata</i> Benth.	Boqueirão do Butiá/RS	6825
<i>Rhynchosia senna</i> Gill. Ex Hook var. <i>senna</i>	Pantano Grande/RS	*
<i>Rhynchosia edulis</i> Griseb.	Santa Maria/RS	6812

(*) espécies sem registro no herbário SMDB.

2% e o reativo de Alexander (verde malaquita + fuccina ácida) ALEXANDER (1980).

Contou-se um número de grãos de pólen aproximadamente igual para cada corante, sendo que o número para cada espécie dependeu da quantidade de material. As espécies *Rhynchosia corylifolia*, *Rhynchosia senna* var. *senna* e *Rhynchosia lineata* apresentaram quantidades de grãos de pólen inferiores as demais espécies analisadas. Foram feitas comparações da porcentagem de viabilidade do pólen entre os três corantes para cada espécie e comparações da porcentagem de viabilidade total entre as espécies dentro de cada gênero, utilizando-se o Teste do χ^2 com $P < 0,05$, feitos através do programa estatístico SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 2 e 3 encontram-se os resultados da comparação das estimativas da viabilidade de grãos de pólen com 3 diferentes corantes em cada espécie dos gêneros *Eriosema* e *Rhynchosia*. Nas Tabelas 4 e 5 estão os resultados da comparação de médias da estimativa total (%) da viabilidade do pólen entre as seis espécies de *Eriosema* e cinco espécies de *Rhynchosia*.

As espécies *Eriosema crinitum* var. *macrophyllum* e *Eriosema rufum* var. *macrostachyum* (Tabela 2) não demonstraram diferenças significativas nas porcentagens de viabilidade do pólen nos três corantes. Nas espécies *Eriosema heterophyllum* e *Eriosema glabrum* as porcentagens diferiram significativamente nos três corantes. Enquanto que em *Eriosema tacuareboense* a porcentagem de viabilidade diferiu apenas com o corante carmim propiônico e em *Eriosema campestre* var. *campestre* a porcentagem diferiu com o corante orceína acética. Todas as espécies do gênero *Rhynchosia* (Tabela 3), mostraram diferenças significativas nas porcentagens, entre os três corantes.

As espécies *Eriosema tacuareboense*, *Eriosema crinitum* var. *macrophyllum* e *Eriosema rufum* var. *macrostachyum* apresentaram as mais altas porcentagens (99,61%), não diferindo nas médias, porém diferiam das espécies *Eriosema campestre* var. *campestre*, *Eriosema heterophyllum* e *Eriosema glabrum*. Nesta última a média foi altamente significativa quando comparada com as demais, com apenas 47,09% (Tabela 4). Entre as espécies de gênero *Rhynchosia* a que se destacou das demais foi *Rhynchosia edulis* com 99% de viabilidade, seguindo *Rhynchosia diversifolia*, *Rhynchosia lineata* e *Rhynchosia senna* var. *senna*

com médias semelhantes e a menor média foi encontrada em *Rhynchosia corylifolia* com 94,21 (Tabela 5).

Pela análise dos resultados, o corante orceína acética 2% foi o que apresentou maior porcentagem de viabilidade para todas as espécies nos dois gêneros. O corante orceína acética 2% não permitiu distinguir perfeitamente grãos de pólen viáveis e inviáveis, pois corou ambos com a mesma intensidade. Neste trabalho a orceína acética 2% superestimou a viabilidade dos grãos de pólen em todas as espécies estudadas. Em *Eriosema glabrum* isto foi claramente observado, pois a viabilidade de grãos de pólen com orceína acética 2% foi de 99,57%, sendo encontrados valores significativamente mais baixos com os outros dois corantes, 27,16% com reativo de alexander e 14,57% com carmim propiônico (Tabela 2).

Carmim propiônico 2% e reativo de Alexander são corantes que permitem distinguir com bastante clareza grãos de pólen viáveis de inviáveis. O carmim propiônico corou grãos de pólen viáveis com uma coloração mais forte e os inviáveis com coloração mais fraca ou não corou. O reativo de alexander cora diferentemente o protoplasma da parede celular. Grãos de pólen viáveis apresentam protoplasma inteiro corado de púrpura e a parede celular corada de verde, enquanto que grãos de pólen inviáveis são observados com protoplasma reduzido ou ausente, e a parede celular verde.

Nas espécies estudadas em ambos gêneros, o corante reativo de alexander pode ser considerado o mais eficiente na estimativa da viabilidade do pólen, seguindo-se carmim propiônico, enquanto que o corante orceína acética não é indicado para estas espécies.

Com exceção de *Eriosema glabrum*, as espécies dos dois gêneros apresentaram alta porcentagem de viabilidade de pólen numa amplitude de variação de 94,21 a 99,61%. Alta viabilidade do pólen foi observado também em outras leguminosas como é o caso de espécies de *Lathyrus* L. (BIONDO *et al.*, 1995), *Adesmia* DC. (COELHO & BATTISTIN, 1998), *Stylosanthes* Swartz. (MATTOS *et al.*, 1998).

A porcentagem de grãos de pólen viáveis nas espécies dos dois gêneros foi superior a 94%, demonstrando alto potencial de fertilidade dos gametas masculinos, com exceção de *Eriosema glabrum*, que apresentou valor muito inferior as demais espécies, sugerindo que estudos mais aprofundados sejam realizados neste sentido.

Sugere-se que *Eriosema glabrum* apresenta alta inviabilidade de grãos de pólen por apresentar um mecanismo em que os grãos de pólen são inviabilizados

Tabela 2. Comparação das estimativas (%) da viabilidade de grãos de pólen utilizando-se três diferentes corantes em seis espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don.

Espécies	Orceína acética 2%		Reativo de Alexander		Carmim propiônico 2%	
	Número de grãos de pólen contados	% Viabilidade	Número de grãos de pólen contados	% Viabilidade	Número de grãos de pólen contados	% Viabilidade
<i>Eriosema campestre</i> var. <i>campestre</i>	3.440	99,83 ^a	3.438	96,25 ^b	3.438	95,32 ^b
<i>Eriosema tacuarembense</i>	3.178	99,40 ^a	3.184	99,25 ^a	3.180	98,71 ^b
<i>Eriosema glabrum</i>	3.909	99,57 ^a	3.910	27,16 ^b	3.912	14,57 ^c
<i>Eriosema heterophyllum</i>	3.728	99,11 ^a	3.729	97,85 ^b	3.731	94,93 ^c
<i>Eriosema crinitum</i> var. <i>macrophyllum</i>	3.155	99,75 ^a	3.158	99,49 ^a	3.160	99,59 ^a
<i>Eriosema rufum</i> var. <i>macrostachyum</i>	3.135	99,62 ^a	3.135	99,55 ^a	3.136	99,65 ^a

a, b, c = Nas linhas, as porcentagens seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo Teste χ^2 ($P < 0,05$).

Tabela 3. Comparação das estimativas (%) da viabilidade de grãos de pólen utilizando-se três diferentes corantes em cinco espécies do gênero *Rhynchosia* Lour.

Espécies	Orceína acética 2%		Reativo de Alexander		Carmim propiônico 2%	
	Número de grãos de pólen contados	% Viabilidade	Número de grãos de pólen contados	% Viabilidade	Número de grãos de pólen contados	% Viabilidade
<i>Rhynchosia corylifolia</i>	2.579	98,68 ^a	2.742	93,76 ^b	2.564	90,61 ^c
<i>Rhynchosia diversifolia</i> var. <i>diversifolia</i>	3.574	99,02 ^a	3.565	97,37 ^c	3.572	97,37 ^b
<i>Rhynchosia lineata</i>	2.556	99,73 ^a	2.570	96,26 ^b	2.558	93,00 ^c
<i>Rhynchosia edulis</i>	3.278	100,00 ^a	3.490	99,51 ^b	3.493	97,54 ^c
<i>Rhynchosia senna</i> var. <i>senna</i>	2.404	100,00 ^a	2.185	95,97 ^b	2.407	92,15 ^c

a, b, c = Nas linhas, as porcentagens seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo Teste χ^2 ($P < 0,05$).

logo após a deiscência da antera, em consequência do tempo da abertura, influenciada pela temperatura e condições climáticas. Este fato foi demonstrado por PACINI *et al.* (1997), em algumas espécies de angiospermas, incluindo a leguminosa *Spartium junceum* L, quando relacionaram a viabilidade dos grãos de pólen com tipos de polinização. Todas as espécies analisadas pelos autores citados, demonstraram que a viabilidade do pólen decresceu com o aumento do tempo de deiscência da antera. Na espécie *Spartium junceum* apenas 20% dos grãos de pólen mantiveram-se vivos após 72 horas da abertura da antera.

Apesar de apresentar um grande número de grãos de pólen inviáveis, *Eriosema glabrum* é uma espécie que não apresenta problemas reprodutivos, pois todo o

pólen viável é aproveitado como forma de otimização da energia que é alocada no mesmo. A deficiência constatada neste trabalho, não influenciou a perpetuação dos indivíduos desta espécie, que provavelmente, desenvolveram estratégias durante o processo evolutivo para contornar este problema.

Juntamente com os métodos de coloração que são relativamente rápidos e baratos, outros métodos são necessários para avaliar a viabilidade do pólen como germinação dos grãos de pólen “in vitro”, testes com a semente e o conjunto de sementes, cultura de anteras entre outros.

A grande produção de grãos de pólen observada durante os estudos realizados, indicam que estas espécies alocam uma grande quantidade de energia na produção

Tabela 4. Comparação de médias da estimativa total (%) da viabilidade de grãos de pólen entre seis espécies do gênero *Eriosema* (DC.) G. Don pelo uso de diferentes métodos de coloração.

Espécies	Número total de grãos de pólen analisados	% Viabilidade total
<i>Eriosema campestre</i> var. <i>campestre</i>	10.316	97,13 ^b
<i>Eriosema tacuarembense</i>	9.542	99,12 ^a
<i>Eriosema glabrum</i>	11.731	47,09 ^c
<i>Eriosema heterophyllum</i>	11.188	97,30 ^b
<i>Eriosema crinitum</i> var. <i>macrophyllum</i>	9.473	99,61 ^a
<i>Eriosema rufum</i> var. <i>macrostachyum</i>	9.406	99,61 ^a

N = 61.656

a, b, c = Na coluna, as porcentagens seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste χ^2 ($P < 0,05$).

N = Número total de grãos de pólen analisados em todas as espécies.

$\chi^2 = 25110,142$ $P < 0,0001$.

Tabela 5. Comparação de médias da estimativa total (%) da viabilidade de grãos de pólen entre cinco espécies do gênero *Rhynchosia* Lour. pelo uso de diferentes métodos de coloração.

Espécies	Número total de grãos de pólen analisados	% Viabilidade total
<i>Rhynchosia corylifolia</i>	8.185	94,21 ^c
<i>Rhynchosia diversifolia</i> var. <i>diversifolia</i>	10.711	96,72 ^b
<i>Rhynchosia lineata</i>	7.684	96,33 ^c
<i>Rhynchosia edulis</i>	10.261	99,00 ^a
<i>Rhynchosia senna</i> var. <i>senna</i>	6.996	96,04 ^b

N = 43.837

a, b, c = Na coluna, as porcentagens seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo Teste χ^2 ($P < 0,05$).

N = Número total de grãos de pólen analisados em todas as espécies.

$\chi^2 = 496,025$ $P < 0,0001$.

de gametas masculinos, concordando com PIANKA (1970), BEGON *et al.* (1996), STILING (1998) que classificaram, juntamente com outras características, este tipo de vegetais como estrategistas *r*. Este aumento na capacidade reprodutiva pode estar relacionado com a grande destruição do hábitat destas espécies, o qual foi constatado durante o período de coleta.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José Henrique Silva, pelas sugestões e colaboração na análise estatística. À Dra. Sílvia T. S. Miotto pela possibilidade de coleta do material e identificação das espécies. Ao CNPq pela bolsa recebida e FAPERGS pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M. P. A. 1980. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology** 5 (1): 13-18.
- ARROYO, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: POLHILL, R. M. & RAVEN, P. H. (eds.). **Advances in Legumes Systematics** 2: 723-769.
- BASSUALDO, I.; ZARDINI, E. M.; ORTIZ, M. 1995. Medicinal plants of Paraguai: underground organs, II. **Economic Botany** 49 (4): 387-394.
- BEGON, M.; HARPER, J. L.; TOWNSEND, C. R. 1996. **Ecology: individuals, population and communities**. Oxford: Blackwell Science. 3ª eds. 1068p.
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A.; FLORES, R.; GOMES, F. R. 1995. Análise dos fenômenos biológicos: floração, maturação de sementes e viabilidade do pólen em *Lathyrus pubescens* e *Lathyrus nervosus*. In: **II Jornada Integrada de Pesquisa, Extensão e Ensino**, Universidade Federal de Santa Maria- RS. p. 194
- BURKART, A. 1952. **Las leguminosas argentinas silvestres e cultivadas**. 2. ed. Buenos Aires: ACME Agency. p. 394-396.
- BURKART, A. 1987. Leguminosae. In: BURKART, N. S. T. de & BACIGALUPO, N. M. **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. 6 (3): 695-704.
- COELHO, L. G. M.; BATTISTIN, A. 1998. Meiotic behavior of *Adesmia* DC. (Leguminosae - Faboideae) species native to Rio Grande do Sul, Brazil. **Genetics and Molecular Biology** 21 (3): 403-406.
- GIRARDI-DEIRO, A. M.; GONÇALVES, J. O. N.; GONZAGA, S. S. 1992. Natural grasslands associated to the different soils in the country of Bage, Rio Grande do Sul: 2. Physionomy and floristical composition. **Iheringia Série Botânica** 0 (42): 55-79.
- GREAR, J. W. 1970. A Revision of the American Species of *Eriosema* (Leguminosae-Lotoideae). **Mem. N. Y. Bot. Gard.**, 20 (3): 1-98.
- GREAR, J. W. 1978. A Revision of the New World Species *Rhynchosia* (Leguminosae - Faboideae). **Mem. N. Y. Bot. Gard.**, 31 (1): 10168.
- GUINET, P.; FERGUSON, I. K. 1989. Structure, evolution and biology of pollen in Leguminosae. In: C. H. STIRTON & J. L. ZARUCCHI (eds.) **Advances in Legumes Biology** 29: 77-103.
- HESLOP-HARRISON, J. S. 1992. Cytological techniques to assess pollen quality. In: CRESTI, M.; TIEZZI, A. **Sexual Plant Reproduction**. Itália: Spring Verlag. p. 41-48.
- MATTOS, A. C. F.; BATTISTIN, A.; BIONDO, E. 1998. Comportamento meiótico e estimativa da viabilidade de grãos de pólen em 10 genótipos de 3 espécies do gênero *Stylosanthes* Sw. nativas do Sul do Brasil. **Genetics and Molecular Biology** 21(3) (supplement) p. 194.
- MENDES, M. S. 1994. **Viabilidade de grãos de pólen em *Solanum* spp.** Mestrado em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, 75p.
- MIOTTO, S. T. S. 1988. Leguminosae - Faboideae. Tribo Phaseoleae - Subtribo Cajaninae. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. In: **Boletim do Instituto de Biociências**. Porto Alegre. n.43. p. 1-88.
- MORRIS, J. B. 1997. Special - purpose legume genetic reserch conserved for agricultural, industrial and pharmaceutical use. **Economic Botany** 51(3): 251-263.
- PACINI, E.; FRANCHI, G. G.; LISCI, M.; NEPI, M. 1997. Pollen viability related type of pollination in six Angiosperma species. **Annals of Botany** 80: 83-87.
- PIANKA, E. R. 1970. On r- and k- selection. **American Naturalis** 104: 592-597.
- STILING, P. 1998. **Ecology: theories and applications**. Prentice-Hall. 3ª ed. 638p.
- VIMALA, R.; NAGARAJAN, S.; ALAM, M.; SUSAN, T.; JOY, S. 1997. Antiinflammatory and antipiretic activity of *Michelia champaca* Linn., (white variety), *Ixira brachiata* Roxb. and *Rhynchosia cana* (Willd.) DC. flower extract. **Indian Journal of Experimental Biology** 35: 1310-1314.