

Comportamento meiótico e estimativa da viabilidade polínica de acessos de *Sambucus australis* (ADOXACEAE)

Marília Tedesco^{1*}, Andrielle Wouters Kuhn², Viviane Dal-Souto Frescura³, Solange Bosio Tedesco², Antonio Carlos Ferreira da Silva²

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. ²Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Biologia, Av. Roraima, 1000, Prédio 16, Cidade Universitária, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil; ³Universidade Federal de Santa Maria, campus Cachoeira do Sul, Coordenadoria Acadêmica, Av. Presidente Vargas, 1958, Bairro Santo Antônio, Cachoeira do Sul, RS, Brasil. *Autor para correspondência: marília_tedesco@hotmail.com.

RESUMO: *Sambucus australis*, conhecida popularmente como sabugueiro, é uma planta utilizada na medicina alternativa por suas ações diaforética, anti-inflamatória e analgésica. Para potencializar a utilização desta espécie medicinal nativa e também fornecer a caracterização citogenética que auxilie, posteriormente, programas de preservação e melhoramento genético, o objetivo deste estudo foi caracterizar o comportamento meiótico, bem como estimar a viabilidade polínica de diferentes acessos de *S. australis* do Rio Grande do Sul através de distintos corantes. Para isso, os botões florais de 15 acessos foram coletados, fixados em etanol:ácido acético (3:1) e conservados em etanol 70% até o uso. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento das anteras. Para a análise meiótica foi utilizado o corante orceína acética 2%, sendo analisadas todas as fases e determinado o índice meiótico. Para a estimativa da viabilidade polínica foram utilizados três corantes: reativo de Alexander, orceína acética 2% e carmim acético 2%. Os dados foram analisados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Nos 12 acessos analisados a meiose foi regular, apresentando associações cromossômicas preferencialmente em bivalentes, encontrando-se $n = 19$ e os valores de índice meiótico foram superiores a 90%. Quanto à viabilidade polínica, a maioria dos acessos apresentou uma alta porcentagem de polens viáveis (acima de 75%), exceto o acesso ERE01 (44%). Na comparação entre os corantes, o reativo de Alexander foi considerado o mais indicado para estimar a viabilidade polínica da espécie. Assim, pode-se concluir que os acessos de *S. australis* estudados possuem comportamento meiótico regular, número gamético $n = 19$ cromossomos, altos valores de índice meiótico e alta porcentagem de polens viáveis.

Palavras-chave: sabugueiro, citogenética, meiose, grãos de pólen, corantes.

ABSTRACT: Meiotic behavior and estimative pollen viability of accesses of *Sambucus australis* (ADOXACEAE). *Sambucus australis*, popularly known as “sabugueiro”, is a plant used in alternative medicine for its diaphoretic, anti-inflammatory and analgesic actions. To encourage the use of this medicinal species native and also enable cytogenetic characterization to assist subsequently preservation programs and genetic improvement, the objective of this study was to characterize the meiotic behavior and to estimate the pollen viability of different accesses of *S. australis* from Rio Grande do Sul by different stains. To this end, the floral buds of 15 accesses were collected, fixed in ethanol:acetic acid (3:1) and stored in 70% ethanol until use. Slides were prepared using the squashing technique of the anthers. For meiotic analysis, 2% acetic-orcein staining was used, where all phases were analyzed and the meiotic index determined. Three stains were used to estimate pollen viability: Alexander’s reaction, 2% acetic-orcein, and 2% acetic-carmin. Data were analyzed by the Scott-Knott test at 5% significance level. In the 12 accesses analyzed, meiosis was regular, exhibiting chromosome associations preferably in bivalents, finding $n = 19$ while meiotic index values exceeded 90%. Regarding pollen viability, the majority of the accesses had a high percentage of viable pollens (over 75%), except for the ERE01 access (44%). On the staining comparison, Alexander’s reaction proved the most suitable method for estimating the pollen viability of the specie. Therefore, it can be concluded that the accesses of *S. australis* studied exhibited regular meiotic behavior, gametic number $n = 19$ chromosomes, high meiotic index values and a high percentage of viable pollens.

Key words: sabugueiro, cytogenetic, meiosis, pollen grains, stains.

Recebido para publicação em 05/04/2017

Aceito para publicação em 12/08/2021

Data de publicação em 28/10/2021

ISSN 1983-084X

© 2019 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como sabugueiro, sabugueiro-do-rio-grande e sabugueiro-do-brasil (Nunes et al. 2007), *Sambucus australis* Cham. & Schtdl. é uma planta nativa do Brasil, ocorrendo da Região Sudeste até o Rio Grande do Sul e no Paraguai, Argentina e Uruguai (Bacigalupo 1974; Reitz 1985). Essa planta é utilizada na medicina alternativa para o tratamento sintomático de moléstias eruptivas, gripes e resfriados e, também, por suas ações diaforética, anti-inflamatória e analgésica (Jorge et al. 1999).

O conhecimento dos recursos genéticos associados às plantas medicinais tem assumido uma importância estratégica, já que o sistema de saúde deficitário e a baixa renda da população, juntamente com a sabedoria acumulada pelas comunidades, faz com que grande parte da população utilize as plantas medicinais como fonte de terapia (Scheffer et al. 2009).

Portanto, devido à importância desse conhecimento e também ao fato de possuírem um grande potencial econômico, as espécies medicinais nativas do Brasil são consideradas uma riqueza a ser preservada e utilizada, tornando-se necessário conservar a diversidade genética vegetal disponível. Assim, os estudos de caracterização de germoplasma são indispensáveis para potencializar a utilização dos recursos medicinais nativos e também para possibilitar que essas espécies sejam incluídas, posteriormente, em um programa de melhoramento genético (Pereira 2006).

Entre esses estudos, a caracterização citogenética consiste em uma ferramenta eficiente no melhoramento e evolução de plantas, pois, ao mesmo tempo em que permite obter informações sobre o material genético, ajuda no fornecimento de métodos para manipulá-lo (Sybenga 1998).

Os estudos citogenéticos podem envolver a análise da meiose e da viabilidade polínica. A primeira apresenta relevância, já que é durante a meiose que ocorre a recombinação gênica, a mesma é considerada uma fonte de variabilidade genética que os indivíduos possuem para se adaptar ao meio ambiente em que vivem e, assim, garantir a sua perpetuação por meio da descendência (Singh 1993; Nassar & Freitas 1997; Pagliarini 2000). A viabilidade do pólen também é uma característica muito importante no estudo das plantas, pois evidencia a potencialidade reprodutora do gameta masculino de uma espécie e contribui em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos, fornecendo informações necessárias para a aplicação prática na conservação genética, na agricultura e para o planejamento de algum tipo de melhoramento (Arroyo 1981; Guinet 1989).

Baseado nesse contexto e também devido à inexistência de estudos que informem a respeito do comportamento meiótico e viabilidade polínica de *S. australis*, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente diferentes acessos dessa espécie, coletados no Rio Grande do Sul – Brasil, com base na análise da meiose e estimativa da viabilidade dos grãos de pólen através de distintos corantes.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade (LABCITOGEN), do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

O material botânico utilizado compreendeu botões florais de 15 acessos de *S. australis* coletados em sete municípios do Estado do Rio Grande do Sul, entre os meses de setembro e novembro de 2013, dos quais, dependendo da fase de desenvolvimento do botão, foram analisadas as fases da meiose e/ou a viabilidade dos grãos de pólen (Tabela 1). Os botões florais mais jovens de até 3 mm foram utilizados para o estudo do comportamento meiótico e os demais, para análise da viabilidade polínica. O material testemunho foi incorporado ao Herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDB) da UFSM (Tabela 1).

Para análise da meiose e estimativa da viabilidade polínica, os botões florais coletados em diversos estádios de desenvolvimento foram fixados em Carnoy modificado 3:1 (etanol:ácido acético) durante 24 h, à temperatura ambiente. Posteriormente, os botões foram transferidos para etanol 70% sob refrigeração até sua utilização. Para o preparo das lâminas, foi usada a técnica de esmagamento das anteras (Guerra & Souza 2002). Ressalta-se que, apesar das flores apresentarem estames com filetes curtos e longos (pistiladas e estaminadas), a escolha dos botões florais foi realizada aleatoriamente.

Para a análise meiótica (12 acessos, Tabela 1), a coloração das anteras foi realizada comorceína acética 2%. Foram analisadas em média seis lâminas por acesso, que possuíam o maior número de células em cada uma das fases da divisão meiótica.

Todas as fases da meiose foram analisadas, mas foi dada ênfase especial às associações cromossômicas em diacinese e a segregação dos cromossomos nas anáfases e telófases I e II. Em diacinese foram registradas as associações cromossômicas, considerando a ocorrência de bivalentes, trivalentes e tetravalentes. As células que apresentaram todos os seus cromossomos

TABELA 1. Acessos de *Sambucus australis*, locais de coleta, número de registro no Herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDDB) e tipo de análise realizada com cada acesso (comportamento meiótico/viabilidade polínica).

| Acesso | Localização | Número de registro | Comportamento meiótico | Viabilidade polínica |
|--------|-----------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| ERE01 | Erechim – RS | 15.421 | | X |
| SM02 | Santa Maria – RS | 15.422 | X | X |
| SM04 | Santa Maria – RS | 15.424 | X | X |
| SM05 | Santa Maria – RS | 15.425 | X | X |
| SM06 | Santa Maria – RS | 15.426 | X | X |
| CRA07 | Cruz Alta – RS | 15.427 | | X |
| CRA08 | Cruz Alta – RS | 15.428 | X | |
| FOR09 | Formigueiro – RS | 15.429 | X | X |
| TUP10 | Tupanciretã – RS | 15.430 | X | X |
| TUP11 | Tupanciretã – RS | 15.431 | X | X |
| SIL13 | Silveira Martins – RS | 15.433 | X | X |
| SIL14 | Silveira Martins – RS | 15.434 | X | X |
| SIL15 | Silveira Martins – RS | 15.435 | X | X |
| ITA16 | Itaara – RS | 15.436 | X | X |
| CRA17 | Cruz Alta – RS | 15.437 | | X |

em associações bivalentes foram consideradas como normais ou de comportamento regular. Para determinação do número cromossômico gamético (n) observou-se de cinco a 20 células em diacinese (com bom espalhamento dos cromossomos) por acesso. Também foram registradas as células que apresentaram cromossomos retardatários, pontes ou disjunção irregular.

O número de tétrades foi registrado e calculado o índice meiótico (Love 1949), em que: IM (índice meiótico) é igual ao número de tétrades de pólen normais dividido pelo número total de tétrades observado multiplicado por 100. O cálculo foi realizado a partir de um número variável de tétrades por acesso. As tétrades normais foram aquelas que apresentaram quatro células, ao passo que as anormais diferiram desse número.

Para realizar a estimativa da viabilidade polínica (14 acessos, Tabela 1), as lâminas foram preparadas também pela metodologia de esmagamento das anteras, porém, para a coloração, foram utilizados três corantes: orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. Ao utilizar os corantes orceína acética 2% e carmim acético 2%, os pólenes corados foram considerados

viáveis e, os não corados, ou corados fracamente, inviáveis. Já com o corante reativo de Alexander, as lâminas foram analisadas 24 h após o preparo e foram considerados viáveis os grãos de pólen de cor púrpura e inviáveis os azuis-esverdeados. Além disso, os grãos de pólen diminutos foram considerados inviáveis para todos os corantes. Foram confeccionadas duas lâminas por acesso e corante, onde foi realizada a contagem de 600 grãos de pólen (300 em cada lâmina). A viabilidade do pólen foi estimada através da porcentagem de grãos viáveis, dividindo-se o número de grãos viáveis pelo total de grãos contados multiplicados por 100.

Os dados referentes à análise meiótica e à viabilidade polínica foram comparados através do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa Assisat® versão beta 7.7 (Silva e Azevedo 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise meiótica

Os resultados obtidos das análises nas fases da meiose estão registrados na Tabela 2. Nos 12 acessos de *S. australis*, tanto na meiose I como na

meiose II, a amplitude de variação da porcentagem de células anormais ficou contida entre 0,46% a 3,28%, não havendo diferença estatística entre os acessos (Tabela 2). Desta forma, o comportamento meiótico foi considerado regular durante a meiose I e II para todos os acessos (Tabela 2, Figuras 1A a 1I). No entanto, algumas irregularidades foram observadas, tais como a presença de díades, tríades (Figura 2I), cromossomos retardatários em metáfases (Figuras 2B e 2C), pontes em anáfase I (Figura 2D), telófase I (Figura 2E) e anáfase II (Figura 2F), não disjunção na anáfase II (Figura 2G) e telófase II com fuso multipolar e micronúcleo (Figura 2H).

As células em diacinese e/ou metáfase I apresentaram frequentemente sobreposições e/ou aderências nos cromossomos, o que dificultou a interpretação das associações cromossômicas. Por isso, foram analisadas somente as células em diacinese e/ou metáfase I que não apresentaram sobreposição nos cromossomos. Nas células consideradas regulares, foi possível determinar a presença de 19 cromossomos em bivalentes

(Figura 1A e 1B), enquanto nas células irregulares observaram-se associações maiores que bivalentes, que poderiam ser trivalentes e/ou tetravalentes (Figura 2A) e univalentes.

Através da análise da meiose foi possível determinar o número gamético $n = 19$, sugerindo-se que o número somático de *S. australis* seja $2n = 38$ cromossomos. Na literatura há um único relato sobre contagem cromossômica para *S. australis*, onde $2n = 37$ (Goldblatt 1996), diferindo do que foi sugerido no presente trabalho. Porém, para outras espécies do gênero *Sambucus* L., como *S. caerulea* Raf., *S. callicarpa* Greene, *S. melanocarpa* A. Gray e *S. sachalinensis* Pojark., o número somático $2n = 38$ foi confirmado (Goldblatt 1996).

Esse estudo possibilitou, pela primeira vez, realizar a determinação do número de cromossomos através de células gaméticas de *S. australis* em acessos do Rio Grande do Sul (RS). Olkoski et al. (2008) também utilizaram células gaméticas para determinar o número de cromossomos de três espécies medicinais nativas do Rio Grande do Sul. Os autores encontraram n

TABELA 2. Comportamento meiótico, índice meiótico (IM) e porcentagem de células anormais em 12 acessos de *Sambucus australis*.

| Acesso | NCA | Prófase I | | | | Metáf. I | | Anáf. I | | Telóf. I | | Próf. II | | Metáf. II | | Anáf. II | | Telóf. II | | Tétrades | Tétrades Anormais | | IM (%) | %CA |
|--------|-----|-----------|---|-----------|----|----------|----|---------|---|----------|---|----------|---|-----------|---|----------|---|-----------|---|----------|-------------------|-------|--------|-------------------|
| | | Leptóteno | | Diacinese | | N | A | N | A | N | A | N | A | N | A | N | A | N | A | | Dia. | Triá. | | |
| SM02 | 367 | 156 | - | 07 | 3 | 12 | 5 | - | 1 | - | - | 13 | - | - | - | - | - | 169 | 1 | - | - | - | - | 2,78 ^a |
| SM04 | 601 | 320 | 1 | 10 | 6 | 3 | 2 | - | 1 | 14 | - | 21 | - | 10 | - | 4 | - | 129 | - | 80 | - | - | 100 | 1,85 ^a |
| SM05 | 481 | 125 | - | 05 | 3 | 5 | - | - | - | 9 | - | 50 | 1 | 19 | - | 7 | - | 232 | - | 25 | - | - | 100 | 0,56 ^a |
| SM06 | 482 | 170 | - | 07 | 4 | 56 | 3 | - | - | 38 | 1 | 24 | - | 8 | - | 20 | - | 76 | - | 75 | - | - | 100 | 1,86 ^a |
| CRA08 | 369 | 278 | - | 09 | 2 | 36 | - | - | - | 17 | - | 4 | - | - | - | - | - | 23 | - | - | - | - | - | 0,46 ^a |
| FOR09 | 612 | 375 | - | 12 | 3 | - | - | - | - | - | - | 6 | - | 15 | - | - | - | 100 | - | 92 | 3 | 6 | 91,1 | 1,91 ^a |
| TUP10 | 844 | 360 | - | 17 | 5 | 75 | 2 | 3 | 2 | 13 | - | 120 | 2 | 23 | - | 7 | - | 96 | - | 115 | - | 4 | 96,6 | 1,67 ^a |
| TUP11 | 668 | 508 | - | 06 | 2 | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 123 | - | 4 | 96,8 | 0,93 ^a |
| SIL13 | 724 | 418 | - | 16 | 5 | 80 | 15 | - | - | 55 | - | 75 | - | - | - | - | - | - | - | 60 | - | - | 100 | 2,88 ^a |
| SIL14 | 342 | 25 | - | 19 | 7 | 30 | - | 1 | - | 17 | 1 | 28 | - | 6 | - | 8 | 1 | 181 | - | 18 | - | - | 100 | 2,22 ^a |
| SIL15 | 574 | 60 | - | 20 | 10 | 126 | 5 | - | 1 | 43 | - | 141 | - | 23 | - | 9 | 1 | 71 | - | 60 | - | 4 | 93,7 | 3,28 ^a |
| ITA16 | 594 | 174 | - | 20 | 9 | 6 | - | 2 | - | 14 | 1 | 65 | - | 24 | 1 | 18 | 3 | 175 | - | 80 | - | 2 | 97,6 | 2,65 ^a |

*Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. NCA: número de células analisadas; IM: índice meiótico; %CA: porcentagem de células anormais; N: células normais; A: células anormais. Prof.: prófase; Metáf.: metáfase; Anáf.: anáfase; Telóf.: telófase. Acessos: SM (Santa Maria); CRA (Cruz Alta); FOR (Formigueiro); TUP (Tupanciretã); SIL (Silveira Martins); ITA (Itaara).

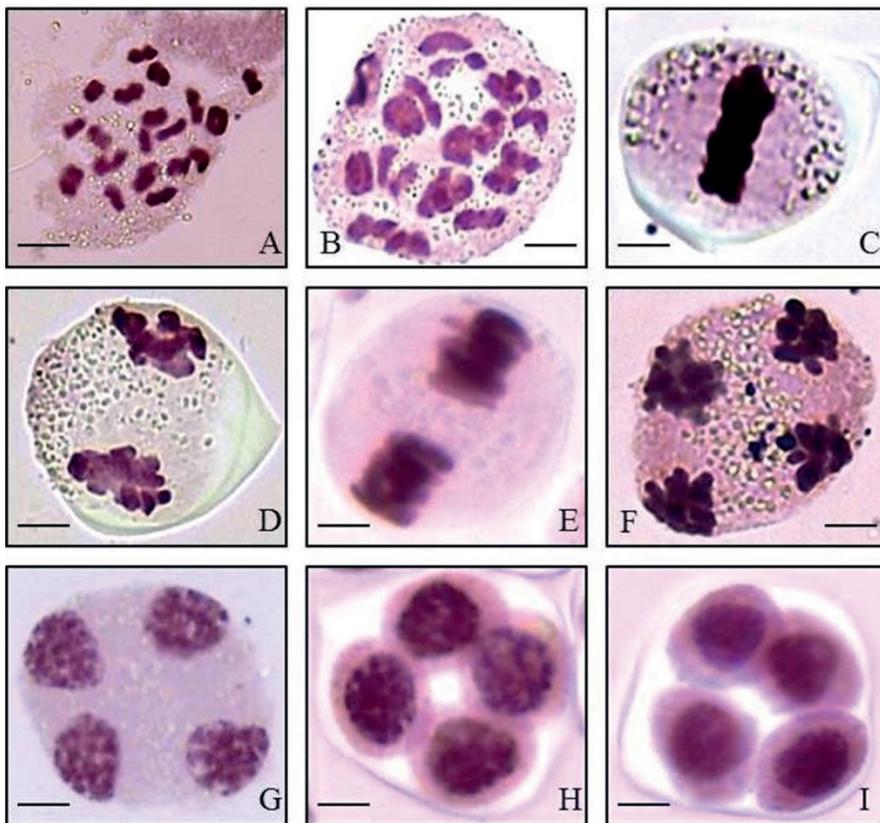


FIGURA 1. Comportamento meiótico de *Sambucus australis* – células normais. A) diacinese (19II), acesso TUP10 (Tupanciretã); B) diacinese (19II), acesso SIL14 (Silveira Martins); C) metáfase I, acesso SM02 (Santa Maria); D) anáfase I, acesso SIL15 (Silveira Martins); E) metáfase II, acesso FOR09 (Formigueiro); F) anáfase II, acesso FOR09 (Formigueiro); G) Telófase II, acesso SM05 (Santa Maria); H) Tétrade, acesso SM04 (Santa Maria); I) Tétrade, acesso ITA16 (Itaara). Escala de 10µm.

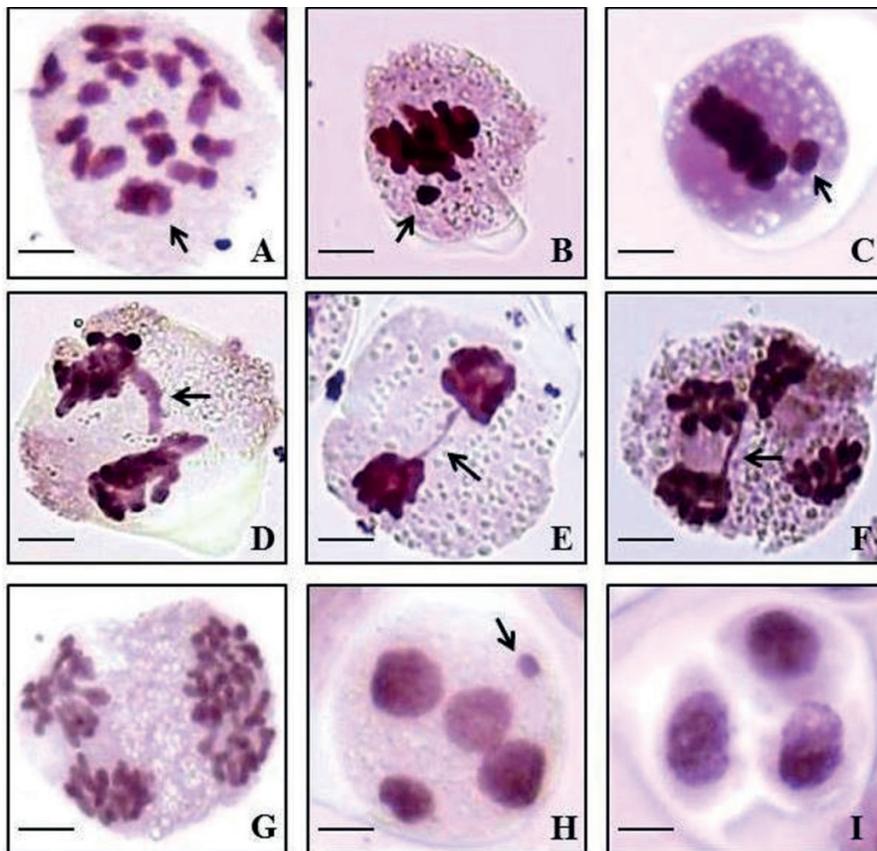


FIGURA 2. Comportamento meiótico de *Sambucus australis* – células anormais. A) diacinese (17II+1IV) com tetravalente (seta), acesso FOR09 (Formigueiro); B) metáfase I com cromossomo retardatário (seta), acesso SM02 (Santa Maria); C) metáfase I com cromossomo retardatário (seta), acesso SIL13 (Silveira Martins); D) anáfase I com ponte (seta), acesso TUP10 (Tupanciretã); E) telófase I com ponte (seta), acesso ITA16 (Itaara); F) anáfase II com ponte (seta), acesso SIL14 (Silveira Martins); G) Anáfase II com não-disjunção dos cromossomos, acesso SM02 (Santa Maria); H) telófase II com fuso multipolar e micronúcleo (seta), acesso SM05 (Santa Maria); I) Tríade, acesso TUP11 (Tupanciretã). Escala de 10µm.

= 10 para *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron. e $n = 9$ para *Pterocaulon polystachyum* DC. e *Solidago microglossa* DC., sugerindo números somáticos $2n = 20$ e $2n = 18$, respectivamente.

O índice meiótico apresentou-se alto, com variação entre os acessos de 91,1 a 100% (Tabela 2), sendo encontradas tétrades normais com quatro células (Figura 1H e 1I) e anormais com três (Figura 2I) e duas células. Nos acessos SM02 e CRA08 não ocorreram células em tétrades, tendo em vista a fase de desenvolvimento que os botões florais se encontravam. De acordo com Love (1949), plantas com índice meiótico superior a 90% são consideradas estáveis citologicamente e, portanto, podem fazer parte tanto de programas de melhoramento genético quanto nos de preservação da espécie. Por ser um parâmetro simples, esse índice é muito utilizado em estudos de comportamento meiótico de plantas. Para a espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (espinheira-santa), Lunardi et al. (2004) estimaram um índice meiótico que variou de 95,1 a 100% para os sete acessos estudados. Fachinetto & Tedesco (2009), estudando cinco acessos de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. (betônica-brava), determinaram que o

índice meiótico ficou contido entre 71,1 a 92,3%. Em linhagens avançadas de pimenta do gênero *Capsicum* L., o índice meiótico foi superior a 90%, exceto em uma linhagem que apresentou o índice de 79,53% (Pozzobom et al. 2011), enquanto em espécies do gênero *Passiflora* L., os índices meióticos variaram de 88,4 a 98,1% (Souza & Pereira 2011).

Apesar de terem sido observadas algumas irregularidades, essas não foram significativas em nenhum dos acessos estudados, que mantiveram um elevado número de tétrades normais e um índice meiótico (IM) acima de 90%. Tedesco et al. (2002) estudaram o comportamento meiótico de 38 acessos de *Adesmia* DC. e verificaram que, embora algumas irregularidades como uni, tri e tetravalentes, bem como cromossomos retardatários e pontes na anáfase I e II tenham sido eventualmente observadas, o índice meiótico foi normalmente superior a 90% em todos os acessos.

Viabilidade polínica

Neste trabalho foi realizada uma estimativa da viabilidade dos grãos de pólen de 14 acessos

TABELA 3. Porcentagem de polens viáveis e estimativa da viabilidade polínica (%) de 14 acessos de *Sambucus australis* através de três diferentes corantes.

| Acesso | Reativo de Alexander | | Orceína acética 2% | | Carmim acético 2% | |
|--------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| | N* | % viabilidade | N | % viabilidade | N | % viabilidade |
| ERE01 | 264 | 44 ^{cc} | 591 | 98,5 ^{ba} | 518 | 86,4 ^{ab} |
| SM02 | 575 | 95,8 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} | 590 | 98,3 ^{ba} |
| SM04 | 552 | 92 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} | 571 | 95,2 ^{ba} |
| SM05 | 563 | 93,8 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} | 593 | 98,8 ^{ba} |
| SM06 | 573 | 95,5 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} | 584 | 97,3 ^{ba} |
| CRA07 | 533 | 88,8 ^{ab} | 600 | 100 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} |
| FOR09 | 587 | 97,7 ^{ba} | 599 | 99,8 ^{ba} | 586 | 97,7 ^{ba} |
| TUP10 | 576 | 96 ^{ba} | 598 | 99,7 ^{ba} | 588 | 98 ^{ba} |
| TUP11 | 493 | 82,2 ^{bb} | 600 | 100 ^{ba} | 597 | 99,5 ^{ba} |
| SIL13 | 457 | 76,2 ^{bb} | 600 | 100 ^{ba} | 598 | 99,7 ^{ba} |
| SIL14 | 565 | 94,2 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} | 571 | 95,2 ^{ba} |
| SIL15 | 567 | 94,5 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} | 599 | 99,8 ^{ba} |
| ITA16 | 463 | 77,2 ^{bb} | 600 | 100 ^{ba} | 600 | 100 ^{ba} |
| CRA17 | 497 | 82,3 ^{bb} | 600 | 100 ^{ba} | 597 | 99,5 ^{ba} |
| Média geral | 518,8 | 86,4^B | 599 | 99,8^A | 585 | 97,5^A |

N*: número de polens viáveis. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

utilizando-se três diferentes corantes. Na Tabela 3 encontram-se os resultados da comparação das estimativas da viabilidade polínica entre os diferentes acessos e corantes.

Pela análise dos resultados, pode-se observar que o corante orceína acética 2% foi o que apresentou a maior média de porcentagem de polens viáveis (99,8%), porém, sem diferir significativamente da média do corante carmim acético 2% (97,5%). Já o corante reativo de Alexander foi o que apresentou a menor média de viabilidade polínica (86,4%), diferindo estatisticamente dos outros dois corantes (Tabela 3).

Na comparação entre os corantes, dentro de cada acesso, o acesso ERE01 apresentou diferenças significativas nas porcentagens de viabilidade polínica entre os três corantes. Nos acessos CRA07, TUP11, SIL13, ITA16 e CRA17, os grãos de pólen corados com reativo de Alexander diferiram significativamente dos grãos corados com orceína acética 2% e carmim acético 2%. Nos demais acessos, os três corantes não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Considerando os resultados obtidos para os três corantes, foi possível constatar que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica, pois não permitiu distinguir corretamente as tonalidades entre polens viáveis e inviáveis (Figuras 3D, 3E e 3F).

Apesar de possibilitar uma maior diferenciação entre polens viáveis e inviáveis (Figuras 3G, 3H e 3I), o corante carmim acético 2% também pode ter superestimado a viabilidade polínica, já que, segundo Munhoz et al. (2008), algumas vezes os grãos de pólen abortados podem fornecer coloração semelhante àquela de grãos viáveis. Por sua vez, o corante reativo de Alexander foi considerado o melhor para estimar a viabilidade polínica neste trabalho, pois permitiu diferenciar com precisão o pólen viável do inviável. Isso se deve ao fato do reativo de Alexander ser formado pelos corantes fucsina ácida e verde de malaquita e esses produzirem uma coloração diferencial entre grãos de pólen viáveis e inviáveis. A celulose na parede celular do pólen reage com o verde de malaquita produzindo uma cor azul-esverdeada, enquanto o protoplasma reage com a fucsina ácida produzindo uma cor púrpura (Alexander 1980). Assim, como os grãos inviáveis não apresentam protoplasma, eles apresentam a cor azul-esverdeada (3A e 3B), ao passo que os grãos viáveis apresentam a parede celulósica azul-esverdeada e o protoplasma de cor púrpura (3C).

Frescura et al. (2012) utilizaram os mesmos corantes do presente trabalho para estimar a viabilidade polínica de 20 acessos de *Polygala paniculata* L. (barba-de-bode). Através

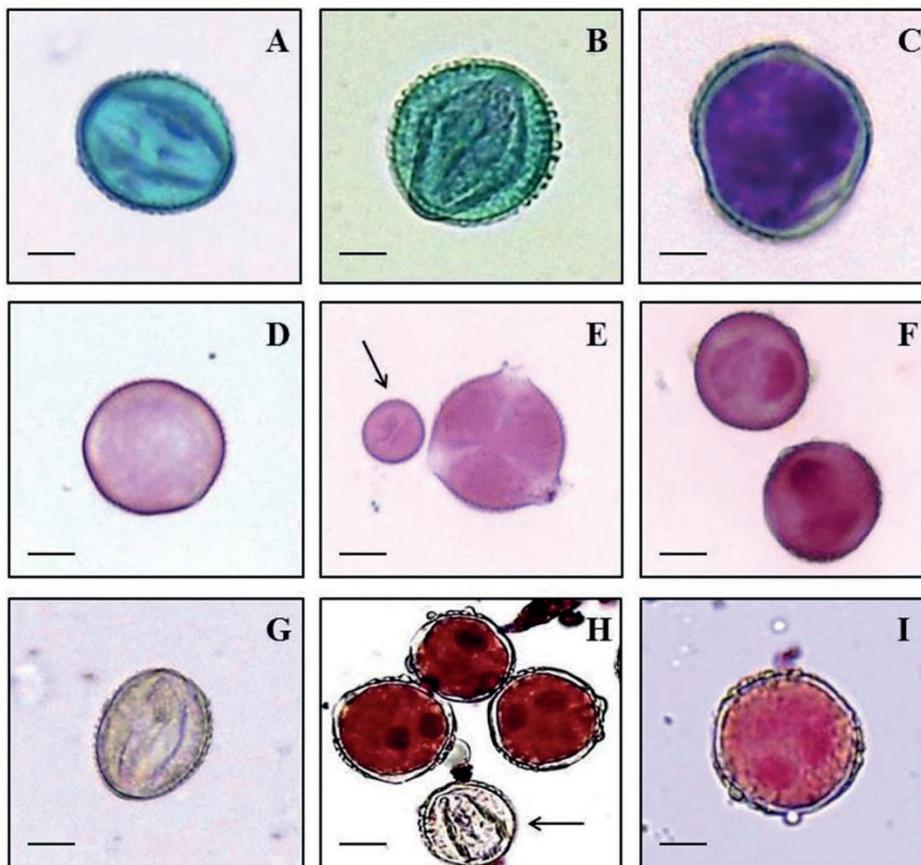


FIGURA 3. Polens viáveis e inviáveis de *Sambucus australis* A – C: polens corados com reativo de Alexander. A) pólen inviável, acesso ERE01 (Erechim); B) pólen inviável, acesso TUP11 (Tupanciretã); C) pólen viável, acesso CRA17 (Cruz Alta); D – F: polens corados com orceína acética 2%. D) pólen inviável, acesso ERE01 (Erechim); E) pólen viável e inviável (diminuto – seta), acesso TUP10 (Tupanciretã); F) polens viáveis, acesso SM05 (Santa Maria); G – I: polens corados com carmim acético 2%. G) pólen inviável, acesso SM06 (Santa Maria); H) polens viáveis e pólen inviável (seta), acesso ERE01 (Erechim); I) pólen viável, acesso CRA17 (Cruz Alta). Escala de 10µm.

dos resultados, os autores verificaram que houve diferença significativa nas médias de viabilidade polínica entre os três corantes (orceína acética: 98,3%; carmim acético: 80,4%; reativo de Alexander: 72,3%) e concluíram que a orceína acética superestimou a viabilidade, enquanto o reativo de Alexander foi considerado o corante mais adequado para a estimativa da viabilidade polínica dessa planta.

No presente estudo, a viabilidade polínica foi considerada alta (acima de 75%) para todos os acessos e corantes, exceto para o acesso ERE01, quando se utilizou o corante reativo de Alexander (44%).

Alta porcentagem de viabilidade polínica com diferentes testes colorimétricos também foi encontrada por diversos autores estudando espécies medicinais. Auler et al. (2006) utilizaram os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander para estimar a viabilidade polínica de oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) e encontraram valores superiores a 85%. Utilizando o corante carmim acético 2%, Loguercio & Battistin (2004) encontraram valores superiores a 93% de viabilidade polínica em nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolão). Ainda, Battistin et al. (2006) estimaram a viabilidade polínica de populações de *Discaria americana* Gillies & Hook. (quina-do-campo) e *Foeniculum vulgare* Mill. (funcho) através dos corantes carmim propiônico e reativo de Alexander, obtendo valores superiores a 88% nessas duas espécies.

Na comparação entre os acessos, dentro de cada corante, não houve diferenças significativas entre os 14 acessos para os corantes orceína acética 2% e carmim acético 2%. Já para o corante reativo de Alexander, ocorreram diferenças entre os acessos. O acesso ERE01 diferiu significativamente de todos os demais acessos analisados, apresentando o maior número de polens inviáveis. Ainda para o reativo de Alexander, os acessos TUP11, SIL13, ITA16 e CRA17 foram semelhantes estatisticamente entre si, mas diferiram significativamente dos acessos ERE01, SM02, SM04, SM05, SM06, CRA07, FOR09 e TUP10 (Tabela 3).

A diferença observada nos valores da viabilidade polínica entre os acessos pode ser explicada por diversos fatores, como a variabilidade genética, além de causas não genéticas, que incluem o estágio do pólen e fatores físicos como temperatura e umidade (Kelly et al. 2002)

Coelho et al. (2012), utilizando os corantes orceína acética 2% e reativo de Alexander, atribuíram as diferenças na estimativa da viabilidade polínica de *Crotalaria juncea* L. à variabilidade genética presente nos diferentes acessos estudados. O mesmo pôde ser observado por Santos Neto et

al. (2006), que constataram que a presença de diferenças significativas na viabilidade dos grãos de pólen em diferentes populações de *Solanum paniculatum* L. (jurubeba) são indicativos de que existe variabilidade genética entre as mesmas. Por fim, segundo Pozzobon et al. (2011), fatores abióticos como a alta temperatura na época de coleta das flores, podem ter sido responsáveis pela diferença na porcentagem de polens viáveis em algumas linhagens de pimenta.

Cabe ressaltar que uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais são reflexo direto de um processo meiótico regular (Corrêa et al. 2005), como pode ser observado no presente trabalho.

Conclui-se que os acessos de *Sambucus australis* estudados possuem comportamento meiótico regular, com associações bivalentes de $n = 19$ cromossomos, índice meiótico superior a 90% e alto índice de viabilidade polínica, não apresentando número de irregularidades meióticas suficiente para comprometer a fertilidade da espécie. O corante reativo de Alexander foi considerado o mais eficiente para estimar a viabilidade polínica nessa espécie.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho, oferecido pelos órgãos de fomento: CAPES, CNPq e FAPERGS/CAPES. E à Profa. Dra. Thais Scotti do Canto-Dorow, pela identificação da espécie botânica e imprescindível ajuda nas coletas.

REFERÊNCIAS

- Alexander MP (1980) A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol* 55:13-18. <https://doi.org/10.3109/10520298009067890>
- Arroyo MTK (1981) Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: Polhill M, Raven PH (ed). *Advances in legumes systematics*, Kew: Royal Botanic Gardens. 723-769.
- Auler NMF, Battistin A, Reis MS (2006) Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Rev Bras Plantas Med* 8:55-63.
- Bacigalupo NM (1974) Caprifoliaceae. In: Burkart A (Ed) *Flora Ilustrada de Entre Rios* (Argentina), Buenos Aires: INTA. 50-52.
- Battistin A, Conterato IF, Pereira GM, Pereira BL, Silva MF (2006) Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. *Rev Bras Plantas Med* 8:56-62.
- Coelho APD, Morais KP, Laughinghouse IV HD, Giacomini SJ, Tedesco SB (2012) Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (FABACEAE). *Agrociencia*

- 46:481-487.
- Corrêa MGS, Viegas J, Silva JB, Avila PFV, Busato GRB, Lemes JS (2005) Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. *Acta Bot Bras* 19:295-303. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000200012>
- Fachinetto JM, Tedesco SB (2009) Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *Rev Bras Plantas Med* 11:110-116. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000100017>
- Frescura VDS, Laughinghouse IV HD, Canto-Dorow TS, Tedesco SB (2012) Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different methods of staining. *Biocell* 36:143-145. doi:10.32604/biocell.2012.36.143
- Goldblatt P (1996) Index to Plant Chromosome Numbers 1992-1993. In: *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 58:1-276.
- Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC. 131p.
- Guinet PH (1989) Advances in legume biology: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 842p.
- Jorge LIF, Graciano RAS, Prado SPT, Pereira U (1999) Identificação histológica de *Sambucus australis* Cham. & Schlecht. (Sabugueiro). *Rev Bras Cienc Farm* 20:117-123.
- Kelly JK, Rasch A, Kalisz S (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *Am J Bot* 89:1021-1023.
- Love EM (1949) La citologia como ayuda practica al mejoramiento de los cereales. *Rev Arg Agron* 16:1-13.
- Loguercio AP, Battistin A (2004) Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae oriundos do Rio Grande do Sul - Brasil. *Ver Fac Zootec Vet Agron* 11:192-205.
- Lunardi MPM, Schifino-Wittmann MT, Barros IBI (2004) Chromosome number variability in the south american medicinal plant *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (Celastraceae). *Cytologia* 69:439-445.
- Munhoz M, Luz CFP, Meissner Filho PE, Barth OM, Reinert F (2008) Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. *Braz J Bot* 31: 209-214. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000200003>
- Nassar NMA, Freitas M (1997) Prospects of polyploidizing Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by unreduced microspores. *Plant Breed* 116:195-197. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1997.tb02179.x>
- Nunes E, Scopel M, Vignoli-Silva M, Vendruscolo GS, Henriques AT, Mentz LA (2007) Caracterização farmacobotânica das espécies de *Sambucus* (Caprifoliaceae) utilizadas como medicinais no Brasil. Parte II. *Sambucus australis* Cham. & Schldl. *Rev Bras farmacogn* 17:414-425. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300017>
- Olkoski D, Laughinghouse IV HD, Silva, Antonio Carlos Ferreira da; Tedesco, Solange Bosio (2008) Meiotic analysis of the germoplasm of three medicinal species from Asteraceae family. *Ciênc Rural* 38:1777-1780. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600047>
- Pereira LP, Luz LP, Tedesco SB, Silva ACF (2006) Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc Rural* 36:678-681. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000200052>
- Pozzobon MT, Souza KRR, Carvalho SIC de, Reifschneider FJB (2011) Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. *Hortic Bras* 29:212-216. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362011000200013>
- Reitz R (1985) Caprifoliáceas. In: Reitz R (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí: Fasc.16p.
- Santos Neto ODS, Karsburg IV, Yoshitome MY (2006) Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). *Rev Ciênc Agro-Amb* 4:67-74.
- Scheffer MC, Ming LC, Araujo AJ (2003) Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro*. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/medicinaisconservacao.pdf> Acesso em: 03 dez. 2016.
- Singh RJ (1993) *Plant cytogenetics*. Urbana: University of Illinois. 391p.
- Silva FAS, Azevedo CAV (2009) Principal components analysis in the software assistat-statistical attendance. In: *World Congress on Computers in Agriculture*, 7, Reno, NV, USA. *Proceedings...*; Reno, NV, USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. 393-396.
- Sobral M, Jarenkow JÁ, Brack P, Irgang BE, Larocca J, Rodrigues RS (2006) *Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil*. São Carlos: RiMA/Novo Ambiente. 350p.
- Souza MM, Pereira TNS (2011) Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. *Braz J Bot* 34: 63-72. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042011000100007>
- Sybenga J (1998) Forty years of cytogenetics in plant breeding a personal view. In: Lelley T (ed.). *Current Topics in plant cytogenetics related to plant improvement*. Viena: Universitäts Verlag. 22-33.
- Tedesco SB, Schifino-Wittmann MT, Dall'agnol M (2002) Meiotic behavior and pollen fertility in the seventeen Brazilian species of *Adesmia* DC. (Leguminosae). *Caryologia* 55:341-347. <https://doi.org/10.1080/00087114.2002.10797885>