

Manual de beneficiamento e teste de viabilidade do pólen da erva-mate



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Florestas
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 262

Manual de beneficiamento e teste de viabilidade do pólen da erva-mate

Valderês Aparecida de Sousa
Ananda Virginia de Aguiar
Jeniffer Grabias
Janaína Spoladore
Tiago Luiz Daros
José Alfredo Sturion

Embrapa Florestas
Colombo, PR
2014

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba,

83411-000, Colombo, PR - Brasil

Caixa Postal: 319

Fone/Fax: (41) 3675-5600

www.embrapa.br/florestas

www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos

Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Alvaro Figueredo dos Santos, Claudia Maria Branco de Freitas Maia, Elenice Fritzsos, Guilherme Schnell e Schuhl, Jorge Ribaski, Luis Claudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski, Susete do Rocio Chiarello Penteadó

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos

Revisão de texto: Patrícia Póvoa de Mattos

Normalização bibliográfica: Francisca Rasche

Editoração eletrônica: Rafeale Crisostomo Pereira

Foto da capa: Valderês Aparecida de Sousa

1ª edição

Versão eletrônica (2014)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Florestas

Manual de beneficiamento e teste de viabilidade do pólen da erva-mate [recurso eletrônico] / Valderês Aparecida de Sousa... [et al.]. Dados eletrônicos. - Colombo : Embrapa Florestas, 2014. (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1980-3958 ; 262)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/item/221>>

Título da página da web (acesso em: 04 mar 2015).

1. Melhoramento genético vegetal. 2. Espécie florestal. 3. *Ilex-paraguariensis*. 4. Pólen. 5. Método. I. Sousa, Valderês Aparecida de. II. Aguiar, Ananda Virginia de. III. Grabias, Jeniffer. IV. Spoladore, Janaína. V. Daros, Tiago Luis. VI. Sturion, José Alfredo. VII. Série.

CDD 633.77 (21. ed.)

Autores

Valderês Aparecida de Sousa

Engenheira florestal, Doutora em Ciências Florestais pela Universidade Georg August - Universitat Gottingen, Pesquisadora da Embrapa Florestas, valderes.sousa@embrapa.br

Ananda Virginia de Aguiar

Engenheira-agrônoma, Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Federal de Goiás, Pesquisadora da Embrapa Florestas, ananda-virginia.aguiar@embrapa.br

Jeniffer Grabias

Bióloga, Mestranda em Ciências Florestais, Universidade Federal do Paraná, jeni.grabias@hotmail.com

Janaína Spoladore

Bióloga, Mestre em Botânica pelo Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Tiago Luis Daros

Biólogo, Mestre em Botânica

José Alfredo Sturion

Engenheiro florestal, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, jose.sturion@embrapa.br

Apresentação

A falta de conhecimento sobre o manuseio do pólen tem limitado programas de melhoramento genético que pretendem através da hibridação combinar características interessantes de indivíduos distintos. Fatores internos, intrínsecos à espécie, são importantes para a definição das metodologias de manuseio. O conhecimento da fenologia reprodutiva indica o estágio ideal da coleta para maximizar a viabilidade. Além disso, conhecer a tolerância do pólen aos diferentes graus de desidratação permite antever a temperatura de armazenamento adequada pois maiores níveis de desidratação possibilitam o armazenamento a temperaturas mais baixas e em longo prazo, viabilizando dessa forma cruzamentos controlados entre indivíduos que não se cruzariam naturalmente. Além disso, o banco de pólen permite a troca e comercialização de materiais genéticos com atributos especiais para a produção de híbridos. Finalmente, o armazenamento de pólen pode constituir-se em um método complementar para a conservação genética estática *ex situ*. Para o sucesso do armazenamento, o monitoramento do pólen, com relação a sua viabilidade, deve ser constante. Por esse motivo, protocolos, especialmente de germinação *in vitro*, têm sido desenvolvidos para erva-mate na Embrapa Florestas. O presente documento compila a experiência com manuseio de pólen (coleta, extração, armazenamento e testes de viabilidade) para uma importante espécie de imensurável valor sócio-econômico no Brasil: a erva-mate.

Sergio Gaiad
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Florestas

Sumário

1. Introdução	9
2. Características da flor de erva-mate	10
3. Coleta e preparo do material	11
3.1. Extração das estruturas masculinas	13
3.2. Processamento do pólen	15
3.2.1. Secagem	15
3.2.2. Extração do pólen	16
4. Armazenamento	17
5. Teste de viabilidade do pólen	18
6. Considerações gerais	20
Referências	21

Manual de beneficiamento e teste de viabilidade do pólen da erva-mate

Valderês Aparecida de Sousa

Ananda Virginia de Aguiar

Jeniffer Grabias

Janáina Spoladore

Tiago Luis Daros

José Alfredo Sturion

1. Introdução

O armazenamento de pólen é uma ferramenta útil para viabilizar a produção de híbridos de espécies florestais bem como a sua conservação genética *ex situ*.

O sucesso desse procedimento depende do cuidado com as etapas do manuseio (coleta, transporte, extração, secagem e testes de viabilidade). A realização destas atividades de maneira adequada propicia a manutenção do pólen viável por um longo período de tempo.

O acompanhamento da fenologia reprodutiva das matrizes fornecedoras de pólen é essencial para o procedimento da coleta. Essas observações permitem a identificação do período adequado para a coleta, visando a extração de pólen.

A polinização controlada apresenta inúmeras vantagens, pois possibilita a produção de híbridos superiores à partir da combinação de características desejáveis de vários indivíduos em um único, proporcionando o conhecimento da capacidade geral e/ou específica de combinação entre indivíduos de interesse.

Além disso, torna possível o cruzamento entre indivíduos com defasagem na floração.

A hibridação é uma ferramenta muito útil no programa de melhoramento genético de espécies florestais. No caso da erva-mate, essa técnica é de extrema importância quando se pretende combinar características, como a produção e qualidade do produto, em um único indivíduo. A demanda relacionada à qualidade tem sido muito variável para as diferentes regiões do país, principalmente no que se refere à concentração do teor de cafeína e teobromina. Portanto, cruzamentos controlados de indivíduos mais produtivos, com outros que apresentam diferentes teores desses componentes químicos, poderão contribuir efetivamente para a geração de indivíduos com características desejáveis, tanto pelos produtores quanto consumidores.

Este manual tem por finalidade apresentar um guia referencial de métodos de coleta, transporte, extração, secagem, armazenamento e viabilidade do pólen da erva-mate para disponibilizar pólen, em quantidade e qualidade fisiológica adequadas, para a utilização na polinização controlada e para a conservação *ex situ*.

2. Características da flor de erva-mate

A erva-mate é uma espécie dióica críptica, com flores díclinas, brancas e pequenas, dispostas nas axilas das folhas superiores. A inflorescência é composta de pequenos fascículos de até cinco flores com um dos sexos abortivos (CARVALHO, 2003; FERREIRA et al., 1983).

A dioicia críptica caracteriza-se por apresentar flores completas (estames e pistilos). Porém, apenas um dos sexos é funcional, definindo o indivíduo como macho ou fêmea. Nas flores femininas os estames são estéreis e nas masculinas o pistilo é abortado (Figura 1).



Fotos: Valderês Aparecida de Sousa

Figura 1. Flores femininas (A) e flores masculinas (B) de erva-mate.

Devido a seu sistema sexual, a erva-mate é uma espécie de cruzamento, não ocorrendo, portanto, a autofecundação. No entanto, podem ocorrer cruzamentos entre indivíduos aparentados e cruzamentos preferenciais, incluindo bi-parentais (WENDT, 2005). A ocorrência de apomixia é sugerida por diferentes autores, tendo em vista a produção de sementes em flores isoladas com tecido não tramado (SPOLADORE, 2011; WENDT, 2005).

3. Coleta e preparo do material

A coleta das flores exige conhecimentos básicos de fisiologia e fenologia reprodutiva, para que o material seja coletado no estágio adequado de maturidade.

O padrão e época de florescimento variam de ano para ano, dependendo de fatores genéticos e ambientais. Para a erva-mate o florescimento ocorre anualmente no período de setembro a dezembro (SOUSA et al., 2003; REITZ et al., 1988). Diversos estudos têm mostrado defasagem de floração entre indivíduos de uma mesma população (GRABIAS, 2011; SPOLADORE, 2011; WENDT, 2005). A melhor época para a coleta, tanto para a conservação genética quanto para a produção de híbridos, é no pico de florescimento, para uma melhor representatividade do pool gênico e otimização do trabalho de campo. No município de

Colombo, PR, a coleta de pólen pode ser conduzida da segunda quinzena de setembro até o início de dezembro (GRABIAS, 2011; SOUSA et al., 2003; SPOLADORE, 2011) (Figura 2). Em função das alterações anuais, é aconselhável o monitoramento dos indivíduos em anos consecutivos, para uma maior precisão dos resultados e definição da coleta.

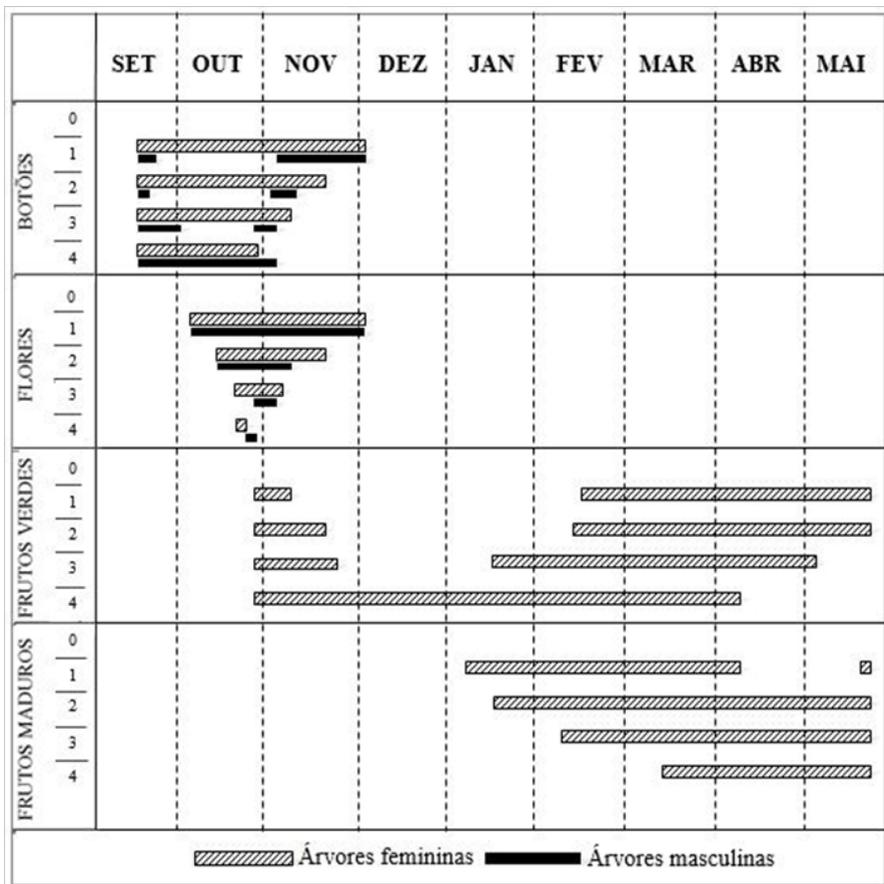


Figura 2. Fenologia reprodutiva mostrando as diferentes fenofases no ano de 2010/2011 para árvores de ambos os sexos de erva-mate no Município de Colombo, PR. As observações das fenofases levaram em consideração a escala de Fournier (1974), na qual a nota 0 significa a ausência da fenofase, 1 a sua presença com magnitude entre 1 e 25%, 2 entre 26 e 50%, 3 entre 51 e 75% e, 4 entre 76 e 100%. Fonte: Grabias (2011).

3.1. Extração das estruturas masculinas

O pólen, tanto para cruzamentos controlados quanto para o armazenamento, deve ser obtido de flores masculinas recém abertas (Figura 1B), de forma a se assegurar a viabilidade máxima, evitando-se também a contaminação por pólen indesejáveis. Para isso, galhos das matrizes com abundante quantidade de botões florais próximos a antese devem ser isolados com sacos de polinização (Figura 3). Esses sacos podem ser confeccionados com tecido não tramado, o qual permite a evapotranspiração mas evita a passagem do pólen.

Fotos: Valderês Aparecida de Sousa



Figura 3. Isolamento dos botões florais em árvores masculinas e femininas (A); vista geral das árvores com galhos isolados (B).

Além disso, o saco é fixo ao galho com algodão hidrófobo, para evitar o estrangulamento do mesmo e a entrada de pequenos insetos para o galho isolado. Os sacos podem apresentar ainda um visor de plástico, para acompanhamento dos estágios reprodutivos, evitando-se a abertura dos mesmos e, conseqüentemente, a contaminação das flores com pólen externo.

As flores que se encontram abertas anteriormente ao isolamento devem ser eliminadas, mantendo-se apenas os botões florais em diferentes estágios de maturação.

Na polinização controlada com pólen fresco, as flores masculinas recém abertas devem ser coletadas dos galhos isolados e o pólen imediatamente aplicado no estigma das flores femininas isoladas. Neste caso, as flores masculinas são aplicadas diretamente nos estigmas receptivos com o auxílio de uma pinça, sem a necessidade de pincel.

O procedimento de extração do pólen para o armazenamento é o mesmo usado para o isolamento dos galhos. O prosseguimento pode ser dado no laboratório e, para isso, os galhos com botões florais próximo a antese são cortados e suas bases imersas em recipientes com água. A partir do início da antese, a coleta de pólen deverá ser feita diariamente, enquanto houver a abertura de flores. Esse período estende-se por 5 dias, aproximadamente. O controle do ambiente onde os galhos permanecerão é importante e deve incluir o controle de umidade (alta) e temperatura (de 25°C a 30°C) para acelerar a antese.

Para o armazenamento, procede-se a extração das estruturas estaminais (filetes e anteras), usando-se tesoura ou bisturi. Em seguida, o material acondicionado em placas de Petri poderá ser processado ou mantido em geladeira por um curto período de tempo, no máximo um dia para o início do processamento (Figura 4). A manipulação das estruturas estaminais deve ser feita com cuidado e agilidade necessária para que o material fique exposto o mínimo possível ao ambiente, evitando-se a contaminação por microorganismos, especialmente fungos, bactérias e pólenes estranhos.

As placas de Petri e utensílios utilizados para a manipulação do pólen devem ser previamente esterilizados, preferencialmente em autoclave. Na ausência desse equipamento, pode-se utilizar outras formas de esterilização, tais como hipoclorito de sódio e/ou álcool etílico.



Foto: Valderês Aparecida de Sousa

Figura 4. Flores masculinas em antese recém coletadas de galhos isolados.

3.2. Processamento do pólen

3.2.1. Secagem

A secagem contribui para a redução do metabolismo do pólen durante o armazenamento, da probabilidade de injúrias pelo congelamento e da possibilidade de proliferação de microorganismos (especialmente fungos e bactérias). Portanto, a secagem aliada ao armazenamento em condições criogênicas contribuem para o sucesso do armazenamento em médio e longo prazos.

O grau de redução de umidade do pólen durante o beneficiamento deve ser compatível com a temperatura de armazenamento almejada. A desidratação deve ser mais drástica para o armazenamento sob condições criogênicas (ex : - 80 °C a - 196 °C). No entanto, alguns tipos de pólenes não suportam secagem drástica, devido à perda de viabilidade. Os pólenes trinucleados (gramíneas) são exemplos de pólenes recalcitrantes (SOUSA, 1988). O pólen de erva-mate tem mostrado resistência à secagem drástica. Portanto, a liofilização poderá ser uma ferramenta útil a ser aplicada neste caso. Várias metodologias

têm sido aplicadas na redução de umidade do pólen, como em ambiente controlado, com uso de dessecador com sílica gel (Figura 5) ou em estufa. Um dos processos mais empregados, pela simplicidade e baixo custo, tem sido o uso de dessecador com sílica gel, sob vácuo. Para uma desidratação ser efetiva deve-se utilizar uma quantidade de material compatível com a capacidade de absorção de umidade pela sílica.



Figura 5. Secagem do pólen em dessecador com sílica gel.

A combinação da liofilização e criopreservação é o método mais promissor de manutenção da viabilidade do pólen em longo prazo. Por esse motivo, tem-se desenvolvido protocolos visando adotar essa técnica para tornar o processo de armazenamento mais compatível com a demanda por pólen armazenado.

3.2.2. Extração do pólen

Após a secagem das estruturas estaminais, o pólen pode ser separado utilizando-se peneiras (Figura 6A), de preferência com malhas que permitam a separação do pólen das estruturas estaminais e o seu armazenamento, como em tubos Eppendorf

(Figura 6B). Além dessa metodologia de extração, existem outras potenciais, como o uso da água em sistemas de filtração (GRIFFIN et al., 1982) e solventes orgânicos (SOUSA; PINTO JUNIOR, 1992).

Fotos: Ananda Virgínia de Aguiar



Figura 6. Peneira utilizada para extração do pólen (A) e armazenamento em Eppendorf (B).

4. Armazenamento

O pólen processado pode ser armazenado em frascos diversos como Eppendorfs, frascos de penicilina, ou em tubos criogênicos. A escolha do frasco será baseada na quantidade de pólen disponível e temperaturas usadas no armazenamento. A quantidade de frascos armazenados deve considerar a frequência do uso do pólen, uma vez que após o descongelamento o pólen não deve ser congelado novamente. Dessa forma, deve-se descongelar apenas a quantidade necessária ao uso. Os frascos devem ser devidamente identificados (nome da espécie, procedência, progênie, indivíduo e data de armazenamento) com etiquetas adequadas com marcador permanente (Figura 6B) de modo que a identificação se mantenha mesmo com o emprego da criopreservação. É importante a manutenção de um banco de dados que contenham detalhes do material armazenado bem como a quantidade de frascos, datas de coleta, forma de processamento do pólen (extração, secagem), armazenamento e resultados de testes de viabilidades.

O armazenamento pode ser feito em curto, médio ou longo prazos, dependendo do uso em programas de melhoramento, principalmente quando o intuito é o de realizar cruzamentos controlados entre indivíduos que florescem em períodos distintos e/ou de diferentes procedências.

A manipulação do material armazenado deve ser a menor possível, evitando assim a perda de viabilidade do material devido à oscilação de temperatura (descongelamento e congelamento sucessivos). O pólen utilizado no programa de melhoramento de erva-mate da Embrapa Florestas vem sendo armazenado em freezers a -20°C , embora temperaturas mais drásticas (-80°C e -196°C) sejam almejadas para o armazenamento em longo prazo.

5. Teste de viabilidade do pólen

É aconselhável que a avaliação da viabilidade do pólen seja conduzida no momento do armazenamento e também da sua utilização, para assegurar o sucesso nas polinizações controladas.

A viabilidade do pólen de erva-mate vem sendo testada utilizando-se a germinação *in vitro*, em que o meio de cultura contém os nutrientes necessários para emissão dos tubos polínicos de pólenes viáveis. Para isso utiliza-se um meio com açúcar (0,8%) e sacarose (30%) e micronutrientes na concentração indicada por Brewbaker e Kwack (1963): 100 mg.L^{-1} de H_3BO_3 , 300 mg.L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 100 mg.L^{-1} de KNO_3 . Nesse caso, a germinação do pólen ocorre em um meio de cultura solidificado sobre lâminas microscópicas (Figura 7) as quais serão dispostas em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições.

Foto: Ananda Virginia de Aguiar



Figura 7. Germinação do pólen sobre meio de cultura em lâminas microscópicas.

O teste de germinação permanece em incubação em câmara de germinação, com umidade relativa alta e temperatura de 25°C por 24 horas (Figura 8A). Após este período, adiciona-se safranina sobre as lâminas para a interrupção da geminação e melhor visualização do pólen e dos tubos polínicos (Figura 8B).

Fotos: Ananda Virginia de Aguiar

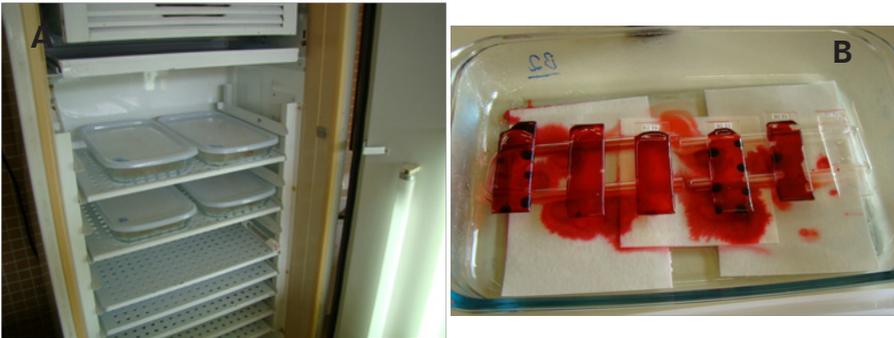


Figura 8. Germinação do pólen em câmara tipo BOD (A), e adição de safranina ao meio de cultura após o período de germinação.

Conta-se então um total de 300 grãos ao acaso, germinados e não germinados (Figuras 9 A e B), para a estimativa da viabilidade. Para isso, utiliza-se um microscópio óptico com aumento de 400x, amostrando-se toda a superfície da lâmina, mas evitando-se as bordas. Os grãos considerados germinados apresentam os tubos polínicos ultrapassando o maior diâmetro do grão de pólen (GODDARD; MATHEWS, 1981; SOUSA et al., 2003).

Fotos: Valderés Aparecida de Sousa.

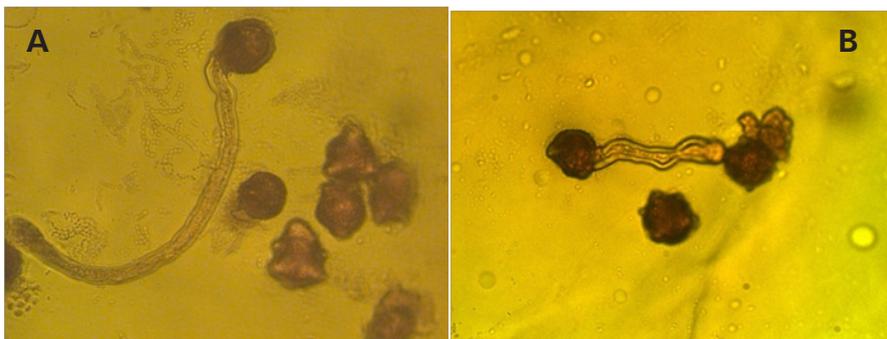


Figura 9. Grãos de pólen germinados e não germinados (aumento de 400 x) (A e B).

6. Considerações gerais

Novos protocolos estão sendo desenvolvidos para otimizar o manuseio do pólen da erva-mate (extração, secagem, armazenamento e testes de viabilidade), visando uma maior eficiência do processo, rendimento do pólen, manutenção de viabilidade em longo prazo e avaliação da viabilidade.

No processo de extração serão testados solventes orgânicos e liofilização, dentre outros, visando a obtenção de maior rendimento e grau de pureza do pólen. Para a manutenção da viabilidade em longo prazo serão testados métodos de criopreservação, como ultra freezers e nitrogênio líquido.

O emprego de corantes específicos serão investigados comparativamente aos testes de germinação *in vitro*, para tornar os ensaios de viabilidade mais rápidos, visando atender uma maior demanda, tanto para o pólen fresco quanto para o armazenado.

Referências

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1.

FERREIRA, A. G.; KASPARY, R.; FERREIRA, H. B.; ROSA, L. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, DF, n. 53, p. 29-33, 1983.

FOURNIER, L. A. Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. **Turrialba**, v. 24, n. 4, 1974.

GODDARD, R. E.; MATTHEWS, F. R. Pollen testing. In: FRANKLIN, C. (Ed.). **Pollen management handbook**. Washington, DC: USDA Forest Service, 1981. 98 p. (Agriculture Handbook, 587).

GRABIAS, J. **Fenologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) em teste clonal em Colombo, PR. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia - Faculdades Integradas do Brasil.**

GRIFFIN, A. R.; CHING, K. K.; JOHNSON, K. W.; HAND, F. C.; BURGESS, I. P. Processing Eucalyptus pollen for use in controlled pollination. **Silvae genetica**, 31, v. 5-6, p. 198-203, 1982.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978. 527 p.

SOUSA, V. A. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1988. 155 p.

SOUSA, V. A.; DAROS, T. L.; STURION, J. A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9, 2003, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal; Câmara Municipal de Vereadores; Câmara da Indústria e Comércio, 2003. CD-ROM..

SOUSA, V. A.; PINTO JUNIOR, J. E. Efeitos de solventes orgânicos na viabilidade pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 24/25, p. 9-17, 1992..

SPOLODORE, J. **Desenvolvimento de metodologia para a polinização controlada em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.ST.-HILL. 1822)**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências biológicas) - Faculdades Integradas do Brasil, Curitiba..

WENDT, S. N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná. 2005. 165 p.

Embrapa

Florestas

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

CGPE 11811