

Manual para Teste de Viabilidade e Armazenamento de Pólen e Receptividade de Estigma do Amendoim Forrageiro



ISSN 0104-9046

Novembro, 2015

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

Documentos 143

Manual para Teste de Viabilidade e Armazenamento de Pólen e Receptividade de Estigma do Amendoim Forrageiro

*Patrícia Silva Flores
Vanderley Borges dos Santos
Luciélío Manoel da Silva
Márcia da Costa Capistrano*

Embrapa Acre
Rio Branco, AC
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Acre

Rodovia BR 364, km 14, sentido Rio Branco/Porto Velho

Caixa Postal 321

CEP 69908-970 Rio Branco, AC

Fone: (68) 3212-3200

Fax: (68) 3212-3285

<http://www.embrapa.br/acre>

<https://www.embrapa.br/fale-conosco>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Marques Carneiro Júnior

Secretária-Executiva: *Claudia Carvalho Sena*

Membros: *Carlos Mauricio Soares de Andrade, Celso Luis Bergo, Evandro Orfanó Figueiredo, Patrícia Silva Flores, Rivaldave Coelho Gonçalves, Rodrigo Souza Santos, Rogério Resende Martins Ferreira, Tadário Kamel de Oliveira, Tatiana de Campos*

Supervisão editorial: *Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo*

Revisão de texto: *Claudia Carvalho Sena / Suely Moreira de Melo*

Normalização bibliográfica: *Renata do Carmo França Seabra*

Editoração eletrônica: *Eduardo Soares*

Fotos da capa: *Giselle Mariano Lessa de Assis*

1ª edição

1ª impressão (2015): 300 exemplares

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 Acre

Flores, Patrícia Silva.

Manual para teste de viabilidade e armazenamento de pólen e receptividade de estigma do amendoim forrageiro / por Patrícia Silva Flores, Vanderley Borges dos Santos, Luciélio Manoel da Silva, Márcia da Costa Capistrano. – Rio Branco: Embrapa Acre, 2015.

20 p. : il. color. (Documentos / Embrapa Acre, ISSN 0104-9046; 143).

1. Melhoramento genético. 2. Amendoim forrageiro – reprodução. 3. *Arachis pintoi*. 4. Grão de pólen – armazenamento. 5. Sistema de produção. 6. Pastagem. 7. Santos, Vanderley Borges dos. 8. Silva, Luciélio Manoel da. 9. Capistrano, Márcia da Costa. I. Embrapa Acre. II. Título. III Série.

631.5233

©Embrapa 2015

Autores

Patrícia Silva Flores

Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

Vanderley Borges dos Santos

Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, professor da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC

Luciélcio Manoel da Silva

Engenheiro-agrônomo, mestre em Genética e Melhoramento, analista da Embrapa Acre, Rio Branco, AC

Márcia da Costa Capistrano

Engenheira-agrônoma, mestre em Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC

Apresentação

Há quase três décadas, a Embrapa Acre desenvolve tecnologias com o objetivo de responder ao desafio de viabilizar sistemas de produção sustentáveis destinados à pecuária de corte e de leite, que sejam economicamente rentáveis e de reduzido impacto ambiental. Dentre essas tecnologias, destaca-se o uso do amendoim forrageiro (*Arachis pintoï*) para formação e melhoramento de pastagens de alta produtividade e qualidade.

No entanto, apesar das vantagens do uso do amendoim forrageiro como pastagem, são encontrados poucos trabalhos na literatura voltados para estudos sobre os aspectos reprodutivos da espécie. Esses estudos são indispensáveis para se conhecer as condições necessárias visando maximizar as taxas de cruzamentos entre as plantas e garantir o sucesso das hibridações em programas de melhoramento genético. Esses fatores variam conforme a espécie e condições climáticas locais, principalmente no que se refere à umidade relativa do ar e regime térmico. Por esse motivo, metodologias de avaliação da viabilidade do pólen e receptividade do estigma do amendoim forrageiro têm sido desenvolvidas na Embrapa Acre.

O presente documento traz protocolos detalhados para avaliação desses fatores, o que permitirá analisar o potencial reprodutivo de genótipos de *A. pintoï*. Adicionalmente, é descrito um método de armazenamento de grãos de polens para a espécie, o que confere maior flexibilidade quanto aos horários para polinização, bem como o intercâmbio, conservação e comercialização de materiais genéticos por meio de um banco de pólen.

Eufran Ferreira do Amaral
Chefe-Geral da Embrapa Acre

Sumário

Introdução	9
Características da flor do amendoim forrageiro	10
Coleta e preparo do material	12
Teste de viabilidade polínica por meio da germinação in vitro .	13
Viabilidade do pólen por meio de métodos colorimétricos	14
Avaliação da receptividade de estigmas	16
Armazenamento dos grãos de pólen.....	17
Considerações finais	18
Referências	18

Manual para Teste de Viabilidade e Armazenamento de Pólen e Receptividade de Estigma do Amendoim Forrageiro

*Patrícia Silva Flores
Vanderley Borges dos Santos
Luciélío Manoel da Silva
Márcia da Costa Capistrano*

Introdução

Para garantir o sucesso de hibridações em programas de melhoramento genético é preciso conhecer as condições necessárias para maximizar as taxas de cruzamentos entre as plantas. Nesse sentido, pesquisas voltadas ao estudo da viabilidade dos grãos de pólen e receptividade de estigmas são de suma importância, pois as informações geradas permitem a avaliação qualitativa dos materiais a serem utilizados nos cruzamentos, no que se refere ao potencial reprodutivo, além de orientar sobre o melhor período para realizar a polinização.

Não há um protocolo universal para determinar a viabilidade polínica aplicável a todas as espécies. No entanto, dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se a colorimétrica e a germinação *in vitro*. Os testes colorimétricos são rápidos e baratos quando comparados à germinação *in vitro*, porém podem resultar em uma superestimação da viabilidade do pólen, além de não fornecerem informações sobre a sua capacidade germinativa. Por outro lado, a germinação *in vitro* é considerada uma técnica de maior confiabilidade, pois avalia diretamente a capacidade do pólen em emitir o tubo polínico, ou

seja, a germinabilidade, que está correlacionada diretamente com a habilidade de fertilização do pólen.

Assim como a viabilidade e germinabilidade do pólen, a receptividade do estigma é um fator decisivo para a ocorrência de fertilização em hibridizações controladas, garantindo dessa maneira maior probabilidade de produção de sementes em um cruzamento. A maioria das técnicas utilizadas para estimar a receptividade do estigma é baseada na verificação da presença da enzima peroxidase, detectada principalmente por meio do uso de peróxido de hidrogênio por ser um método simples e barato.

Este manual tem por finalidade apresentar um guia referencial de métodos de avaliação de viabilidade de pólen e receptividade de estigmas de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*), bem como descrever os procedimentos para o armazenamento de pólen a fim de disponibilizá-lo, em quantidade e qualidade fisiológica adequadas, para polinizações controladas e conservação *ex situ*.

Características da flor do amendoim forrageiro

O amendoim forrageiro possui flores hermafroditas, sendo a autogamia favorecida pela quilha que protege o estigma e o estilete (BERTOZO, 1997; KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994) (Figura 1). Entretanto, pode ser observada a polinização cruzada por ação de diversos insetos (SANTOS; GODOY, 1999; SIMPSON et al., 1994). Oliveira et al. (2015), ao estimarem a taxa de cruzamentos naturais entre acessos mantidos no Banco de Germoplasma da Embrapa Acre, concluíram que o amendoim forrageiro possui o sistema reprodutivo misto, apresentando 33% de alogamia.

As flores são papilionáceas originárias de inflorescências axilares em forma de espigas, cálice bilabiado pubescente, com lábio inferior simples e um lábio superior amplo, com quatro dentes pequenos no ápice, resultantes da fusão de quatro sépalas (ARGEL; PIZARRO, 1992). A corola é formada por um estandarte, duas asas e quilha pontiaguda,

curvada e aberta ventralmente na base, muito delgada e com variação de cor (ARGEL; PIZARRO, 1992; ASSIS et al., 2010; SIMPSON et al., 1994).



Fotos: Giselle M. L. de Assis (A);
Patrícia S. Flores (B)

Figura 1. Flor de *Arachis pintoi* (A) e suas peças florais (B): a) hipanto; b) sépala; c) estandarte; d) asas; e) quilha; f) estames; g) estigma e estilete.

O florescimento tem início entre 14 e 55 dias após o plantio e é indeterminado e contínuo, sem resposta ao fotoperíodo, permitindo que as plantas floresçam várias vezes durante o ano. Porém, floração mais intensa ocorre durante o período chuvoso, em resposta ao corte ou à elevação da umidade do solo (ARGEL; PIZARRO, 1992; ARGEL; VILLARREAL, 1998). As flores do amendoim forrageiro se formam nas axilas das folhas e crescem a partir dos nós reprodutivos em inflorescências que produzem usualmente entre nove e dez flores, das quais normalmente apenas uma flor se abre, nas primeiras horas do dia (SIMPSON et al., 1994).

No Município de Rio Branco, AC (latitude 9° 58' S e longitude 67° 48' W), em condições de campo, o florescimento mais intenso se inicia em outubro e reduz em março, cessando durante o período seco. Porém, esse processo pode variar em função do genótipo, época de plantio e regime pluviométrico de cada ano.

Coleta e preparo do material

Coleta das flores

A coleta das flores para avaliação da viabilidade dos polens deve ser realizada nos primeiros horários do dia, até as 8h30 da manhã, nas condições climáticas do Estado do Acre, uma vez que ocorre uma queda brusca da viabilidade ao longo do dia. A receptividade do estigma se mantém acima de 90% até as 7h30 da manhã, caindo para 50% a partir das 9h30, horário local (CAPISTRANO, 2015).

As flores coletadas devem ser depositadas em recipiente contendo água, para evitar o ressecamento das estruturas florais (Figura 2A). Em laboratório, as flores são abertas sobre placas de Petri e as anteras e o estilete contendo o estigma, seccionados. Deve-se ter cuidado para que a porção do estilete próxima ao estigma não sofra injúrias mecânicas, o que pode ocasionar um resultado do teste falso positivo.

As anteras devem ser abertas sobre lâmina de vidro para a liberação do pólen (Figura 2B e C).

Fotos: Márcia da C. Capistrano

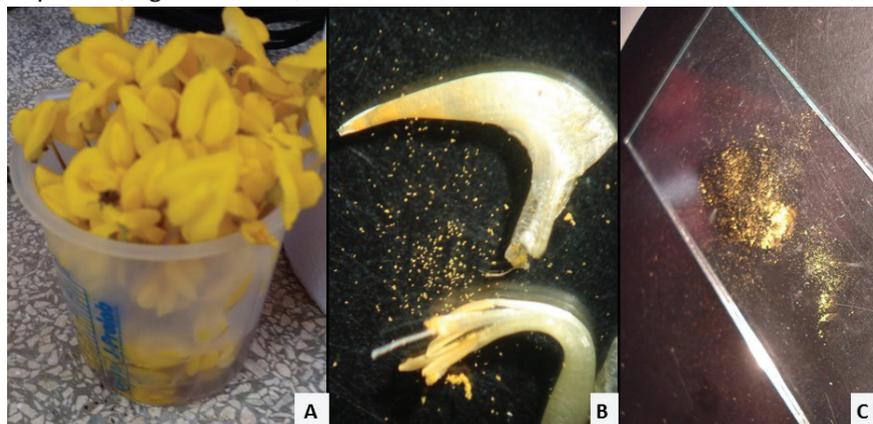
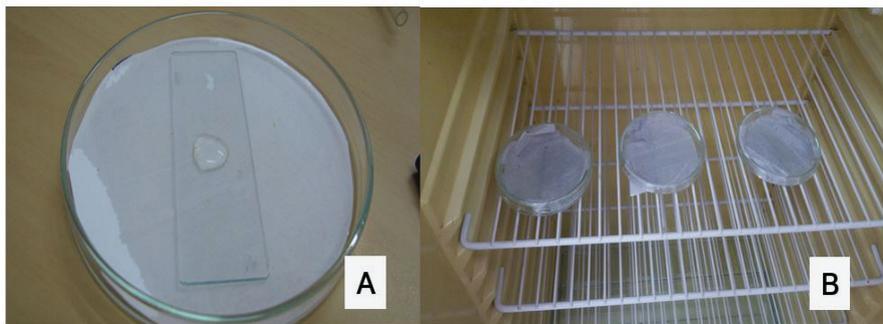


Figura 2. Esquema de extração dos polens das anteras de flores de *A. pintoii* BRS Mandobi: coleta das flores (A); extração das anteras (B); polens liberados sobre lâmina (C).

Teste de viabilidade polínica por meio da germinação in vitro

Para a germinação in vitro do grão de pólen, utiliza-se o meio de cultura Nilles e Quesenberry (1992), com modificações, composto por 300 mg.L⁻¹ de Ca(NO₃)₄.H₂O, 200 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 100 mg.L⁻¹ de KNO₃, 25 mg.L⁻¹ H₃BO₃ (ácido bórico) e 200 g.L⁻¹ de sacarose.

Uma alíquota de 2 mL de meio de cultura deve ser depositada sobre lâmina de vidro, sendo transferida para uma placa de Petri contendo papel-filtro umedecido (Figura 3). Posteriormente, pré-incubada em câmara de crescimento do tipo B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) a 30 °C por 15 minutos, antes da inoculação do pólen. Em seguida, o pólen previamente isolado deve ser depositado sobre o meio com auxílio de um pincel. Em cada lâmina contendo meio de cultura, são depositados os polens de oito anteras. Após, as placas contendo os polens devem ser transferidas para B.O.D. a 30 °C sob ausência de luz, onde são mantidas por 2 horas.



Fotos: Márcia da C. Capistrano

Figura 3. Cultura de polens em meio Nilles e Quesenberry: meio de cultura sobre lâmina (A) e culturas de polens incubadas em câmara de crescimento B.O.D. (B).

Após o período de incubação, uma lamínula é depositada sobre a cultura de polens e, sob microscópio, em objetiva com aumento de 20 vezes, o número de polens germinados é contabilizado. Considera-se que o grão de pólen germinou quando o tubo polínico alcança comprimento igual ou maior ao diâmetro do pólen (FÁVERO, 2004). Sugere-se que sejam adotadas dez repetições, sendo cada uma constituída de um campo de observação formado por 100 polens, totalizando 1.000 grãos de pólen por tratamento.

Viabilidade do pólen por meio de métodos colorimétricos

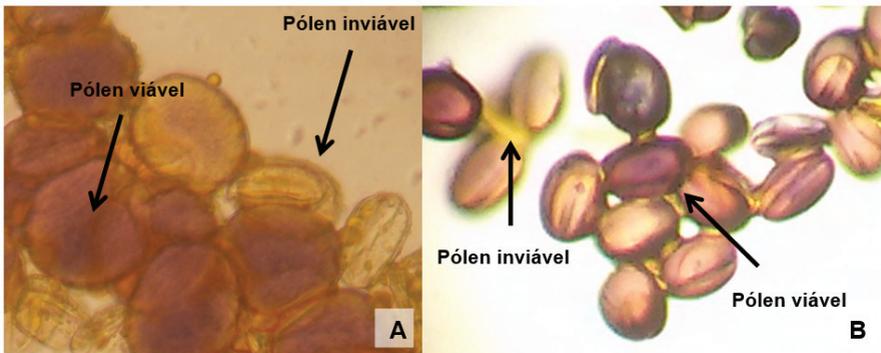
Apesar do corante carmim acético 1% glicerinado ser amplamente utilizado em estudos de viabilidade polínica em *Arachis*, nos ensaios realizados na Embrapa Acre, verificou-se que por meio do uso desse corante há uma superestimação dos valores e que o brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) sem sacarose (KHATUM; FLOWERS, 1995; NORTON, 1966) e a solução de Baker (DAFNI, 1992) são os corantes mais adequados. O protocolo de preparo das soluções corantes é apresentado a seguir:

- 1) Solução MTT 1%: para preparar essa solução diluir 1 g do corante em 100 mL de água destilada e esterilizada, formando então o MTT a 1%.
- 2) Solução de Baker: para preparar essa solução dissolver 7 mg de fosfato de buffer em 10 mL de água destilada com pH entre 7,3 e 7,5. Diluir 6 mg de nicotinamida adenina dinucleotídeo em 1 mL de etanol a 35%. Posteriormente, misturar as duas soluções e adicionar o nitroblue tetrazolium em quantidade suficiente até que a solução atinja a cor levemente amarelada. Os polens coloridos com essa solução devem ser mantidos em B.O.D. por 30 minutos para as análises microscópicas posteriores.

Para a aplicação dos testes, os polens são depositados sobre lâmina de vidro e, em seguida, é adicionada uma gota de corante. O conjunto deve ser fechado com uma lamínula para posteriormente visualizar o padrão de coloração em microscópio estereoscópico. Com a utilização tanto do Baker como do MTT, os polens viáveis adquirem a coloração roxa ou lilás (Figura 4A e B), enquanto os polens inviáveis não colorem, permanecendo amarelos (Figura 4). O corante MTT evidencia a presença da enzima desidrogenase e o Baker indica a presença da enzima álcool desidrogenase.

A porcentagem de pólen viável é estimada pelo número de grãos corados, conforme o padrão de coloração de cada reagente, de tamanho grande ou médio e formato regular. O cálculo da porcentagem de viabilidade polínica é realizado utilizando a seguinte fórmula:

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



Fotos: Márcia da C. Capistrano

Figura 4. Coloração de polens de *A. pintoi* utilizando diferentes corantes: MTT sem sacarose (A) e solução de Baker (B).

Avaliação da receptividade de estigmas

Para as avaliações da receptividade de estigmas em amendoim forrageiro, podem ser utilizados os reagentes: peróxido de hidrogênio a 3% (KEARNS; INOUE, 1993), peroxtesmo (MOTTEN, 1982; SULLIVAN, 1984) e a solução de Baker (DAFNI, 1992). Esses três métodos apresentam resultados semelhantes, diferindo apenas na complexidade de aplicação do teste (CAPISTRANO, 2015).

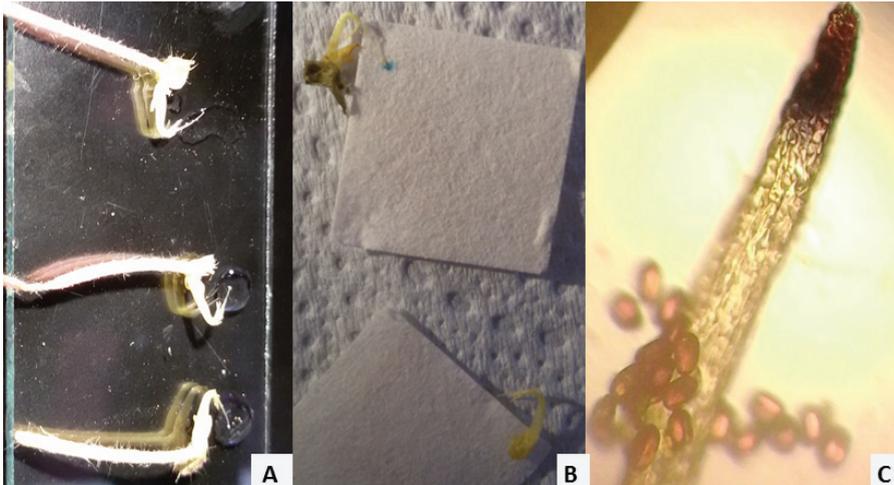
Conforme mencionado anteriormente, estiletos ou estigmas danificados ou com pólen na superfície não devem ser utilizados, para evitar que sejam obtidos resultados não confiáveis (DAFNI, 1992).

Peróxido de hidrogênio a 3% – teste bastante simples cujo reagente é facilmente encontrado e, por isso, utilizado em muitos estudos voltados para viabilidade estigmática de plantas. Consiste na aplicação do reagente diretamente sobre os estigmas. Os estiletos contendo os estigmas são extraídos da flor e transferidos para placa de Petri e, em seguida, são depositadas duas gotas de peróxido de hidrogênio (3%) sobre o estigma. Após 1 minuto, é verificada, com auxílio de lupa, a formação de bolhas de ar sobre o estigma, o que indica a atividade da enzima peroxidase e, portanto, a sua receptividade (Figura 5A).

Peroxtesmo – é comercializado na forma de um kit composto por um conjunto de papéis que sofrem modificação em sua cor, ao entrar em contato com determinadas enzimas do estigma previamente umedecido em água destilada. Os estigmas receptivos apresentam a enzima peroxidase ativa e após 1 minuto em contato com o peroxtesmo resultam na coloração verde do papel (Figura 5B).

Solução de Baker – a avaliação da receptividade utilizando-se a solução de Baker é feita de maneira semelhante à aplicação do peróxido de hidrogênio. Sobre os estigmas é depositada uma gota da solução e após 40 minutos procedem-se às avaliações.

Esse método se baseia na atividade da enzima desidrogenase nos estigmas receptivos. O surgimento da coloração roxa é o indicativo de receptividade utilizando-se essa solução (Figura 5C).



Fotos: Márcia da C. Capistrano

Figura 5. Receptividade dos estigmas de flores de *Arachis pintoi* BRS Mandobi utilizando diferentes reagentes: peróxido de hidrogênio a 3% (A), peroxtesmo KO (B) e solução de Baker (C).

Armazenamento dos grãos de pólen

Para o armazenamento dos grãos de pólen de amendoim forrageiro, obtêm-se bons resultados quando mantidos em freezer a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CAPISTRANO, 2015). Nessa temperatura, os polens mantêm a sua viabilidade por até 35 dias, sendo possível verificar a germinação, em níveis menores, até 70 dias.

Os polens são mantidos dentro das anteras e acondicionados em microtubos com capacidade de 1 mL^{-1} , contendo uma camada de algodão para sustentar as anteras. Em cada microtubo são armazenadas duas anteras.

Recomenda-se que os polens armazenados a -22 °C sejam transferidos para temperatura ambiente (24 °C) por cerca de 15 minutos antes da sua utilização nos cruzamentos.

Considerações finais

As avaliações da viabilidade polínica e da receptividade dos estigmas para elaboração deste manual foram iniciadas às 6h30 da manhã com as flores em antese. É possível que em horários anteriores a esse, a viabilidade polínica e a receptividade dos estigmas atinjam maiores valores.

Segundo a literatura, em *Arachis* os grãos de pólen já são viáveis 6 a 8 horas antes da antese da flor (SIMPSON et al., 1994). Entretanto, nenhum trabalho voltado à avaliação da viabilidade polínica ou receptividade dos estigmas em flores de amendoim forrageiro em diferentes estádios de maturação da flor foi encontrado, abrindo perspectivas para estudos futuros buscando um maior conhecimento sobre a biologia floral da espécie. Em termos práticos, considerando-se que as operações envolvidas no processo de hibridações controladas são trabalhosas, é fundamental coletar o pólen em estágio adequado de maturação, para manter a viabilidade e capacidade de germinar quando for realizado o cruzamento.

Referências

ARGEL, P. J.; PIZARRO, E. A. Germplasm case study: *Arachis pintoi*. In: PASTURE for the tropical lowlands: CIAT's Contribution. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1992. p. 57-73.

ARGEL, M. P. J.; VILLARREAL, C. M. **Nuevo maní forragero perenne (*Arachis pintoi* Krapovickas y Gregory) cultivar Porvenir**: leguminosa herbácea para alimentación animal, el mejoramiento y conservación del suelo y el embellecimiento del paisaje. Costa Rica: Ministério de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (MAG); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1998. 32 p. (Boletín técnico).

ASSIS, G. M. L. de.; VALLS, J. F. M.; CARVALHO, M. A.; VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. de. **Descritores morfológicos para condução de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade em *Arachis pintoi* Krapov. & W. C. Greg.** Rio Branco: Embrapa Acre, 2010. 25 p. (Embrapa Acre. Documentos, 117).

BERTOZO, M. R. **Estudo da variabilidade genética das espécies de *Arachis* da secção *Caulorrhiza* e Krap. & Greg. por meio de proteínas de reserva, isoenzimas e RAPD.** 1997. 133 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach.** Oxford: IRL, 1992.

CAPISTRANO, M. da C. **Fatores determinantes na fertilidade dos gametas e conservação de polens do amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) no Acre.** 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado.** 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba.

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

KHATUM, S.; FLOWERS, T. J. The estimation of pollen viability in rice. **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v. 46, p.151-154, Sept. 1995.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. **Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae).** **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, p. 1-186, 1994.

MOTTEN, A. E. Autogamy and competition for pollinators in *Hepatica americana* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 69, p. 1296-1305, 1982.

NILES, W. L.; QUESENBERRY, K. H. Pollen germination of Rhizomapeanut cv. Florigraze. **Peanut Science**, Gainesville, v.19, p. 105-107, July 1992.

NORTON, R. B. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, VA, v. 89, p.132-134, 1966.

OLIVEIRA, J. C. **Estimativa da taxa de cruzamento e diversidade genética em *Arachis pintoi* com marcadores microssatélites**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J. Hibridação em amendoim. In: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, p. 83-100.

SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; MILES, J. W. Reproductive biology and the potential for genetic recombination in *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (Ed.). **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1994. 209 p.

SULLIVAN J. R. Pollination biology of *Physalis viscosa* var. *cinerascens* (Solanaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 71, n. 6, p. 815-820, July 1984.

Embrapa

Acre

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA