

Foto: Wanderlei Antônio Alves de Lima



Teste de Viabilidade Polínica em Dendzeiro: Uma Nova Proposta

Alex Queiroz Cysne¹

Wanderlei Antônio Alves de Lima²

Cristiane Krug³

Flávia Batista Gomes⁴

A produção comercial de sementes híbridas intraespecíficas de dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) tipo tenera e interespecíficas de dendzeiro com o caiaué (*E. oleifera* (Kunth) Cortés), produzidas pela Embrapa, depende totalmente do pólen produzido pelas plantas matrizes de dendzeiro doadoras de pólen, localizadas no Campo Experimental do Rio Urubu, Município do Rio Preto da Eva, AM.

Atualmente, o pólen tornou-se um importante insumo relacionado à cultura do dendzeiro, não só para a produção de sementes mas também em plantios comerciais, onde há necessidade da prática de polinização artificial ou assistida, com vistas ao aumento da produção de cachos para extração do óleo.

A produção do pólen é uma prática complexa que envolve várias atividades de campo e laboratoriais, com rigoroso controle de qualidade em todas as

etapas de produção, pois esta tem de garantir um mínimo de germinação. A viabilidade polínica é condição preliminar indispensável ao melhoramento genético, uma vez que permite obter maior sucesso nos cruzamentos realizados. Além disso, é muito importante na condução da polinização assistida, pois quanto maior o número de frutos fecundados no cacho de dendzeiro, maior será a taxa de extração de óleo.

Pesquisas têm sido conduzidas a fim de estabelecer e padronizar meios de cultura e condições ambientais ideais para avaliar a viabilidade de pólen em diversas espécies (NUNES et al., 2001). Como essa viabilidade é determinada pela taxa de germinação do grão, o método geral consiste em germinar pequena amostra em meio apropriado e observar ao microscópio, depois de determinado período, o número de grãos que produzem tubo polínico (SALLES et al., 2006).

¹Engenheiro-agrônomo, mestre em Agronomia (Fitotecnia), analista da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

²Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia (Produção Vegetal), pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

³Bióloga, doutora em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

⁴Engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia (Entomologia), analista da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM.

Geralmente, para a germinação do grão de pólen de palmeiras, são utilizados meios de cultura semissólidos à base de ágar e açúcar. O açúcar é o componente que promove o equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o pólen e lhe fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). A distribuição do pólen no meio de cultura, no caso de polens de *Elaeis* spp., é feita utilizando um pincel ou chumaço de algodão (CHIA et al., 2009).

No entanto, esse método apresenta algumas limitações, como a impossibilidade de definir a quantidade de pólen utilizada e de garantir a distribuição homogênea dos grãos de pólen sobre o meio, o que pode mascarar a real viabilidade da amostra avaliada.

Assim sendo, estudos foram realizados com o objetivo de definir um método que padronize a distribuição dos grãos de pólen no meio de cultura e, principalmente, a quantidade de pólen utilizada, de forma que facilite a visibilidade dos grãos germinados no meio. Além disso, é fundamental a padronização de um método que permita a sua repetibilidade com exatidão e eficácia.

Neste comunicado técnico é apresentada uma padronização da suspensão de grãos de pólen para o teste de viabilidade polínica em dendzeiro.

Obtenção e beneficiamento do pólen

O pólen utilizado foi coletado em 21 de outubro de 2013, originário da planta/genitor de dendê RU 2713 P (pisífera) do banco de matrizes existente no Campo Experimental do Rio Urubu. A inflorescência masculina foi isolada utilizando-se saco de lona espessa (nº 8) por volta de 10 dias antes da antese.

Quando a inflorescência apresentou dois terços de suas flores no estágio de antese completa, foi realizada sua colheita. Em seguida, essa inflorescência, ainda ensacada, permaneceu durante quatro horas em sala climatizada. Após esse período, o pólen foi coletado em recipiente plástico, anexado ao saco de lona. Esse mesmo pólen coletado foi submetido a uma secagem de 18 horas sobre sílica gel e peneirado (peneira de 170 mesh), em seguida passou por mais uma secagem de 24 horas sobre sílica gel. Depois de seco, o

pólen foi distribuído em microtubo tipo Eppendorf, acondicionado a vácuo em frascos tipo Castellani e armazenado em freezer a -5 °C (CUNHA et al., 2007).

Meio de cultura

Foi utilizado o meio de cultura sacarose-ágar (11 g de sacarose, 1,2 g de ágar e água destilada na quantidade suficiente para 100 mL de meio). Inicialmente o ágar foi dissolvido em 50 mL do volume da água, agitado com bastão de vidro e aquecido em micro-ondas até sua ebulição. Essa suspensão foi agitada, após intervalos de três minutos de aquecimento, de maneira que tal procedimento fosse repetido até a obtenção de uma solução homogênea, sendo então adicionada a essa solução a sacarose diluída no restante da água. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, as quais receberam aproximadamente 15 mL de meio e foram mantidas em repouso, até o resfriamento e a solidificação do meio.

Preparo das suspensões de pólen

Foi utilizada amostra de pólen do estoque da Embrapa Amazônia Ocidental. Por meio da caracterização, observou-se que o grão de pólen estava dentro das especificações, segundo Cunha et al. (2007), já que apresentava grau de umidade de 5,89% e 8,75 mL de vácuo no interior do frasco Castellani.

Em balança de precisão, foram pesadas as quantidades de 0,001, 0,005 e 0,010 g de pólen, depois diluídas em 1 mL de água destilada. As quantidades de grãos de pólen presentes em cada suspensão foram determinadas por meio da câmara de Neubauer (Tabela 1).

Tabela 1. Peso e quantidade de grãos de pólen em função das suspensões utilizadas da planta matriz RU 2713 P.

Suspensão	Peso (g)	Quantidade de grãos de pólen ($\times 10^4$)
1	0,001	11,75
2	0,005	80,50
3	0,010	207,50

Distribuição do pólen nas placas de Petri

A distribuição dos grãos de pólen nas placas de Petri foi realizada de duas formas: pelo método do pincel (MP) e pelo método da suspensão (MS) de pólen.

No MP, a aspersão do pólen sobre a superfície do meio de cultura foi realizada com auxílio de um pincel, que, após entrar em contato com grãos de pólen, foi levemente espargido sobre o meio de cultura.

No MS, para cada quantidade de grãos de pólen testada, foram distribuídos, sobre o meio de cultura, 160 μ L de cada suspensão de pólen por placa, sendo utilizada uma alça de Drigalsk para espalhar a suspensão por toda a placa de Petri.

Após distribuição do pólen, em ambos os métodos, as placas de Petri foram fechadas e incubadas em temperatura de 40 °C, em câmara climatizada tipo BOD por um período de duas horas.

Análise de viabilidade de pólen dos métodos de distribuição

Para a avaliação da germinação dos grãos de pólen, cada placa de Petri foi dividida em quatro campos.

Em cada campo foi realizada uma contagem aleatória do número de grãos germinados e dos não germinados, considerando-se germinado o grão de pólen que apresentou o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao seu diâmetro. Para a contagem foi utilizado o microscópio com objetiva com aumento de 10x.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições, sendo considerada como unidade experimental a média dos quatro campos observados em uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A relação da quantidade de grãos de pólen com a viabilidade deles foi realizada por meio da análise de regressão dos dados obtidos com as suspensões.

Avaliação dos métodos de distribuição de pólen

Os resultados da germinação dos grãos de pólen, no MS, variaram de 53,4% a 75,8%, apresentando, assim, diferença estatística entre as médias de grãos de pólen germinados para as suspensões de pólen testadas (Figura 1).

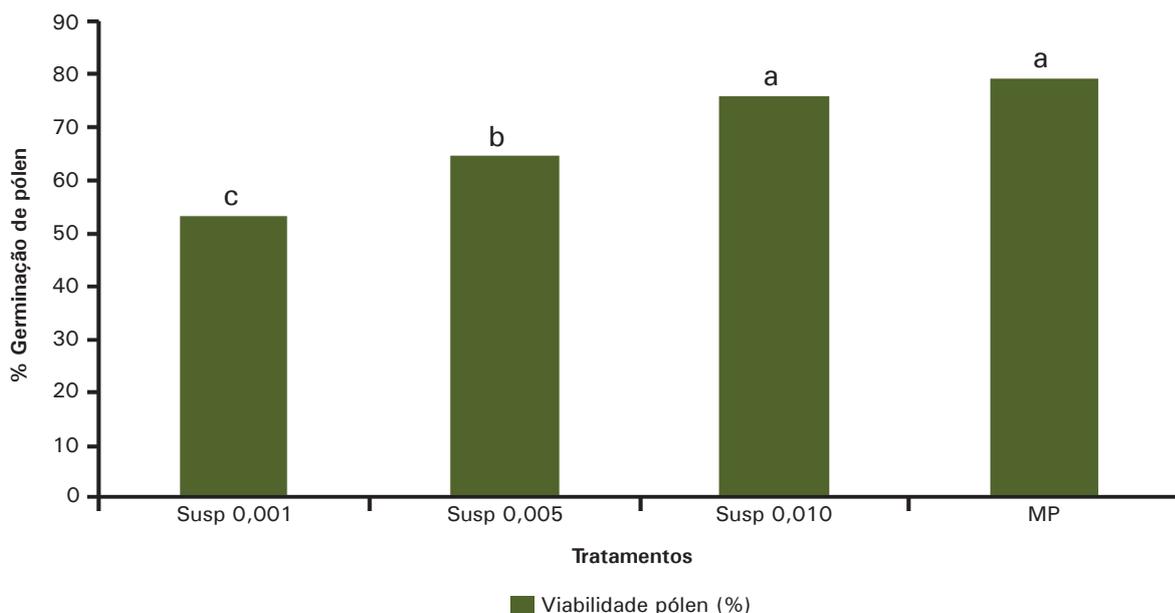


Figura 1. Médias de germinação de grãos de pólen (%) para o método da suspensão (Susp. 0,001 g/mL – 0,001 g/mL; Susp. 0,005 g/mL – 0,005 g/mL; Susp. 0,010 g/mL – 0,010g/mL) e para o método do pincel (MP). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). CV: 6,17%.

Numa visão geral, considerando o MP como o método convencional de dispersão do pólen em meio de cultura, observou-se que, entre as suspensões testadas, a de 0,010 g foi estatisticamente superior às demais, mas não diferiu significativamente do método convencional, o qual não faz uso da água para espargir o pólen. Assim, pode-se afirmar que a água utilizada nas suspensões de pólen não interferiu na viabilidade dos grãos de pólen do dendzeiro. Essa informação não corrobora Bhojwani e Bhatnagar (1974), os quais enfatizaram que o grão de pólen de muitas espécies pode se romper quando colocado na água.

Como a suspensão de 0,010 g foi estatisticamente semelhante ao MP e apresentou distribuição

homogênea dos grãos de pólen sobre a superfície do meio de cultura, também utilizou baixa densidade de pólen, o suficiente para facilitar o exame dos grãos individualmente, e que permite a repetitividade do método com exatidão, se pressupõe que essa suspensão pode ser utilizada em substituição ao MP.

Observou-se, ao microscópio, que no MP não há distribuição de grãos de pólen homogênea (Figura 2D e 2H), o que dificulta a visibilidade e constatação da germinação. Essas limitações dificultam a tomada de decisão por parte do avaliador, podendo até mesmo interferir na veracidade dos resultados das amostras de pólen analisadas.

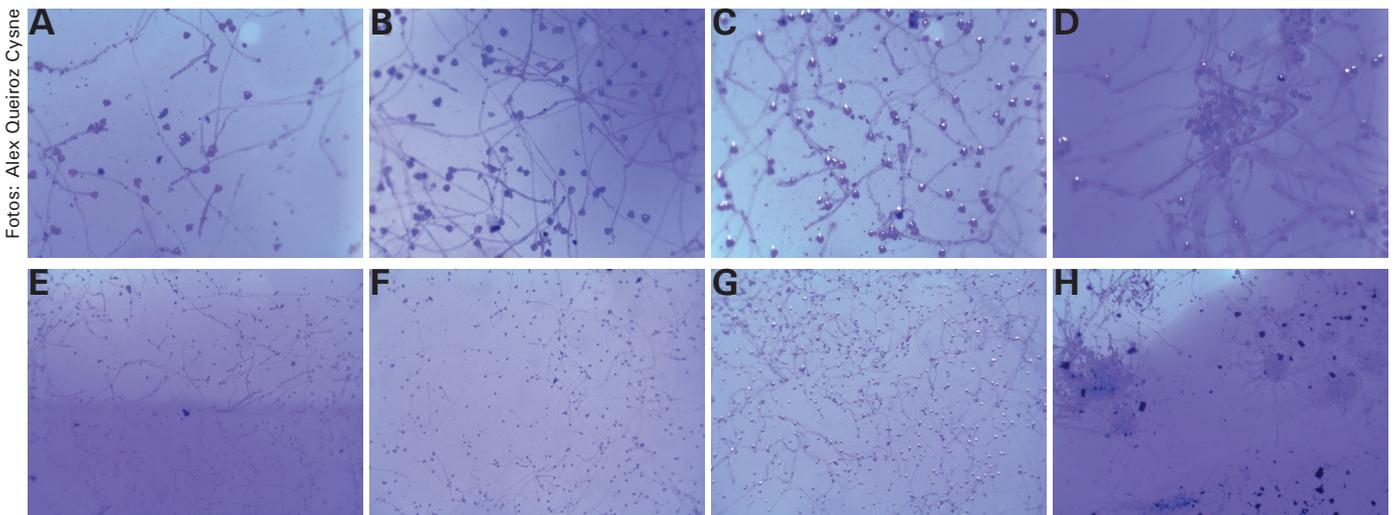


Figura 2. Ilustração dos resultados obtidos pelos métodos de distribuição de grãos de pólen coloridos com azul de metileno. Suspensão de 0,001g/mL no aumento de 80x (A) e 20x (E); suspensão de 0,005g/mL no aumento de 80x (B) e 20x (F); suspensão de 0,010g/mL no aumento de 80x (C) e 20x (G). Método do pincel no aumento de 80x (D) e 20x (H).

Ao se observar as suspensões, pôde-se notar que a diferença significativa entre elas está relacionada à quantidade de grãos de pólen presente em cada uma delas, conseqüentemente relacionada à quantidade de grãos de pólen presente em cada campo de visualização. Entre as suspensões utilizadas, observou-se, ainda, um comportamento crescente linear da germinação dos grãos de pólen em relação à quantidade desses grãos (Figura 3). Como a porcentagem de germinação pode estar diretamente relacionada à quantidade de grãos

de pólen presente na solução, a definição da quantidade de grãos a ser analisada em cada visualização torna-se essencial para a obtenção de resultados que demonstrem a real viabilidade do pólen analisado. É necessário que essa quantidade seja ideal para melhor visibilidade e verificação da germinação, mas que também reduza a possibilidade de se ter um resultado subestimado. Segundo Stanley e Linskens (1974), o tamanho da amostra para tornar o teste válido depende da faixa de germinação média e do desvio padrão da

média, sendo necessária a contagem de 2 x 200 grãos em campos com uma distribuição uniforme. Antônio (2004), testando diferentes quantidades de pólen em *Theobroma grandiflorum*, recomenda a utilização de 300 grãos de pólen, quantidade esta que apresentou a mesma proporção de polens viáveis quando comparada à contagem de 600, 900 e 1.200 grãos.

Conclusão

O MS a 0,010 g de pólen pode ser utilizado em substituição ao MP, uma vez que apresenta homogeneidade na dispersão do pólen sobre o meio de cultura, facilitando o exame dos grãos individualmente, e permite a exata repetição do método.

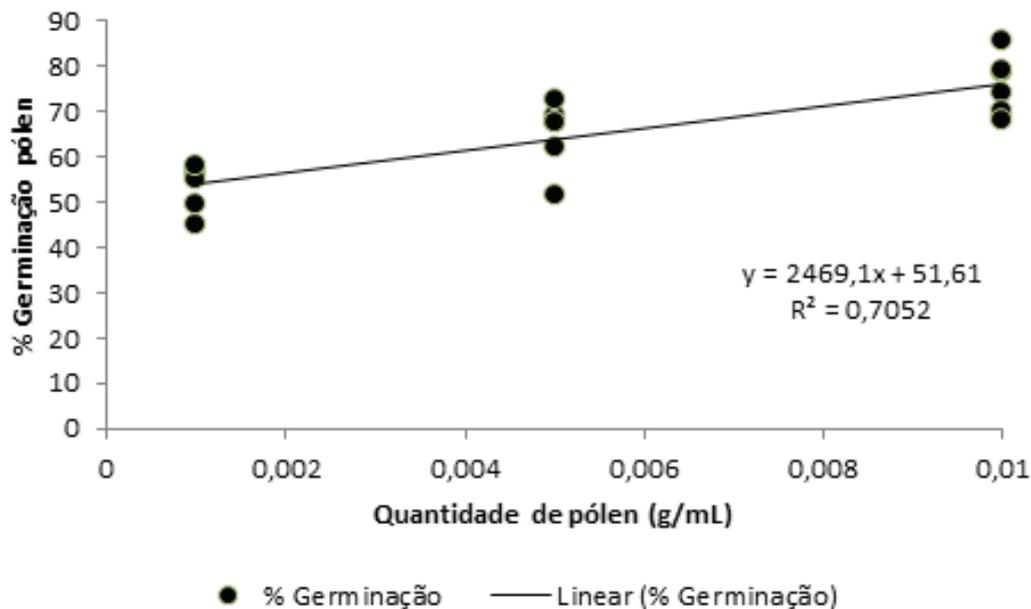


Figura 3. Relação entre o percentual de germinação e a quantidade de grãos de pólen em cada suspensão. Cada ponto representa a média de quatro observações.

Referências

- ANTONIO, I. C. Germinação *in vitro* do pólen de *Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann. **Científica**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 101-106, 2004.
- BHOJWANI, S. S.; BRATNAGAR, S. P. **The embryology of angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264 p.
- CHIA, G. S.; LOPES, R.; CUNHA, R. N. V.; ROCHA, R. N. C. Germinação *in vitro* de pólen de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendzeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1569-1571, ago. 2009.
- CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; DANTAS, J. C. R.; ROCHA, R. N. C. da. **Procedimentos para produção de sementes comerciais de dendzeiro na Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007. 34 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 54).
- NUNES, J. C. O.; DANTAS, A. C. M.; PEDROTTI, E. L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 1, p. 35-39, 2001.

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.;
JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. Sacarose e pH
na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros.
Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 30, n. 1, p.
170-174, jan./fev. 2006.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen**: biology,
biochemistry and management. New York: Springer-
Verlag, 1974. 172 p.

Comunicado Técnico, 116

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Endereço: Rodovia AM 010, Km 29 - Estrada Manaus/Itacoatiara

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

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

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

1ª edição

1ª impressão (2015): 300

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa, Maria Perpétua Beleza Pereira e Ricardo Lopes*

Expediente

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol B. de Sousa*

Editoração eletrônica: *Gleise Maria Teles de Oliveira*