ISSN 1517-3887

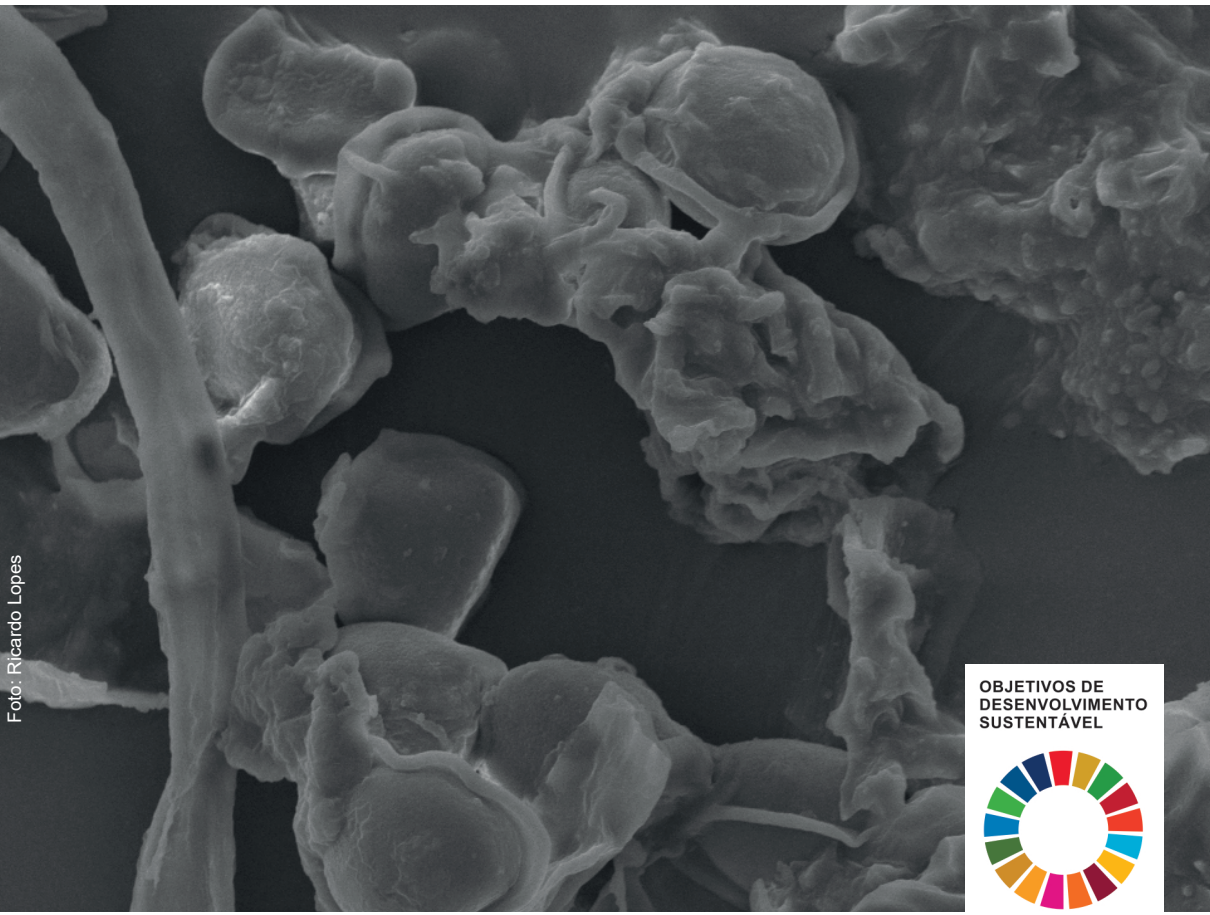

Foto: Ricardo Lopes

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

COMUNICADO TÉCNICO

151

Manaus, AM
Maio, 2021

Embrapa

Preparo rápido de amostras de pólen de açaí-solteiro e tucumã-do-amazonas, sem uso de acetólise, para análise em microscópio eletrônico de varredura

Alex Queiroz Cysne
Ricardo Lopes
Marcelo Domingues Martins Raizer
Jennifer Souza Tomaz
Maria Teresa Gomes Lopes
Fábio Lopes Olivares

Preparo rápido de amostras de pólen de açaí-solteiro e tucumã-do--amazonas, sem uso de acetólise, para análise em microscópio eletrônico de varredura[1, 2]

[1] Cadastro nº A4BDF12 (SisGen).

[2] Alex Queiroz Cysne, engenheiro-agrônomo, mestre em Agronomia (Fitotecnia), analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. Ricardo Lopes, engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Marcelo Domingues Martins Raizer, engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia Tropical, bolsista Fixam – Fapeam/Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Jennifer Souza Tomaz, engenheira florestal, mestre em Ciências Florestais e Ambientais, doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical, Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Manaus, AM. Maria Teresa Gomes Lopes, engenheira-agrônoma, doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), professora da Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Manaus, AM. Fábio Lopes Olivares, engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia (Ciências do Solo), professor da Universidade Estadual do Norte Fluminense (Uenf), Campos dos Goytacazes, RJ.

A importância alimentar e econômica das palmeiras amazônicas açaí-solteiro (*Euterpe precatoria* Mart.) e tucumã--do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) despertou o interesse para geração de conhecimento científico que contribua para a conservação de populações naturais dessas espécies e para o desenvolvimento tecnológico de suas cadeias produtivas (Macedo et al., 2015; Brum, 2019). Essas palmeiras ainda estão em níveis de semidomesticação ou incipientemente domesticadas e carecem de pesquisas que contribuam para aprofundamento do conhecimento científico sobre elas, como estudos sobre a morfologia, incluindo a morfologia dos grãos de pólen, que tem sido aplicada em várias espécies de plantas para estudos sobre variabilidade genética intra e interespecífica de populações naturais (Chaves, 2006), variabilidade entre espécies de mesmo gênero com diferentes níveis de domesticação (Martins et al., 2013), efeitos de modificações no ambiente sobre as plantas (Barth, 2003), taxonomia (Lima; 2010; Buril et al., 2015), sistemática (Uczak, 2018), entre outros.

Para a espécie *A. aculeatum* não existem estudos sobre a morfologia da ultraestrutura dos grãos de pólen, já para *E. precatoria*, dois estudos foram realizados, ambos utilizando amostras preparadas segundo o método acetolítico (Erdtman, 1960) e analisadas com microscópios ópticos. No caso de

Rangel-Churio et al. (2001), utilizando amostras de grãos de pólen de plantas de *E. precatoria* da Amazônia colombiana; e de Oliveira (2011), amostras de pólen de *E. precatoria* da Amazônia Brasileira. Conforme exposto, não existe protocolo validado para análise de pólen das espécies *A. aculeatum* e *E. precatoria* por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e que não utilizem acetólise no procedimento de preparo das amostras para análises microscópicas.

Devido às relevantes contribuições que estudos palinológicos podem proporcionar para a conservação e o desenvolvimento tecnológico das cadeias produtivas das espécies *E. precatoria* e *A. aculeatum*, é de interesse que protocolos eficientes e rápidos estejam disponíveis para uso de ferramentas modernas nesses estudos, como a MEV.

Em palinologia, tradicionalmente, estudos morfológicos da ultraestrutura do grão de pólen são realizados utilizando microscópio óptico (Correia, 2016) e amostras submetidas à acetólise (Erdtman, 1960), técnica que emprega hidrólise ácida (mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico) para supressão do conteúdo celular e para facilitar a observação da parede externa do pólen. Como a acetólise destrói todas as substâncias não esporopoleininas, esse método não é adequado para preparar amostras para estudos que necessitam de todos os componentes da parede do grão de pólen. Além da questão anterior, o pólen de algumas espécies não suporta a acetólise tradicional, como é o caso de materiais de Musaceae, Cannaceae, Lauraceae, Maranthaceae e Zingiberaceae (Gasparino; Cruz-Barros, 2006), para as quais é recomendada uma mistura acetolítica mais fraca, obtida com a diminuição de anidrido acético e acréscimo de ácido láctico na solução (Raynal; Raynal, 1971). Métodos alternativos à acetólise, que permitem preservar substâncias não esporopoleininas da parede do grão de pólen e que proporcionam boa qualidade de imagem, foram propostos, como ebulição em ácido clorídrico concentrado, seguida da lavagem com hidróxido de potássio (Hesse; Waha, 1989). Além das restrições de aplicação do método baseado na acetólise, sua eliminação no preparo de amostras para análises microscópicas da ultraestrutura de grãos de pólen representa simplificação de procedimentos e redução de tempo de análise, dessa forma são de interesse para as espécies *A. aculeatum* e *E. precatoria*.

Alternativamente ao uso de microscópio óptico, quando se tem interesse em estudos mais detalhados da morfologia, recorre-se ao uso de MEV (Silva, 2014). A análise da estrutura polínica com o uso da MEV tem sido utilizada com sucesso para estudo dos grãos de pólen em palmeiras como babaçu (Chaves, 2006), butiá (Mourelle et al., 2016) e espécies do gênero *Phoenix* (Tisserat; Demason, 1982). A MEV, seja em pólens frescos ou após hidrólise ácida, tem como principais vantagens a geração de resultados de forma rápida e relativamente simples, com alta

precisão e definição no detalhamento de estruturas quando comparada a outros métodos (May-de-Mio et al., 2006).

A qualidade dos resultados da análise de detalhes da ultraestrutura de células e tecidos por meio de MEV depende da preparação adequada das amostras, que, por sua vez, depende da natureza do material que será analisado (Brundle et al., 1992). Embora existam técnicas padronizadas para preparação de amostras biológicas, essas servem apenas como uma orientação geral, sendo necessário verificar as especificidades do material que será analisado (Santos; Soares, 2009).

Este documento descreve um protocolo validado para preparação rápida de amostras de pólen das espécies *E. precatoria* e *A. aculeatum*, sem uso do método acetolítico, e análise dessas amostras por MEV, com captura de imagens de boa qualidade para análises morfológicas descritivas dos grãos de pólen.

Coleta das amostras

As amostras de *A. aculeatum* foram coletadas em planta de ocorrência espontânea no Campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM; e as de *E. precatoria*, em planta cultivada como planta ornamental no Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM. Ráquilas com flores masculinas em antese e botões florais em pré-antese foram coletadas em inflorescências recém-abertas, no início da manhã, acondicionadas em sacos de polietileno e levadas imediatamente para o laboratório. No laboratório, o material coletado foi colocado em bandejas de alumínio e submetido à secagem em estufa durante 24 horas a 37 °C. Após o tempo de secagem, as flores e os botões florais foram retirados das ráquilas ou coletados do fundo da bandeja e colocados em sacos de papel, sobre o qual, com um rolo de madeira, foi realizada leve compressão para liberação dos grãos de pólen dos botões que ainda estavam fechados. O material foi em seguida peneirado (malha de 0,380 µm) para separação das impurezas; e a amostra de grãos de pólen, coletada e acondicionada em tubos *eppendorf*, que foram armazenados em freezer (-5 ºC).

Na validação deste protocolo foram utilizadas amostras armazenadas por aproximadamente 30 dias antes, contudo ressalta-se que esse procedimento foi apenas por questões logísticas, resultados similares podem ser obtidos com pólen recém-coletado submetido apenas ao processo de secagem para coleta, ou seja, sem passar por período de armazenamento a baixa temperatura.

Fixação das amostras

A fixação é o processo responsável pela imobilização da maioria das biomacromoléculas estruturais que compõem o pólen (principalmente proteínas), o que proporciona às células e aos tecidos uma aparência mais próxima possível do estado in vivo (Santos; Soares, 2009).

Neste protocolo, a fixação da amostra de aproximadamente 50 mg do pólen foi realizada pela imersão em 20 mL de uma solução com glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4,0% em tampão de fosfato de potássio (KH2PO4) 0,22 M, com pH entre 6,8 e 7,2 em temperatura de bancada (21 °C ± 2 °C), durante 60 minutos. Em seguida, o pólen foi precipitado por centrifugação a 14.000 RPM durante 1 minuto e, com uma micropipeta, a solução de fixação foi retirada, permanecendo o pólen precipitado no interior do microtubo.

Desidratação

A desidratação da amostra é imprescindível, uma vez que a coluna do microscópio funciona em alto vácuo, e a volatilização da água pode danificar a estrutura do material biológico e contaminar a coluna (Santos; Soares, 2009).

Após o procedimento de fixação, o pólen foi submetido ao processo de desidratação por imersão, em aproximadamente 1 mL, na seguinte série crescente com diferentes concentrações de álcool etílico: 50%, 70%, 90%, 100%, seguida de duas imersões em álcool etílico 100% (nessa concentração, conhecida por superseca, há o acréscimo de sulfato de cobre ao álcool 100%). Em cada gradação alcoólica o pólen permanece durante 5 minutos. Após esse tempo, para a transferência da amostra de pólen de uma solução para a outra, o pólen foi precipitado por centrifugação a 14.000 RPM durante 1 minuto. Terminada a centrifugação, e com o auxílio de uma micropipeta, a solução foi retirada, permanecendo o pólen precipitado no interior do microtubo, que recebeu a nova solução da série alcóolica, sendo esse material ressuspendido na solução por meio de agitação. Esse procedimento foi realizado para a remoção gradativa da água e sua substituição completa por etanol puro.

Secagem

Material biológico como o pólen possui estrutura rígida e com baixo teor de umidade (Santos; Soares, 2009), o que possibilita sua secagem por imersão em clorofórmio puro sem apresentar distorções notórias.

Após a amostra de pólen passar pela última solução da série alcóolica, mais uma vez o pólen foi centrifugado (14.000 RPM durante 1 minuto) para retirada do álcool, o que foi realizado com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, o microtubo com a amostra de pólen foi levado para o interior de uma capela de exaustão, onde o pólen foi imerso em clorofórmio puro, em duas etapas: a primeira, com duração de 5 minutos de imersão, ao final da qual o pólen foi centrifugado (14.000 RPM durante 1 minuto) para retirada do clorofórmio; e a segunda, com adição de clorofórmio puro e o material mantido em estufa a 40 ºC até a completa evaporação do clorofórmio. Após estarem completamente secas as amostras já estão em condição

adequada para montagem nos suportes de alumínio (*stubs*).

Montagem da amostra

Nessa etapa, com o auxílio de uma pinça, as amostras já secas foram colocadas delicadamente sobre fita adesiva dupla face de carbono, fixadas nos *stubs*, e deixadas no interior da capela de exaustão para mantê-las secas (Figura 1).

Foto: Alex Cysne

Figura 1. Montagem das amostras de pólens de palmeiras: (A) *stubs* com amostra de pólen já depositada; (B) *stubs* sem a aplicação das amostras.

Metalização

Materiais biológicos normalmente são maus condutores de elétrons (Brundle et al., 1992), e para que seja possível a observação ao MEV há necessidade de interação do feixe eletrônico com a amostra, que deve absorver e conduzir os elétrons para o fio terra, por isso as amostras passam pelo processo denominado metalização, que as torna condutoras elétricas (Dedavid et al., 2007). Outro motivo para a metalização das amostras é que as camadas metálicas depositadas podem melhorar o nível de emissão de elétrons, melhorando também a resolução da imagem dessas amostras (Goldstein et al., 2018).

A metalização das amostras de pólen foi realizada no equipamento conhecido como metalizador (Figura 2), em uma câmara com pressão em torno de 0,1 mbar, com corrente de 50 mA aplicada por 16 minutos em temperatura de 24 °C, onde o alvo metálico foi bombardeado pela deposição de liga metálica de ouro-paládio (Figura 3) em atmosfera de argônio.

Foto: Alex Cysne

Figura 2. Equipamento metalizador marca Bal-Tec, modelo SCD 050, utilizado para deposição metálica de ouro-paládio sobre as amostras de pólen.

Foto: Alex Cysne

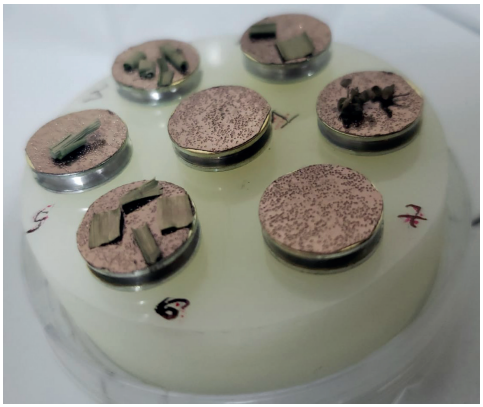

Figura 3. Amostras de pólen (*stubs* identificados com o número 1 e 7) após saída do equipamento metalizador.

Foto: Alex Cysne

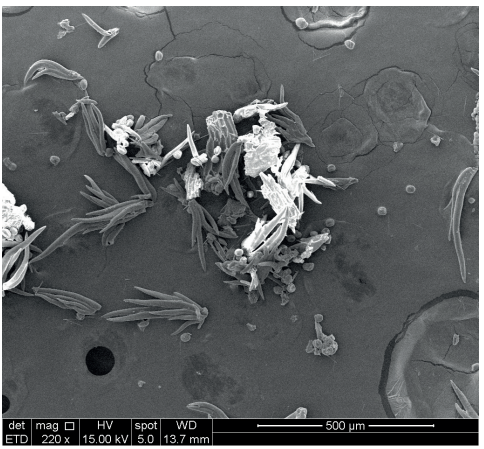

Figura 4. Pólen e anteras de *Euterpe precatoria* observados em microscópio eletrônico de varredura.

Ao fim da etapa de metalização, os *stubs*, contendo as amostras de pólen, foram retirados do metalizador e acondicionados no interior da câmara de amostras do MEV para início das análises.

Análise das imagens

As imagens apresentadas nas Figuras 4, 5, 6 e 7 são provenientes de amostras preparadas conforme descrito neste protocolo e analisadas em microscópio eletrônico de varredura marca FEI Company, modelo Quanta 250, sob 15 kV. Após aplicação deste protocolo foi possível observar que as amostras de pólen de *E. precatoria* e de *A. aculeatum* proporcionaram resultados satisfatórios para visualização do pólen e sua caracterização quanto a tamanho, forma e diferenciação de estruturas.

Foto: Alex Cysne

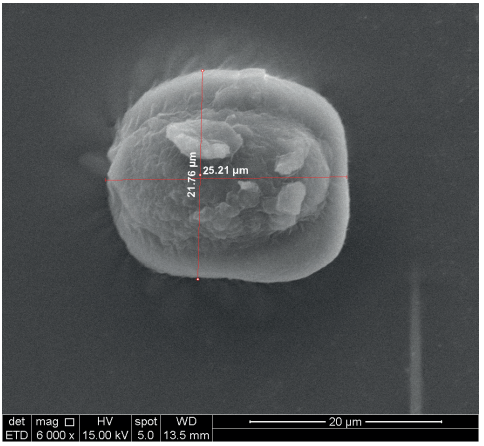

Figura 5. Grão de pólen individualizado de *Euterpe precatoria* observado em microscópio eletrônico de varredura.

Foto: Alex Cysne

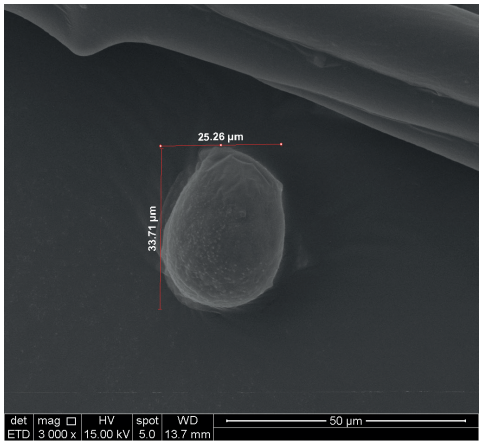

Figura 6. Grão de pólen individualizado de *Astrocaryum aculeatum* observado em microscópio eletrônico de varredura.

Foto: Alex Cysne

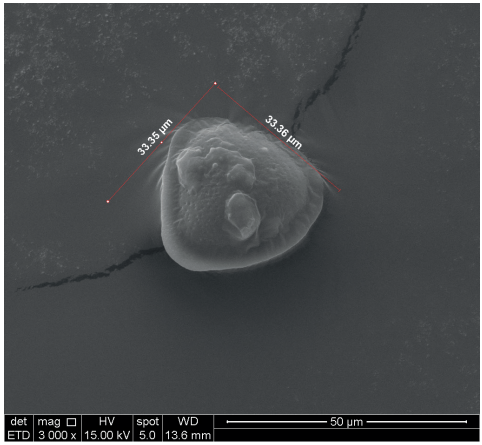

Figura 7. Vista dorsal do grão de pólen individualizado de *Astrocaryum aculeatum* observado em microscópio eletrônico de varredura.

A riqueza de detalhes estruturais dos grãos de pólen observada nas imagens obtidas por MEV, utilizando amostras de pólen de *E. precatoria* e *A. aculeatum* preparadas conforme descrito neste protocolo, permite concluir que a qualidade dessas imagens é adequada para uso em estudos que empreguem a morfologia polínica dessas espécies. Pela qualidade das imagens verifica-se que é possível realizar medições das dimensões dos grãos de pólen e observar detalhes de sua estrutura, observações geralmente utilizadas na palinologia aplicada a estudos de filogenia, variabilidade polínica entre populações, variabilidade polínica intra e interespecífica, entre outros.

Além da qualidade das imagens obtidas com o presente protocolo, este se diferencia dos procedimentos padrões empregados no preparo de amostras utilizadas em estudos morfológicos sobre a ultraestrutura do pólen, que utilizam, quase que exclusivamente, material acetolisado. Portanto, este protocolo elimina a fase de acetólise, empregada nos dois estudos sobre morfologia polínica realizado em *E. precatoria* (Rangel-Churio et al., 2001; Oliveira, 2011), além disso apresenta pela primeira vez um procedimento para preparo de amostras de pólen para análise por MEV para as espécies *A. aculeatum* e *E. precatoria*. A eliminação da acetólise, na preparação das amostras de grãos de pólen, torna o procedimento mais simples e rápido, ao mesmo tempo em que possibilita conservar adequadamente as características das amostras, o que é importante para a qualidade das imagens geradas pela MEV, que, como registrado, apresentaram alta resolução da topografia superficial do pólen das espécies *E. precatoria* e *A. aculeatum*.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pelo financiamento do curso de capacitação, que permitiu a elaboração deste protocolo por meio dos projetos Universal, processo nº 062.01247/2018 – Edital 002/2018, e Fixam, processo nº 062.01529/2018 – Edital 005/2018.

Referências

BARTH, O. M. A Palinologia como ferramenta no diagnóstico e monitoramento ambiental da Baía de Guanabara e regiões adjacentes, Rio de Janeiro, Brasil. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 26, p. 52-59, 2003.

BRUM, H. D. **Economia e ecologia de açaí (*Euterpe precatoria*) em comunidades ribeirinhas na Amazônia Central**. 2019. 156 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BRUNDLE, C. R.; EVANS, C. A.; WILSON, S. **Encyclopedia of materials characterization**: surfaces, interfaces and thin films. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1992. 782 p.

BURIL, M. T.; OLIVEIRA, P. P.; RODRIGUES, R.; SANTOS, F. A. R.; ALVES, M. Pollen morphology and taxonomic implications in *Jacquemontia Choisy* (Convolvulaceae). **Grana**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2015.

CHAVES, L. S. **Indicadores palinológicos do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) Arecaceae em ecossistemas antrópicos e naturais na Amazônia Central**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

CORREIA, F. C. S. **Pólen coletado por *Melipona eburnea* (Apidae, Meliponina) em Rio Branco – Acre**. 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura:** aplicações e preparação de amostras (materiais poliméricos, metálicos e semicondutores). Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

ERDTMAN, G. The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, n. 39, p. 561-564, 1960.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 9 p. Curso de Capacitação de monitores e educadores.

GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; MICHAEL, J. R.; RITCHIE, N. W. M.; SCOTT, J. H. J.; JOY, D. C. **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. 4th ed. New York: Springer-Verlag, 2018. 550 p.

HESSE, M.; WAHA, M. A new look at the acetolysis method. **Plant Systematics and Evolution**, v. 163, n. 147-152, 1989.

LIMA, L. F. P. **Estudos taxonômicos e morfopolínicos em cucurbitáceas brasileiras.** 2010. 246 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MACÊDO, J. L. V.; COSTA, J. R.; LOPES, M. T. G.; SILVA, P. P.; LIMA, R. M. B.; RAMOS, S. L. F.; LEEUWEN, J. Tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*). In: LOPES, R.; OLIVEIRA, M. do S. P. de; CAVALLARI, M. M.; BARBIERI, R. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. da. (Ed.). **Palmeiras nativas do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. v. 1, p. 211-234.

MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M.; PEREIRA, T. N. S.; RODRIGUES, R.; PEREIRA, M. G.; CUNHA, M. Palynological characterization and genetic divergence between accessions of chilli and sweet peppers. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 568-573, 2013.

MAY-DE MIO, L. L.; NOVAES, Q. S.; ALVES, E. Metodologias de preparação de amostras de ferrugem para estudos morfológicos de urediniósporos por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 267-273, 2006.

MOURELLE, D.; GAIERO, P.; SPERONI, G.; MILLÁN, C.; GUTIÉRREZ, L.; MAZZELLA, C. Comparative pollen morphology and viability among endangered species of Butia (*Arecaceae*) and its implications for species delimitation and conservation. **Palynology**, v. 40, n. 2, p. 160-171, 2016.

OLIVEIRA, L. C. **Palinologia, citogenética e conteúdo de DNA nuclear em espécies do gênero *Euterpe***. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RANGEL-CHURIO, J. O.; BOGOTÁ, R. G.; JIMÉNEZ-BULLA, L. C. Atlas palinológico de la Amazonia Colombiana IV: Família Arecaceae. **Caldasia**, v. 23, n. 1, p. 281-300, 2001.

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adasonia**, v. 11, n. 1, p. 77-79, 1971.

SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M. Microscopia eletrônica em fitossanidade. In: BALDIN, E. L. L.; FUJIHARA, R. T.; ROSA, D. D.; BARBIERI, R. F.; FIRMINO, A. C. **Atualidades em proteção de planta**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais (FEPAF), 2009. p. 88-112.

SILVA, C. I. (Org.). **Catálogo polínico das plantas usadas por abelhas no Campus da USP de Ribeirão Preto**. Ribeirão Preto: Holos, 2014. 153 p.

UCZAK, C. S. **Palinologia aplicada à sistemática de Rubiaceae Juss**. 2018. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TISSERAT, B.; DEMASON, D. A scanning electron microscope study of pollen of Phoenix (*Arecaceae*). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 107, p. 883-887, 1982.

Embrapa Amazônia Ocidental
Rodovia AM-010, Km 29,
Estrada Manaus/Itacoatiara
69010-970, Manaus, Amazonas
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Publicação digital (2021)

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Amazônia Ocidental

Presidente

Inocencio Junior de Oliveira

Secretária-executiva

Gleise Maria Teles de Oliveira

Membros

José Olenilson Costa Pinheiro,
Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa e
Maria Perpétua Beleza Pereira

Supervisão editorial e revisão de texto

Maria Perpétua Beleza Pereira

Normalização bibliográfica

Maria Augusta Abtibol Brito de Sousa
(CRB 11/420)

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Gleise Maria Teles de Oliveira

Foto da capa

Ricardo Lopes