

GERMINAÇÃO IN VITRO DO PÓLEN DE

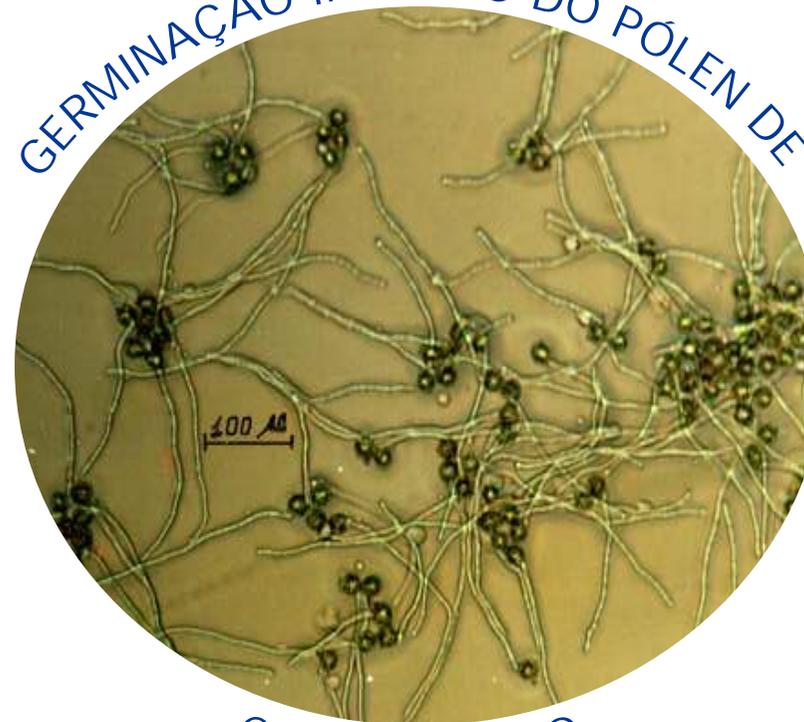


Foto: Arquivo CPAA

CUPUAÇUZEIRO

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida

Presidente

Alberto Duque Portugal

Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast

José Honório Accarini

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretor-Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores-Executivos

Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Embrapa Amazônia Ocidental

Chefe Geral

Eduardo Alberto Vilela Morales

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Jackson B.N. Xavier

Chefe Adjunto Administrativo

Rosildo Simplicio da Costa

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

Dorremi Oliveira

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

GERMINAÇÃO IN VITRO DO PÓLEN DE
CUPUAÇUZEIRO

Isaac Cohen Antonio
Cley Donizeti Martins Nunes
Nelcimar Reis Sousa

*Manaus-AM
2000*

Embrapa Amazônia Ocidental. Boletim de Pesquisa, 8

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Ocidental
Rodovia AM 010, km 29
Telefone:(92) 622 2012 / 622 4971

Fax: (92) 232 8101 / 622 1100

sac@cpaa.embrapa.br

Caixa Postal 319, CEP 69011-970, Manaus-AM

Tiragem: 300 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente

Dorremi Oliveira

Secretário Executivo

Isaac Cohen Antonio

Membros

André Luiz Atroch

Eduardo Lleras Pérez

Francisco Mendes Rodrigues

Gleise Maria Teles de Oliveira

Maria do Rosário Lobato Rodrigues

Maria Perpétua Beleza Pereira

Palmira Costa Novo Sena

Regina Caetano Quisen

Sebastião Eudes Lopes da Silva

Revisão Gramatical

Maria Perpétua B. Pereira

Diagramação & Arte

Gleise Maria Teles de Oliveira

SOUSA, N. R.; ANTONIO, I. C.; NUNES, C. D. M. Estratégias reprodutivas e polinização artificial em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann). Revista da Universidade do Amazonas. Série: Ciências Agrárias, Manaus, v. 4/5, n. 1/2, 1995/1996.

SOUSA, V. A. de. Manejo e viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. 1988. p. 31-37. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1988.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen biology biochemistry management. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

ANTONIO, I.C.; NUNES, C.D.M.; SOUSA, N.R. Germinação in vitro do pólen de cupuaçuzeiro. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. 23p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Boletim de Pesquisa, 8).

ISSN 1517-2457

1. *Theobroma grandiflorum* - Pólen - Germinação - Cultura in vitro - Brasil - Amazonas. I. Embrapa Amazônia Ocidental. II. Título. III. Série.

CDD 633.74

HONGI-QI, Z.; CROES, A. F. Protection of pollen germination from adverse temperatures: a possible role for proline. *Plant, Cell and Environment*, n. 6, p. 471-476, 1983.

LACERDA, C. A. de; OLIVEIRA, L. M. de; ALMEIDA, E. C. de; LIMA, J. O. G. de. Meio de cultura e condições ideais para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada. *Revista Ceres*, Piracicaba, v. 72, n. 241, p.308-318, 1995.

LEE, A. E. Crescimento e desenvolvimento das plantas. São Paulo: EDART, 1967. 96 p.

MIRANDA, I. P. de A.; CLEMENT, C. R. Germinación y almacenamiento del polen de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K., Palmae). *Revista de Biología Tropical*, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.

NEVES, T. S.; MACHADO, G. M. E.; OLIVEIRA, R. P. Efeito do tipo e concentração de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14./REUNIÃO INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 42./SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MIRTÁCEAS, 1996, Curitiba. Resumos... Curitiba: CBF, 1996. p. 213.

PAIVA, J. R. de; GONÇALVES, P. de S.; REBELLO, A. P. Germinação de pólen in vitro de alguns clones de seringueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 18, n. 9, p. 1021-1029, 1983.

PÁLFI, G.; KÖVES, E. Determination of vitality of pollen on the basis of its amino acid content. *Biochemical. Physiology*, n. 179, p. 237-240, 1984.

POEHLMAN, J. M. Mejoramiento genético de las cosechas. 8. Ed. México: Limusa. 1986. 454 p.

AGRADECIMENTOS

Ao Auxiliar de Operações Sérgio de Araújo Silva, pela valiosa ajuda no preparo dos meios de germinação do pólen.

BIBLIOGRAFIA

ALLARD, R. W. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 1971. 382 p.

ANTONIO, I. C. Preferência das abelhas *Melipona seminigra merrillae* Cockerell instaladas em plantio de guaraná (*Paullinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis*) na coleta de pólen. Manaus: FUA, 1985. 62 p. (Monografia. Graduação Engenheiro Agrônomo) - Fundação Universidade do Amazonas, Manaus. 1985.

ANTONIO, I. C.; SOUSA, N. R.; NUNES, C. D. M. Uma técnica de campo para verificar a receptividade do estigma da flor do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Wildenow ex Sprengel) Schumann). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS, 1., 1997. Resumos... Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1997. p. 47.

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; MARTINS, F. P.; BOAVENTURA, Y. M. S. Conservação e germinação do pólen, polinização e frutificação efetiva em pessegueiros e nectarineiras subtropicais. *Bragantia*, Campinas. v, 50, n. 1, p.17-28, 1991.

BROWN, C. A. Palynological techniques. Ed. C.A. Brown. Baton Rouge: Louisiana, 1960. 188 p.

GOMES, F. P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. 3. ed. Piracicaba: Potafos, 1987. 162 p.

GONÇALVES, P. de S.; PAIVA, J. R. de; REBELLO, A. P. "In vitro" pollen germination of *Hevea camargoana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 17, n. 2, p. 287-291, 1982.

DARLINGTON, C. D.; LA COUR, L. F. The handling of the chromosomes. 5th. ed. London: George Allen and Unwin, 1969. 272 p.

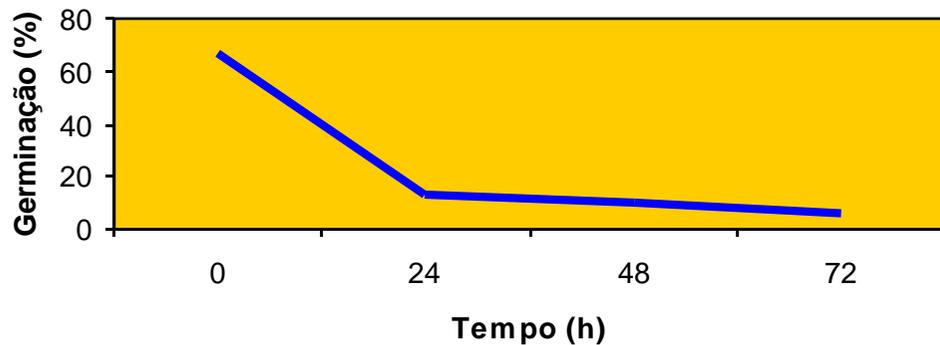


FIG. 4. Viabilidade do pólen depois de retirado da planta e conservado em temperatura ambiente. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, concluiu-se que há variação na germinação do pólen dos estames de uma mesma flor, por isso recomenda-se usar todos os estames de uma flor para preparar uma amostra. A contagem dos grãos de pólen germinados deve ser feita duas horas depois de colocados no meio de germinação. Trezentos grãos são suficientes em cada lâmina de amostra. O estágio em que deve ser coletado o botão para fins de polinização artificial ou testes de germinação é o E (duas horas após o início da antese, com todas as sépalas desprendidas, pétalas distendidas, estilete-estigma exposto). O pólen deve ser usado preferencialmente até duas horas depois de coletado, devido encontrar-se com maior viabilidade nesse período. Um ótimo meio para germinação do pólen de cupuaçuzeiro é lactose 5% + H_3BO_3 0,01 % + ágar 1%, com pH 6,1, em temperatura ambiente entre 27°C e 30°C. O pólen coletado de botões no estágio E pode permanecer viável até 72 horas, conservado no botão em condições ambientes; porém, após esse período, sua viabilidade é baixa.

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------|----|
| RESUMO..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| INTRODUÇÃO..... | 9 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 14 |
| CONCLUSÕES..... | 20 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 21 |

A variação ocorrida na viabilidade do pólen das plantas (Figura 3) atribui-se a diferenças nos seus estados nutricionais (Stanley & Linskens, 1974) ou a diferenças nos genótipos destes indivíduos, por tratar-se de plantas de uma coleção de polinização aberta, uma vez que os botões foram coletados no mesmo dia e hora, e o meio de germinação usado nos testes foi o mesmo.

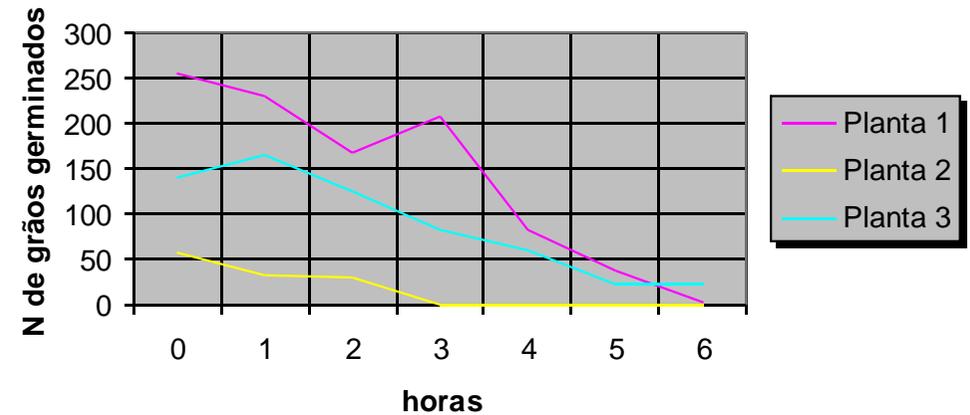


FIG. 3. Viabilidade dos grãos de pólen, depois de retirados da planta no estágio E. Média da contagem do pólen de dois botões por planta. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

O teste para verificar a longevidade do pólen conservado no botão floral e armazenado em condições ambientes mostrou uma queda acentuada na viabilidade, após 24 horas, permanecendo viável até 72 horas depois de retirado da planta, no entanto, com viabilidade em torno de 5% (Figura 4).

TABELA 5. Teste de germinação com contagem dos grãos de pólen germinados. Botão floral no estágio E. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

| Meio | Soluções (proporções) | R ₁ | R ₂ | R ₃ | \bar{X} (%) | pH |
|------|--|----------------|----------------|----------------|---------------|-----|
| 1 | S ₁₃ | 296 | 242 | 195 | 244 (81) | 4,8 |
| 2 | S ₇ + S ₅₃ + S ₅₄ (1:1:1) | 69 | 20 | 20 | 36 (12) | 5,0 |
| 3 | S ₇ + S ₅₁ (1:1) | 0 | 0 | 0 | 0 (0) | 4,8 |
| 4 | S ₅ + S ₅₄ (1:1) | 0 | 0 | 0 | 0 (0) | 4,9 |
| 5 | S ₇ + S ₅₀ + S ₅₁ + S ₅₃ + S ₅₄ (3:1:1:1:1) | 0 | 0 | 0 | 0 (0) | 5,4 |
| 6 | S ₁₆ | 299 | 300 | 300 | 300 (100) | 6,1 |
| 7 | S ₂ + S ₅₄ (1:1) | 7 | 3 | 9 | 6 (2) | 5,0 |
| 8 | S ₃ | 4 | 7 | 0 | 4 (1) | 4,8 |
| 9 | S ₄ | 0 | 0 | 59 | 20 (7) | 5,1 |
| 10 | S ₇ + S ₅₄ (1:1) | 1 | 46 | 8 | 18 (6) | 4,9 |

Obs.: R₁, R₂ e R₃ = Repetições 1, 2 e 3.



FIG. 2. Tubo polínico após duas horas na solução lactose 5% + H₃BO₃ 0,01% + ágar 1%.

O teste para verificar quanto tempo o pólen permanece com viabilidade após ter sido retirado da planta mostrou que não existe diferença significativa na viabilidade do pólen, pelo teste LSD a 5%, até três horas depois de retirado da planta e conservado no botão floral em condições ambientes. Para assegurar a alta viabilidade do pólen, recomenda-se que seu uso não ultrapasse duas horas, depois de retirado da planta (Figura 3).

GERMINAÇÃO IN VITRO DO PÓLEN DE CUPUAÇUZEIRO

Isaac Cohen Antonio¹
Cley Donizeti Martins Nunes²
Nelcimar Reis Sousa¹

RESUMO

Com objetivo de desenvolver uma metodologia para germinação in vitro do pólen de cupuaçuzeiro, foram estudados vários parâmetros, como a caracterização de cinco estádios da antese da flor de cupuaçuzeiro, a determinação do tamanho da amostra para a contagem dos grãos de pólen germinados, que não necessita ser superior a 300 grãos. Observou-se que grãos de pólen provenientes de estames de uma mesma flor não possuem germinação uniforme; que a maior quantidade de pólen viável apresenta-se no estágio E da antese (cerca de duas horas depois do início da antese, quando a flor encontra-se completamente aberta); o pólen, conservado no botão floral em condições ambientes, permanece com maior viabilidade até 3 horas após ser retirado da planta, podendo germinar após 72 horas, mas com baixa viabilidade (em torno de 5%). Vários meios líquidos e sólidos foram testados para germinação in vitro do pólen, contendo soluções de glicose, sacarose, galactose e lactose em várias concentrações, com e sem ácido bórico, sendo o melhor meio para a germinação de pólen de cupuaçuzeiro o que contém lactose 5%, ácido bórico a 0,01%, ágar a 1% e pH 6,1, no qual o pólen desenvolveu o tubo polínico em cerca de duas horas na temperatura ambiente entre 27°C e 30°C.

Termos para indexação: cupuaçu, *Theobroma grandiflorum*, germinação de pólen, cultura in vitro, polinização artificial, palinologia.

¹Eng.º Agr.º, M. Sc., Embrapa Amazônia Ocidental, Caixa Postal 319, CEP 69011-970, Manaus-AM.

²Eng.º Agr.º, M. Sc., Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, 96001-970, Pelotas-RS.

ABSTRACT

With objective of to development a methodology for in vitro germination of cupuassu pollen, any parameters were studied, like the characterization of five stadiums from opening of the cupuassu flowers; the determination of the large sample to count of pollen grains, that not is necessary to be larger than 300 grains. Was observed that pollen from stamen of the same flower didn't have uniform germination and that larger number of viable pollen grains happened on stadium E (about two hours after beginning the anthesis, when the flower were completely opened). After removed of the plant and maintained into environment conditions, the largest viability of pollen grains occur until after three hours and can germinate later up to 72 hours, but with low viability (about 5%). Several means to in vitro germination, liquids and solids, were tested with glucose, sucrose, galactose and lactose with several concentrations, with and without boric acid. The best mean to germination of cupuassu pollen was 5% lactose, 0,01% boric acid, 1% agar and pH 6,1, at 27°C to 30°C, where the pollen grains tubes developed after two hours.

Index terms: cupuassu, *Theobroma grandiflorum*, artificial pollination, pollen germination, in vitro culture, palynology.

TABELA 4. Variação do número de grãos de pólen germinados, provenientes de estames de cinco botões de uma mesma planta no estágio E. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

| Botão | Estame 1 | Estame 2 | Estame 3 | Estame 4 | Estame 5 | Média | C.V. |
|--------|------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------|
| 1 | 294 | 278 | 277 | 214 | 206 | 253,8 ^a | 16,02 |
| 3 | 271 | 244 | 188 | 188 | 101 | 198,4 ^{ab} | 32,91 |
| 4 | 241 | 170 | 170 | 93 | 68 | 148,4 ^{ab} | 46,49 |
| 2 | 270 | 170 | 149 | 66 | 49 | 140,8 ^{ab} | 63,16 |
| 5 | 224 | 100 | 85 | 83 | 2 | 98,8 ^b | 80,79 |
| Média* | 260 ^A | 192,4 ^{AB} | 173,8 ^{AB} | 128,8 ^B | 85,2 ^B | | |
| C.V. | 10,59 | 36,32 | 40,04 | 52,21 | 89,72 | | |

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de erro.

A diferença entre as médias da germinação do pólen de botões de uma mesma planta (Tabela 4) ocorreu, provavelmente, devido à posição em que se encontravam na planta, já que todos foram coletados no mesmo estágio da antese (E), portanto no mesmo estágio de maturação.

O pólen de cupuaçuzeiro germinou bem nos meios 1 e 6, compostos pelas soluções S₁₃ e S₁₆, respectivamente, não havendo diferença entre eles pelo teste Tukey a 5%, sendo que o meio 6, com lactose 5% + H₃BO₃ 0,01% + ágar 1%, mostrou-se ligeiramente melhor (Tabela 5).

Um detalhe importante não pode ser esquecido: quando for usar os meios 6 e 1, tanto em lâminas planas como em lâminas escavadas, o pólen deve ser distribuído sobre o meio de germinação, sem contato das anteras com o meio, fazendo-se ligeiras batidas com uma pinça ou bastão, na pinça de ponta fina que ostenta o filete do estame, para desprender o pólen da antera sobre o meio. Esse procedimento evita a formação de uma camada de material sólido composto de ágar-ágar, sobre o pólen, dificultando as suas trocas gasosas e oferecendo resistência mecânica ao desenvolvimento do tubo polínico.

O meio 6 foi conservado em geladeira por 83 dias, sem alteração, apresentando bons resultados na germinação dos grãos de pólen. O tubo polínico apresentou-se bastante desenvolvido após duas horas (Figura 2).

O teste para constatação do estágio que apresenta maior quantidade de pólen viável mostrou diferença significativa pelo teste Tukey com 5% de erro, entre a quantidade de pólen viável nos estádios B e E, e não mostrou diferença entre os estádios B e A e A e E, sendo este último ligeiramente superior (Tabela 3). Como a identificação do botão no estágio A requer certa prática, e o estágio B é de curta duração (menos de dez minutos em dias limpos), recomenda-se isolar o botão no estágio A, com material citado por Antonio *et al.* (1997), e, após cerca de duas horas, quando o botão atingir o estágio E, proceder a coleta deste para utilização do pólen nos testes de germinação ou na polinização controlada.

TABELA 3. Porcentagem média de grãos de pólen germinados, retirados de botões em três estádios diferentes da antese, coletados de cinco plantas com características fenotípicas distintas.

| Estádio | N. ^o grãos germinados | % Germinação* |
|---------|----------------------------------|---------------------|
| E | 215 | 71,77 ^A |
| A | 169 | 56,22 ^{AB} |
| B | 145 | 48,38 ^B |

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de erro. As porcentagens foram transformadas para $\text{asen}^{\circ}\text{x}/100$ (Gomes, 1987), antes de ser feito o teste de Tukey.

Os resultados do teste de germinação para verificar a variação do pólen dos cinco estames de uma mesma flor, com as porcentagens de germinação transformadas para $\text{asen}^{\circ}\text{x}/100$ (Gomes, 1987), apresentaram valores significativos para o teste F de Snedecor e o de Tukey com 5% de probabilidade de erro, alto coeficiente de variação (Tabela 4), e fizeram com que fosse adotado o procedimento de usar todos os estames de um mesmo botão, no preparo de uma lâmina para contagem dos grãos de pólen germinados.

INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Wild. Ex Spreng) é uma planta nativa da Amazônia, o qual se encontra nos primeiros estágios de melhoramento genético, e necessita que sua biologia reprodutiva seja conhecida, para que possa auxiliar no programa de melhoramento genético, por ser um fator importante na determinação dos procedimentos mais específicos desse programa (Allard, 1971; Poehlman, 1986).

Na aplicação de técnicas de polinização artificial, o conhecimento dos tempos de viabilidade do pólen e de receptividade do estigma é de fundamental importância para se obter, com sucesso, a fecundação da flor.

A germinação do grão de pólen depende de vários fatores como a pressão osmótica, a concentração e o tipo de açúcar, a consistência, a temperatura, a umidade, a presença de enzimas e fitohormônios no meio.

Muitos métodos são usados para verificar a fertilidade do pólen. Brown (1960) e Darlington & La Cour (1965) recomendam a técnica da coloração do citoplasma com azul de algodão e lactofenol; Lee (1967) utiliza a técnica do tetrazólio para verificar a respiração do grão de pólen, determinando assim sua fertilidade.

Gonçalves *et al.* (1982) utilizaram várias concentrações de sacarose, glicose, galactose, lactose e manitol, com e sem ácido bórico, para germinar pólen de *Hevea camarguana*. Paiva *et al.* (1983) avaliaram a viabilidade do pólen de cinco clones de seringueira, usando diferentes concentrações de sacarose, galactose, glicose e lactose, e concluíram que o melhor meio, para quatro desses clones, foi o que continha sacarose a 10% e 15%, e, para o outro, o com glicose a 10%, demonstrando haver variação do meio com o genótipo.

Hong-Qi & Croes (1983) observaram que altas concentrações de prolina conferiram maior germinação do pólen de *Lilium longiflorum* cv. Arai, em temperaturas desfavoráveis. Pálfi & Köves (1984) avaliaram a viabilidade do pólen de milho e de centeio pelo conteúdo de prolina, afirmando que a vitalidade e a fertilidade do pólen são proporcionais ao seu conteúdo.

Sousa (1988) encontrou maior porcentagem de germinação do pólen de quatro espécies de *Eucalyptus*, em meio contendo 30% de sacarose e 0,8% de ágar.

Miranda & Clement (1990) testaram meios com glicose a 2; 2,5; 3; 5; 7,5; 10; 11 e 12,5%, com e sem ácido bórico a 0,01%, e sacarose, lactose e galactose nas concentrações de 1,5; 2; 2,5; 3 e 3,5%, com e sem ácido bórico a 0,01%, para germinação de pólen de *Bactris gasipaes* H.B.K., obtendo os melhores resultados com sacarose a 2,5% e ácido bórico a 0,01%.

Barbosa *et al.* (1991) pesquisaram vários meios para germinação de pólen de pessegueiro e nectarineira, com concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% de sacarose e glicose mais solução salina de Murashige e Skoog, sacarose a 5% com ácido bórico nas concentrações de 0,1%; 0,01% e 0,001%, sendo que todos os meios continham ágar a 0,7%, e o pH foi mantido em 6,5, achando o melhor resultado com sacarose a 5% mais solução salina de Murashige e Skoog com ágar a 0,7% e pH de 6,5.

Lacerda *et al.* (1995) testaram sete concentrações de sacarose em meio líquido a 5, 10, 20, 25, 40 e 60% e oito meios sólidos em ambiente sob luz difusa, sob luz fluorescente de 40 W em ambiente e em estufa incubadora de luz fluorescente com 22°C ± 2°C, para germinar pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada, conseguindo o melhor resultado com sacarose 10% mais ágar 0,5% e 50 ppm de ácido bórico na estufa incubadora de luz fluorescente.

Neves *et al.* (1996) testaram quatro concentrações de galactose, glicose, lactose e sacarose, com e sem ácido bórico, para germinação do pólen de cubiuzeiro (*Solanum tojiro* Humb & Bonpl) e cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) alcançando maior germinação em 10%, 15% e 20% de sacarose após 25 horas, sem nenhum efeito do ácido bórico para as duas espécies.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para germinação in vitro do pólen de cupuaçuzeiro.

Eucalyptus spp. Todas as lâminas foram contadas em duplicata, contando-se 300 grãos em cada lâmina, e todos os resultados apresentados são a média dos grãos germinados das lâminas duplicatas.

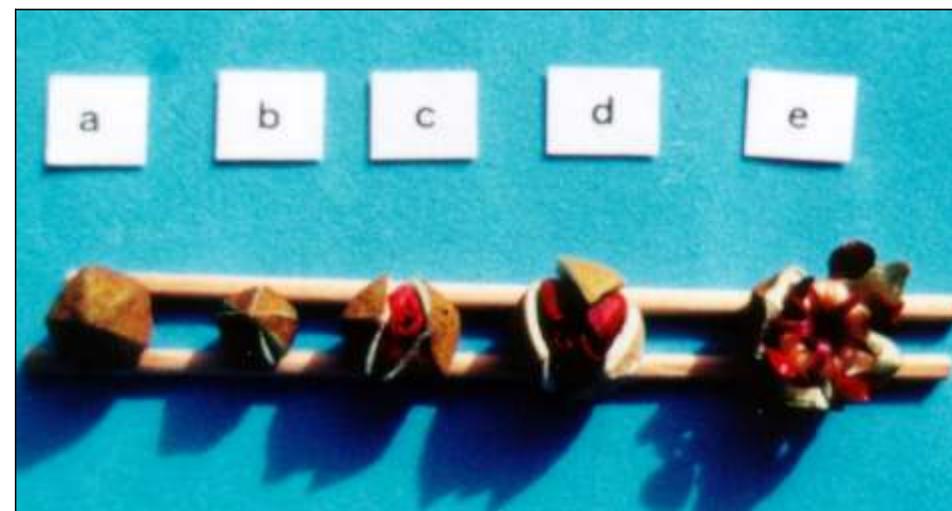


FIG. 1. Caracterização de cinco estádios da antese dos botões florais. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

TABELA 2. Variação da porcentagem de germinação dos grãos pólen, em quatro tamanhos de amostras de seis botões no estágio E, de uma mesma planta. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

| Grãos contados | Botão 1 | Botão 2 | Botão 3 | Botão 4 | Botão 5 | Botão 6 |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 300 ^A | 20,33 | 37,67 | 15,33 | 15,33 | 39,00 | 27,00 |
| 600 ^A | 23,33 | 38,17 | 19,67 | 15,17 | 45,00 | 26,00 |
| 900 ^A | 28,78 | 39,33 | 19,67 | 17,44 | 48,11 | 26,11 |
| 1.200 ^A | 31,58 | 39,17 | 18,08 | 17,42 | 45,25 | 28,08 |
| C.V. | 16,99 | 1,78 | 8,95 | 6,68 | 7,48 | 3,12 |

Obs: Para efetuar o teste de Tukey, as porcentagens foram transformadas para $\text{arcsen} \sqrt{x/100}$ (GOMES, 1987). Grãos contados, seguidos da mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey com 5% de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descrição que caracteriza cada um dos cinco estádios da antese observados em dia limpo é a seguinte: a- botão totalmente fechado, intumescido, pronto para iniciar a antese; b- botão apresentando pequeno desprendimento na união das sépalas, formando fendas; c- botão com desprendimento de pelo menos duas uniões de sépalas, podendo ser vista a expansão das pétalas sobrepostas formando uma barreira por cima do estilete-estigma; d- mais de duas uniões de sépalas desprendidas, expansão das pétalas começando a distender-se, formando um orifício em cima do estilete-estigma; e- todas as sépalas desprendidas, pétalas com a extensão distendida, estilete-estigma exposto, que ocorre cerca de duas horas após o início da antese (Figura 1). Essa descrição corresponde aos estádios de E_0 a E_5 , definidos por Sousa *et al.* (1995/1996). Em todos eles foi constatado pólen liberado pelas anteras.

Os resultados obtidos com os testes preliminares de germinação do pólen *in vitro* mostraram que os grãos germinaram nas soluções S_3 , S_4 , S_8 , S_9 , S_{13} , S_{16} , S_{32} , S_{33} , S_{36} , S_{39} , S_{40} , S_{41} , S_{44} e S_{48} (Tabela 1), sendo que, nas soluções S_8 e S_{33} , ocorreu rompimento do tubo polínico e, na S_{33} , a exina de muitos grãos rompeu-se. As soluções com 10% de açúcar, após duas horas, causaram plasmólise nos grãos de pólen, provavelmente o meio tornou-se mais concentrado que o citoplasma do pólen, com a evaporação.

Foram feitos mais testes preliminares sem contagem dos grãos germinados, com várias combinações dessas soluções. As soluções ou combinações destas, que apresentaram maior quantidade de pólen com tubo polínico bastante desenvolvido, foram eleitas para um teste de germinação com contagem de grãos, apresentado na Tabela 5.

O ensaio com pólen retirado de uma mesma planta no estádio E, para determinar o número de grãos de pólen a serem contados em cada lâmina, mostrou, na análise de variância feita com as porcentagens de germinação transformadas para $\text{asen}\bar{O}x/100$ (Gomes, 1987), valores não significativos para o teste F de Snedecor e Tukey com 5% de probabilidade de erro, nas contagens de 300, 600, 900 e 1.200 grãos de pólen germinados, contados por lâmina, definindo-se a contagem de 300 grãos por lâmina (Tabela 2). Este resultado assemelha-se ao obtido por Sousa (1988), que definiu a contagem de 300 grãos para pólen de

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e no Campo Experimental da EMBRAPA-CPAA, situados no km 29 da rodovia AM-010, município de Manaus (AM), entre as latitudes Sul $2^{\circ} 51' 07''$ e $2^{\circ} 54' 10''$ e longitudes Oeste $59^{\circ} 57' 20''$ e $60^{\circ} 01' 03''$. Em dias claros, foram caracterizados, no Campo, cinco estádios da antese e o que a precede; em todos eles, foi encontrado pólen liberado nas anteras.

No laboratório, foram feitos, inicialmente, testes preliminares sem contagem dos grãos de pólen germinados, com os açúcares lactose a 2,5%, com e sem ácido bórico, com ácido bórico e ágar a 0,1%; lactose a 3% e 4%; lactose, glicose, galactose e sacarose nas concentrações de 5% e 10%, com e sem ácido bórico a 0,01%, com e sem ágar a 0,25% e misturando com a solução estoque (S_1), na proporção de 1:1, além de outros meios (Tabela 1). Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada. As observações ao microscópio ótico foram feitas após duas e cinco horas. Os meios que apresentaram grãos germinados (formação de calo ou tubo polínico) foram testados novamente com contagem dos grãos germinados.

As amostras foram preparadas e contadas em duplicatas em placas de Kline, que eram colocadas sobre papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri, de vidro, com tampas. Na contagem dos grãos de pólen, definiu-se o tempo de germinação em torno de duas horas, tempo suficiente para o tubo polínico desenvolver-se. Com o tempo maior do que duas horas, o tubo pode desenvolver-se muito, dificultando a contagem. Para determinar o número de grãos a serem contados, foi realizado um ensaio com seis botões de uma mesma planta no estádio E. Procedeu-se a contagem em faixas alternadas, segundo a metodologia de Antonio (1985), em microscópio ótico, com objetiva 10/0,30 e ocular P16 12,25. Os resultados de germinação foram transformados para $\text{asen}\bar{O}x/100$ (Gomes, 1987).

Durante os testes preliminares sem contagem de pólen, observou-se que a germinação do pólen não era uniforme nos cinco estames de uma mesma flor, então realizou-se um teste de germinação com contagem de pólen, para verificar essa variação, usando-se cinco botões no estádio E, que foram coletados de uma mesma planta; cada estame foi retirado cuidadosamente junto com a cógula, com auxílio de uma pinça de ponta fina, colocando o pólen de cada estame para germinar em lâminas separadas, em meio com a solução S_4 (Tabela 1), tomando-se o cuidado de flambar a pinça após o preparo de cada lâmina.

Foi realizado um teste para constatar qual dos estádios da antese apresentava maior porcentagem de pólen viável; antes de serem testados os meios para germinação do pólen in vitro, com botões nos estádios A (fechado), B (no início da antese) e E (flor completamente aberta e isolada antes da antese, para evitar contaminações), procedeu-se análise de variância e teste Tukey, com 5% de erro.

A viabilidade do pólen foi testada de hora em hora, até seis horas, depois de ter sido retirado da planta e conservado no botão. Foram utilizadas três plantas com diferentes fenótipos, retirando-se dois botões de cada planta no estádio E, os quais foram isolados antes da antese, usando-se a técnica de isolamento descrita por Antonio *et al.* (1997). Um outro teste foi realizado para verificar a longevidade do pólen, usando-se dois botões de cinco plantas com diferentes fenótipos, que, depois de terem sido retirados das plantas, foram conservados em ambiente com temperatura de 27°C e 75% de umidade relativa do ar.

TABELA 1. Soluções de sais e soluções com açúcares, usadas no teste preliminar de germinação de grãos de pólen. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.

| SOLUÇÕES | COMPOSIÇÃO (PROPORÇÃO) |
|-----------------|---|
| S ₁ | 100ppm H ₃ BO ₃ + 300ppm CaCl ₂ + 100ppm K ₂ NO ₃ + 200ppm MgSO ₄ |
| S ₂ | Lactose 2,5% |
| S ₃ | Lactose 2,5% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₄ | Lactose 2,5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,1% |
| S ₅ | Lactose 3% |
| S ₆ | Lactose 4% |
| S ₇ | Lactose 5% |
| S ₈ | Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₉ | (Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01%) + S ₁ (1:1) |
| S ₁₀ | (Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,02%) + S ₁ (1:1) |
| S ₁₁ | (Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,03%) + S ₁ (1:1) |
| S ₁₂ | (Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,06%) + S ₁ (1:1) |
| S ₁₃ | Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25% |
| S ₁₄ | (Lactose 5% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₁₅ | (Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₁₆ | Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 1% |
| S ₁₇ | Lactose 10% |
| S ₁₈ | Lactose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% |

TABELA 1. Soluções de sais e soluções com açúcares, usadas no teste preliminar de germinação de grãos de pólen. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000. (Continuação)

| SOLUÇÕES | COMPOSIÇÃO (PROPORÇÃO) |
|-----------------|--|
| S ₁₉ | (Lactose 10% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₂₀ | (Lactose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₂₁ | Sacarose 5% |
| S ₂₂ | Sacarose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₂₃ | (Sacarose 5% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₂₄ | (Sacarose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01%) + S ₁ (1:1) |
| S ₂₅ | (Sacarose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₂₆ | Sacarose 10% |
| S ₂₇ | Sacarose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₂₈ | (Sacarose 10% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₂₉ | (Sacarose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₃₀ | Glicose 5% |
| S ₃₁ | Glicose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₃₂ | (Glicose 5% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₃₃ | (Glicose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₃₄ | Glicose 10% |
| S ₃₅ | Glicose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₃₆ | (Glicose 10% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₃₇ | (Glicose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₃₈ | Galactose 5% |
| S ₃₉ | Galactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01 % |
| S ₄₀ | Galactose 5% + S ₁ |
| S ₄₁ | (Galactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01%) + S ₁ (1:1) |
| S ₄₂ | (Galactose 5% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₄₃ | Galactose 10% |
| S ₄₄ | Galactose 10% + S ₁ |
| S ₄₅ | Galactose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% |
| S ₄₇ | (Galactose 10% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₄₈ | (Galactose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01%) + S ₁ (1:1) |
| S ₄₉ | (Galactose 10% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%) + S ₁ (1:1) |
| S ₅₀ | CaCl ₂ 0,03% |
| S ₅₁ | K ₂ NO ₃ 0,01% |
| S ₅₂ | K ₂ NO ₃ 0,02% |
| S ₅₃ | MgSO ₄ 0,02% |
| S ₅₄ | H ₂ BO ₃ 0,01% |