

Foto: Ana Léo



Procedimentos para a Conservação e Viabilidade de Grãos de Pólen de Coqueiro-gigante-do-Brasil-Praia-do-Forte

Ana da Silva Léo¹
Caroline de Araújo Machado²
Catrine Regina Feitosa Moura³
Semíramis Rabelo Ramalho Ramos⁴
Francisco Elías Ribeiro⁵
Fernanda Vidigal Duarte Souza⁶

O gênero *Cocos* é constituído apenas pela espécie *Cocos nucifera* L., a qual é composta de algumas variedades, entre as quais as mais importantes são: Typica (Var. Gigante) e Nana (Var. Anã). Os híbridos de coqueiro mais utilizados no Brasil e no mundo são resultantes dos cruzamentos entre essas variedades (COSTA e RIBEIRO, 2012). A Embrapa vem ao longo dos anos desenvolvendo e selecionando híbridos intervarietais de coqueiro. O coqueiro híbrido intervarietal Anão x Gigante, é uma cultivar de ampla utilidade comercial, podendo ser empregada para produções de água de coco e de fibras, e principalmente, para produção de polpa ou albúmen sólido. (COSTA e RIBEIRO, 2012). Na produção de híbridos a receptividade da flor feminina dura apenas 1 a 3 dias (KONAN et al., 2005) sendo imprescindível a disponibilidade de grãos de pólen viáveis.

Em palmeiras estudos sobre conservação e viabilidade de grãos de pólen tem recebido atenção especial devido à produção de híbridos, sendo realizado em grãos de pólen frescos e conservados sob baixas temperaturas (OLIVEIRA et al., 2001; SOUSA et al., 2010). Para coqueiro já foram publicados trabalhos com diferentes genótipos (ARMAENDARIZ et al., 2006; KARUN et

al., 2006; KARUN e SAJINI, 2010; MACHADO, 2012; MOURA, 2012).

Os principais fatores que podem afetar a viabilidade do pólen armazenado são a umidade e a temperatura de armazenamento e fatores genéticos e fisiológicos (GANESHAN et al., 2008). A viabilidade dos grãos de pólen do coqueiro Gigante Praia do Forte do Brasil (GBrPF) em temperatura ambiente após a abertura da espata cai de 89,94% até 51,34% durante nove dias (MOURA, 2012).

Dessa forma tem-se procurado desenvolver métodos de armazenamento em que os mesmos interfiram o mínimo possível nos propósitos de conservação. Neste contexto, estudos sobre viabilidade e conservação de grãos de pólen para uso em programas de melhoramento e produção de híbridos torna-se imprescindíveis. Estudos recentes da Embrapa Tabuleiros Costeiros registram viabilidades de grãos de pólen de acessos de coco acima de 80% por corante e por germinação do tubo polínico acima de 60%, dos 60 aos 730 dias de armazenamento em diferentes condições (MACHADO, 2012; 2013; MOURA, 2012).

¹Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

²Bióloga, mestre em Agroecossistemas, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, caroline_machado866@hotmail.com.

³Engenheira-agrônoma, mestre em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, catrinemoura@hotmail.com.

⁴Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, semiramis.ramos@embrapa.br.

⁵Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, elias.ribeiro@embrapa.br.

⁶Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Alamas, BA, fernanda.souza@embrapa.br.

O objetivo dessa publicação é descrever protocolo adequado de conservação e avaliação de grãos de pólen de coqueiro gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF) a partir de estudos conduzidos no laboratório de cultura de tecidos de plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Morfologia da inflorescência do coqueiro

O coqueiro possui inflorescências paniculadas, axilares, protegidas por brácteas grandes, denominadas espatas (Figura 1A). Após completar seu desenvolvimento (3 a 4 meses), a espata abre-se expondo a inflorescência formada pelo pedúnculo, espigas e flores (Figura 1B). Por ser uma planta monoica as flores masculinas e femininas (Figura 1C) estão presentes separadamente na mesma inflorescência (PASSOS, 1998).

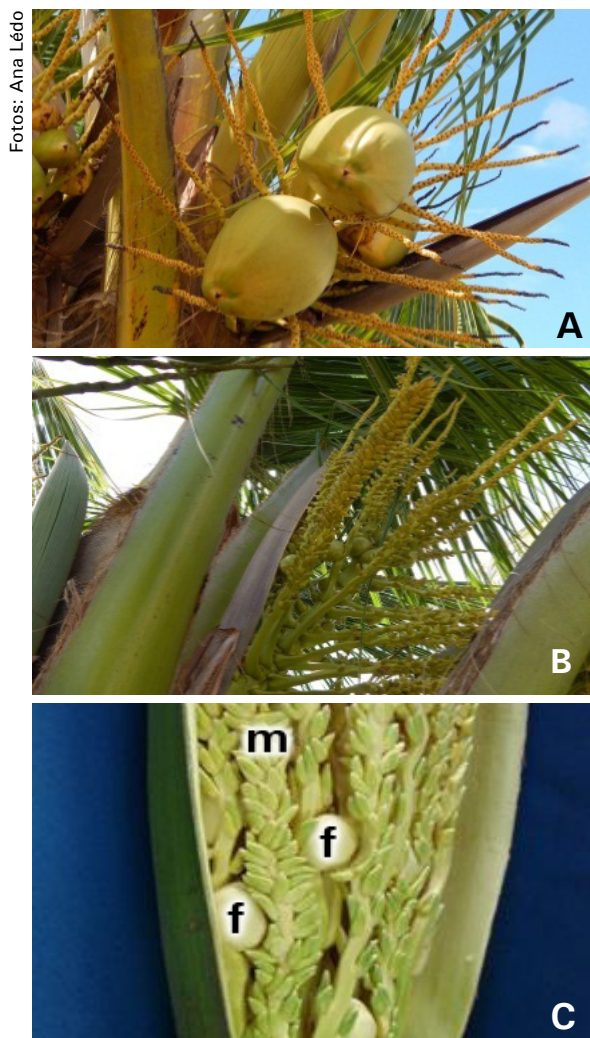


Figura 1. Inflorescência do coqueiro. A- Espata fechada e inflorescência com frutos; B- Espata aberta com espigas ou ráquias; C- Flores masculinas (m) e femininas (f).

Coleta do pólen

O florescimento do coqueiro ocorre o ano. Em média, um coqueiro produz 12 folhas e inflorescências por ano, porém o ritmo da emissão pode variar de 11 a 15 inflorescências (PASSOS, 1998).

Espatas fechadas em estágio de desenvolvimento próximo a maturação (3 a 4 meses) (Figura 2A) devem ser coletadas de plantas matrizes de acessos de coqueiro gigante do Brasil Praia do Forte (GBrPF) com características agrônômicas superiores e livres de pragas e doenças.

Obtenção e preparo dos grãos de pólen a serem conservados e armazenamento

No laboratório, as espatas devem ser mantidas em balde plástico com capacidade de 10L em condições de temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) até sua completa abertura, em torno de 3 a 5 dias.

As ráquias contendo as flores masculinas (Figura 2B) devem ser retiradas da inflorescência e mantidas em recipiente. Em seguida, com auxílio de espátula os grãos de pólen são cuidadosamente raspados das anteras (Figura 2C), mantidos em placa de Petri e acondicionados em criotubos (Figura 2D) para armazenamento em nitrogênio líquido, ou outro recipiente (vidro ou plástico) para armazenamento em congelador de geladeira a -4°C , em freezer a -20°C e ultrafreezer a -80°C . Apesar do grão de pólen do coqueiro GBrPF apresentar alta viabilidade (maior que 70%) até cinco dias após a coleta em temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), o acondicionamento deve ser realizado o mais rápido possível para garantir a qualidade do pólen.

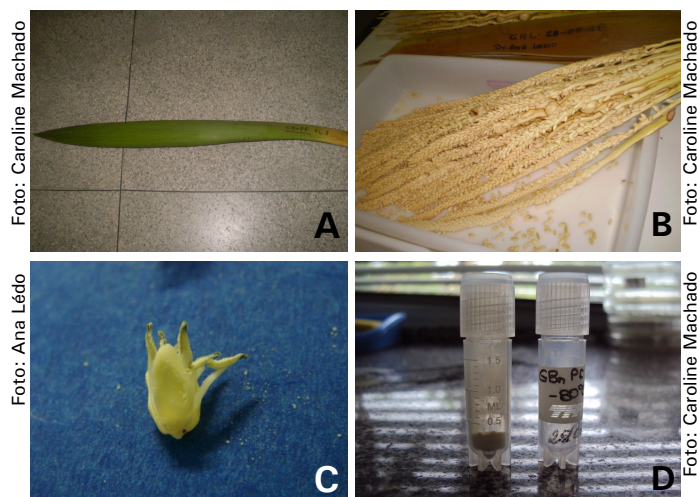


Figura 2. Etapas da obtenção e acondicionamento de grãos de pólen. A- Espata fechada; B- Ráquias com flores masculinas e femininas; C- Flor masculina com anteras impregnadas com grãos de pólen; e D- Acondicionamento dos grãos de pólen em criotubos.

Análises de viabilidade polínica

A análise de viabilidade é importante no processo de conservação, pois quanto maior a viabilidade inicial do pólen maiores as chances de sucesso no cruzamento com pólen conservado (AMARAL et al., 2012). A viabilidade do pólen pode ser avaliada por quatro métodos: (1) por

meio de corantes; (2) germinação in vitro; (3) germinação in vivo, e (4) porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste (GALETTA, 1983).

A seguir são descritas as metodologias para a avaliação da viabilidade por corante e por germinação in vitro do tubo polínico.

Avaliação da viabilidade polínica por germinação in vitro

Para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen, amostras são retiradas das condições de armazenamento e submetidas à reidratação por duas horas, em placa de Petri com papel filtro umedecido com água estéril (Figura 3A). Em seguida, os grãos de pólen são inoculados em placas de Petri contendo 2 mL de meio de cultura

de Lora (LORA et al., 2006) composto por 200 mg L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 300 mg L⁻¹ Ca(NO₃)O₂.4H₂O; 100 mg L⁻¹ KNO₃; 100 mg L⁻¹ H₃BO₃; 40 g L⁻¹ de sacarose (Figura 3B). As placas devem ser mantidas em incubadora biológica por 24 horas, na ausência de luz, em temperatura de 24 ± 1°C e umidade de 34% (Figura 3C).

Em microscópio estereoscópio, objetiva 10 a 40X, as placas de Petri são analisadas quanto ao número de grãos de pólen germinados (Figura 3D), preferencialmente com câmara digital acoplada para captura das imagens. Cada placa é dividida em quatro campos de avaliação correspondendo a quatro repetições (Figura 3E). São considerados como grãos de pólen germinados os que apresentarem comprimento do tubo polínico maior que seu o diâmetro (Figura 3F).

Fotos: Caroline Machado

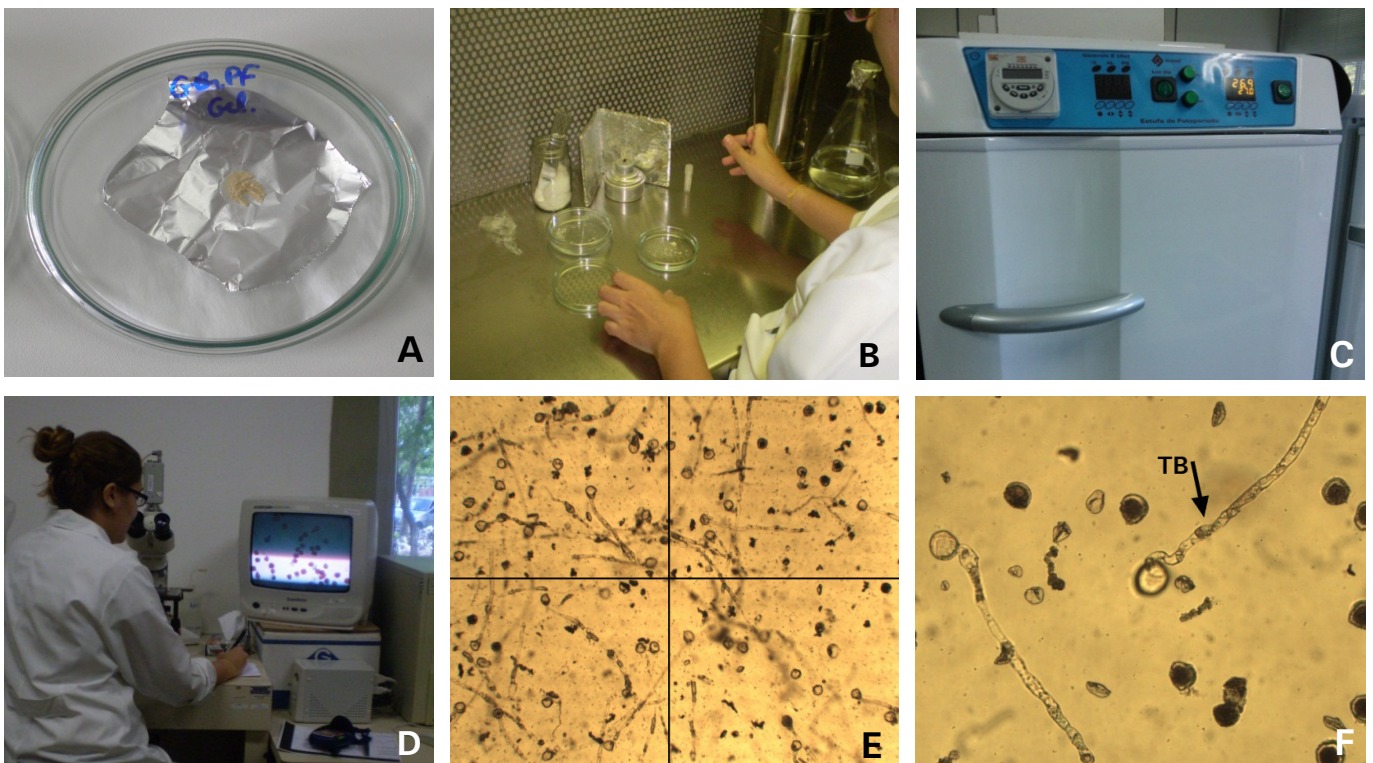


Figura 3. Etapas da avaliação da viabilidade de grãos de pólen por germinação in vitro do tubo polínico. A- reidratação de grãos de pólen em placa de Petri com papel filtro umedecido; B- Inoculação de grãos de pólen em meio líquido de Lora; C- Placas de Petri em incubadora biológica; D- Avaliação em microscópio Leica com captura de imagem; E- Avaliação da viabilidade de grãos de pólen por crescimento do tubo polínico; F- Detalhe do crescimento do tubo polínico (TP).

Avaliação da viabilidade polínica por corante

Para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen, amostras são retiradas das condições de armazenamento e submetidas à reidratação por duas horas, em câmara úmida (placa de Petri com papel de filtro úmido) na temperatura ambiente (Figura 4A). Para determinação da viabilidade por corante, uma amostra do pólen, com aproximadamente 0,02 gramas deve ser colocada em lâmina acrescentando-se uma gota de carmim acético 1%, homogeneizando-a e, em seguida, colocar lamínula

(Figura 4B). Em seguida, a lâmina é colocada em placa de Petri e mantida em incubadora biológica por 25 a 30 minutos em temperatura de 37 ± 1°C, na ausência de luz (Figura 4C).

Em microscópio estereoscópio, objetiva 10 a 40X, as lâminas são analisadas quanto ao número de grãos viáveis e inviáveis por quadrante (Figura 4D). Cada lâmina é dividida em quatro campos de avaliação correspondendo a quatro repetições (Figura 4E).

São considerados como grãos de pólen viáveis aqueles corados de vermelho (pela reação da presença de atividade enzimática) e com paredes intactas e como não viáveis os incolores ou corados de vermelho com rupturas das paredes (Figura 4F).

Cálculos da viabilidade de grãos de pólen

Para o cálculo da porcentagem de viabilidade é considerada a seguinte fórmula:

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

De acordo com Souza et al. (2002), valores acima de 70% são considerados como alta viabilidade do pólen, de 31 a 69% como média e até 30%, baixa.

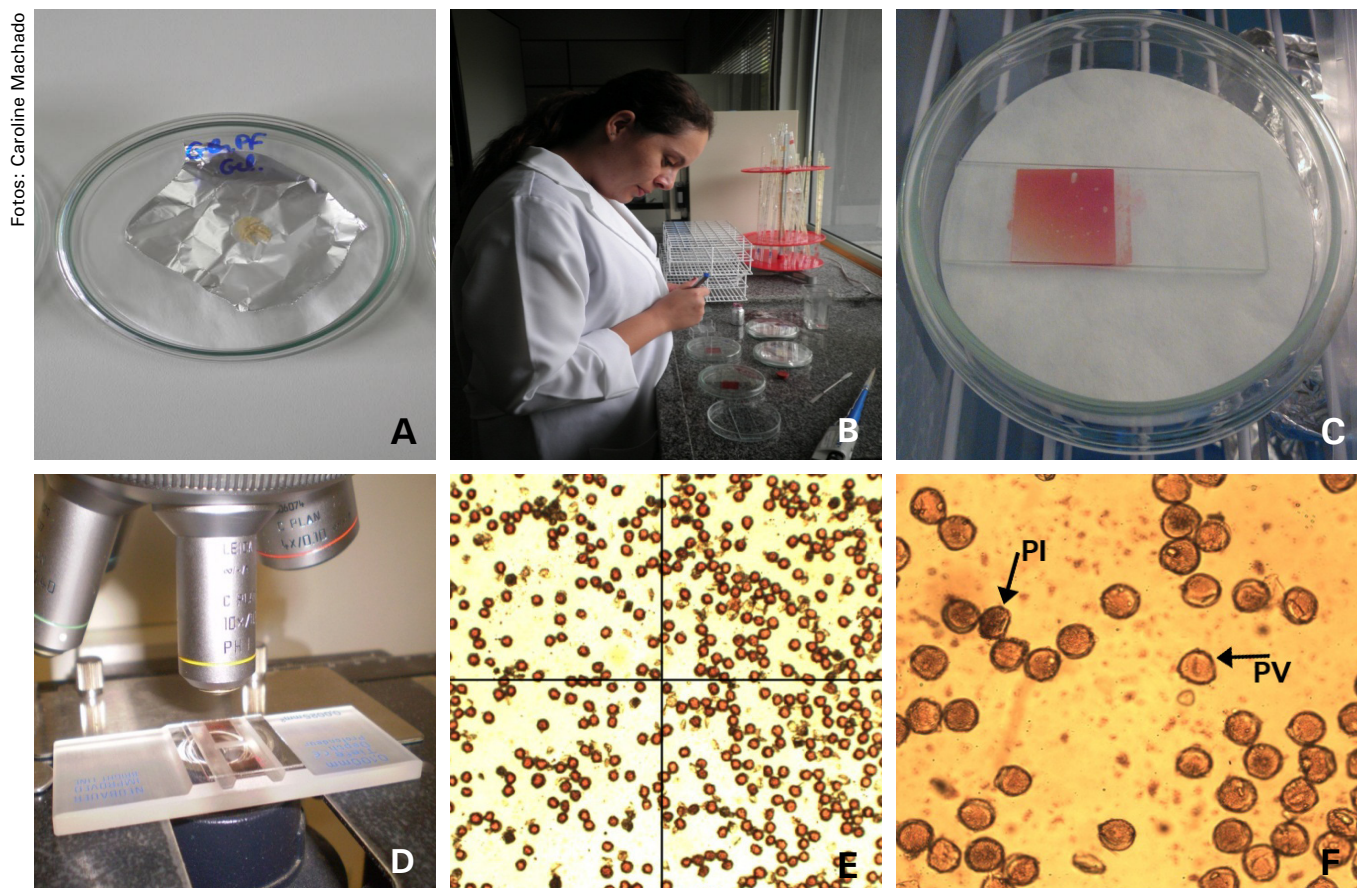


Figura 4. Etapas da avaliação da viabilidade de grãos de pólen por corante Carmim acético 1%. A- Reidratação de grãos de pólen em câmara úmida; B- Preparo de lâminas com carmim acético 1%; C- Placas de Petri em incubadora biológica; e D- Avaliação da viabilidade de grãos de pólen em microscópio; E- Avaliação da viabilidade de grãos de pólen; F- Detalhe da coloração dos grãos de pólen viáveis (PV) e inviáveis (PI).

Viabilidade de grãos de pólen do acesso GBrPF em diferentes temperaturas de armazenamento

A viabilidade média de grãos de pólen aos 60 dias é apresentada, na Tabela 1. Os grãos de pólen de coqueiro GBrPF apresentaram boa viabilidade quando armazenados em diferentes condições, com destaque para os armazenados em congelador de geladeira a -4°C , ultrafreezer a -80°C e em nitrogênio líquido (-196°C), que apresentaram alta viabilidade conforme escala de SOUZA et al. (2002). Observa-se, na Figura 5, a predominância de grãos de pólen corados com paredes celulares intactas em todas as condições de armazenamento.

Tabela 1. Porcentagem da viabilidade de grãos de pólen do acesso GBrPF por germinação do tubo polínico e coloração com carmim acético 1% em diferentes condições de armazenamento aos 60 dias.

Condições de armazenamento	Viabilidade (%)	
	Germinação	Carmim acético
Congelador de geladeira a -4°C	72,26	96,86
Freezer a -20°C	62,16	94,81
Ultrafreezer a -80°C	75,02	94,23
Nitrogênio líquido -196°C	81,93	89,93

Fotos: Catrine Moura

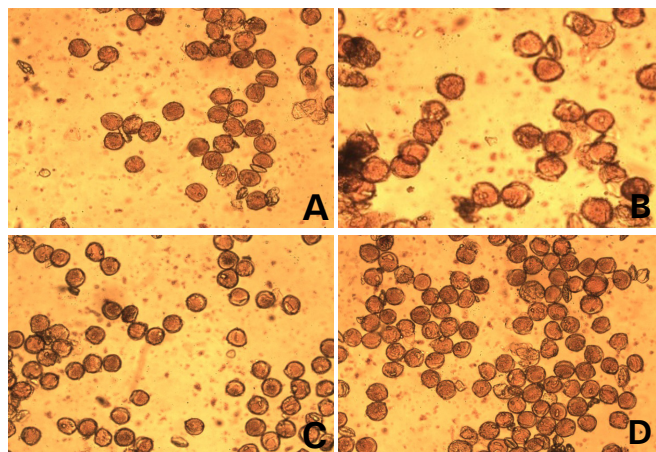


Figura 5. Aspecto geral dos grãos de pólen viáveis corados por carmim acético 1% do acesso GBrPF em quatro temperaturas de armazenamento (10x): A: -4°C ; B: -20°C; C: -80°C; D: -196°C.

Agradecimentos

À Embrapa, à Rede Internacional de Recursos Genéticos de Coco (COGENT/*Biodiversity International*) e ao PROBIO II/MMA, pelo apoio financeiro, e à CAPES/FAPITEC-SE pela concessão de bolsas.

Às pesquisadoras da Embrapa Floresta Ananda Virgínia de Aguiar e Valderes Aparecida de Sousa, pelas valiosas informações e aos assistentes de pesquisa Inácio Roque Andrade Junior, Erivaldo Moraes e Cleverton Santos, pelo apoio nas atividades de laboratório e coleta de material vegetativo.

Referências

ARMENDARIZ, B. H. C.; OROPEZA, C.; CHAN, J. L.; MAUST, B.; AGUILAR, C. C. C.; SÁENZ, L. Pollen fertility and female flower anatomy of micropropagated coconut palms. *Revista Fitotécnica Mexicana*, Chapingo, v. 29, n. 4, p. 373-378, 2006.

AMARAL, A.L.; SANTOS, J.M.; CAMARA, T.M.M.; BARBOSA, G.V.S. *Metodologia de conservação de pólen de cana-de-açúcar*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 12 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 127).

COSTA, E. F. N.; RIBEIRO, F. E. *Coqueiro híbrido: uma opção ao produtor*. Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2012. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=8512>>. Acesso em: 05 ago. 13.

GALETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Eds.). *Methods in fruit breeding*. Indiana: Purdue University Press, 1983. p.23-47.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of pollen. In: REED, B.M. (Ed.). *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, 2008. p. 443-447.

KARUN, A.; SAJINI, K. K. S.; NAIR, M.; KUMARAN, P. M.; SAMSUDHEEN, K. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen. *Journal of Plantation Crops*, Kasaragod, v. 3, n. 3, p. 568-571, 2006.

KARUN, A.; SAJINI, K. K. *Cryopreservation of coconut zygotic embryos and pollen*. Kasaragod: Central Plantation Crops Research Institute, 2010. 17 p. (Central Plantation Crops Research Institute. Technical Bulletin, 63).

KONAN, J.L.; BOURDEIX, R.; BATUGAL, P. Production and provision of hybrids seednuts. In: BATUGAL, P.; BENIGNO, D.; OLLIVER, J. (Eds.). *Coconut hybrids for smallholders*. Amsterdam: CFC/IPGRI/COGENT, 2005. p.12-25. (CFC. Technical Paper, 42).

LORA, M. A. J.; OTEYZA, P. de; FUENTETAJA, P.; HORMAZA, J. I. Low temperature storage and in vitro germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) pollen. *Scientia Horticulturae*, Córdoba, v. 1, p. 91-94, 2006.

MACHADO, C. A. *Estratégias para a conservação in vitro de acessos de coqueiro anão do BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros*. 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

MACHADO, C. A. ; MOURA, C.R.F. ; LEDO, A. S. ; RAMOS, S. R. R. Conservação de Grãos de Pólen de Coqueiro em Diferentes Condições de Armazenamento. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TABULEIROS COSTEIROS, 3., 2013, Aracaju, SE. **Anais...** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. p. 33-38.

MOURA, C. R. F. **Conservação in vitro de grãos de polén e embriões zigóticos de acessos de coqueiro gigante.** 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE.

OLIVEIRA, M. do S.; PADILHA, M.M.M.; KALUME, M.A. de A. Viabilidade de pólen in vivo e in vitro em genótipos de açaizeiro. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v.15, n.1, p.27-33, 2001.

PASSOS, E. E. M. Morfologia do coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Eds) **A cultura do coqueiro no Brasil.** Brasília: Embrapa-SPI; Aracaju: Embrapa-CAPTC, 1998. p. 57-64.

SOUSA, V.A.; SCHEMBERG, E.A.; AGUIAR, A.V. Germinação in vitro do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 86, p.147-151, 2010.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1209-1217, 2002.

Comunicado Técnico, 133

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CP 44,
CEP 49025-040, Aracaju - SE.
Phone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
E-mail: sac@cpatc.embrapa.br
Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2013/cot_133.pdf

1ª edição (2013)

Comitê de publicações

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*
Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*
Membros: *Alexandre Nizio Maria, Ana da Silva Lédo, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Josué Francisco da Silva Junior, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo, Julio Roberto de Araujo Amorim*
Supervisora editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*
Tratamento das ilustrações: *José Gabriel Santos*
Editoração eletrônica: *José Gabriel Santos*

Expediente