



## **Conservação *in vitro* de grãos de pólen de mangabeira em diferentes condições de armazenamento**

### ***In vitro* conservation of mangabeira pollen grains in different storage conditions**

DOI: 10.55905/oelv21n10-087

Recebimento dos originais: 08/09/2023

Aceitação para publicação: 10/10/2023

#### **Letícia Bispo da Rocha**

Mestranda em Agricultura e Biodiversidade

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Avenida Marechal

Rondon, s/nº, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, CEP: 77410-53

E-mail: leticiaroachbd@gmail.com

#### **Gilmara da Silva Freire**

Doutoranda em Agricultura e Biodiversidade

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Endereço: Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Avenida Marechal

Rondon, s/nº, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão - SE, CEP: 77410-53

E-mail: gilfreire21@hotmail.com

#### **Ana Veruska Cruz da Silva**

Doutora em Agronomia

Instituição: Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Governador Paulo Barreto de Menezes, 3250, Jardins, Aracaju - SE,

CEP: 49025-040

E-mail: ana.veruska@embrapa.br

#### **Ana da Silva Léo**

Doutora em Agronomia

Instituição: Embrapa Tabuleiros Costeiros

Endereço: Avenida Governador Paulo Barreto de Menezes, 3250, Jardins, Aracaju - SE,

CEP: 49025-040

E-mail: ana.ledo@embrapa.br

### **RESUMO**

Técnicas complementares de conservação como a criopreservação, representam uma opção segura e econômica para a conservação em longo prazo de germoplasma de espécies de sementes não ortodoxas, como é o caso da mangabeira. O sucesso da conservação do pólen depende de vários fatores, como o estágio fenológico da flor, a



temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, assim como o seu próprio grau de umidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade *in vitro* do pólen desidratado de mangabeira em temperatura ambiente e a conservação em temperaturas baixas. As inflorescências de quatro acessos foram coletadas do Banco de Germoplasma de Mangaba (acessos CP, GU, IP e PA), localizado no município de Itaporanga d'Ajuda, Sergipe, Brasil. O experimento foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros. As inflorescências em pré-antese foram coletadas e, em laboratório, abertas cortando-se a parte do receptáculo até o pedicelo. Os grãos de pólen foram retirados das anteras com auxílio de um bisturi e pinça e inoculados em placas de Petri com meio de cultura de Lora, mantidos em temperatura ambiente por 0, 24, 48 e 72 horas. Para estudos de conservação foram colocados em criotubos para e armazenados no ultrafreezer (-20 °C e -80 °C), freezer (-4 °C) e nitrogênio líquido (-196 °C). Os dados da viabilidade do pólen dos ensaios foram submetidos à análise da variância pelo teste F a 5% de significância. Para os fatores qualitativos (acesso e condições de armazenamento) as médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. Para os fatores quantitativos (tempo de desidratação) foram estimadas equações de regressão. Os resultados obtidos em relação à viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen em temperatura ambiente demonstraram que os acessos CP e PA tiveram comportamento semelhante com as maiores porcentagens de germinação. O acesso CP teve a viabilidade máxima de 79,08% no tempo de 24h, a porcentagem do acesso PA foi de 72,12% no tempo 0. Em relação à conservação, as maiores médias de viabilidade por crescimento do tubo polínico foram observadas no acesso IP, com 53,38% e CP, com 38,34% a - 80 °C após 72h de desidratação inicial das flores em sílica gel.

**Palavras-chave:** *Hancornia speciosa*, criopreservação, tubo polínico.

## ABSTRACT

Complementary conservation techniques such as cryopreservation, represent a safe and economical option for the long-term conservation of germplasm of non-orthodox seed species, such as in the case of mangabeira. The success of pollen conservation depends on several factors, such as the phenological stage of the flower, the temperature and relative humidity of the storage environment, as well as its own level of humidity. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* viability of dehydrated mangabeira pollen grain at room temperature and its conservation at low temperatures. The inflorescences of four accessions collected from the Mangaba Germplasm Bank (accessions CP, GU, IP and PA), located in the municipality of Itaporanga d'Ajuda, Sergipe, Brasil. The experiment was carried out in the Plant Tissue Culture Laboratory of Embrapa Tabuleiros Costeiros. The inflorescences are initially formed in pigtailed and, in the laboratory, open by cutting them apart from the attached receptacle or pedicel. The pollen grains were removed from the anthers with the help of a scalpel and tweezers and inoculated in Petri dishes with Lora culture medium, kept at room temperature for 0, 24, 48 and 72 hours. For conservation studies, the tubes are placed in cryotubes for use in ultrafreezer (-20 °C and -80 °C), freezer (-4 °C) and liquid nitrogen (-196 °C). The data are given for the viability of the pollen in two tests submitted to the analysis of the variation by test F at 5% significance. For the qualitative factors (accessions and

temperatures) the averages compared with the Tukey test 5% probability. For quantitative factors (dehydration times) were estimated regression equations. The results obtained in relation to viability *in vitro* at room temperature demonstrate that the CP and PA accessions have similar behavior with the highest percentages of germination. The CP accession has a maximum viability of 79.08% at a time of 24 h, the percentage of PA access was 72.12% at a time of 0. In relation to conservation, the highest viability means by pollen tube growth were observed for IP accession, with 53.38% and CP, with 38.34% at - 80 °C after 72 hours of initial dehydration of the flowers in silica gel.

**Keywords:** *Hancornia speciosa*, criopreservação, polinic tube.

## 1 INTRODUÇÃO

A *Hancornia speciosa* é uma espécie frutífera de clima tropical e nativa do Brasil, sendo seu fruto conhecido popularmente como mangaba. A mangabeira apresenta alto potencial de uso na indústria alimentícia e medicinal. A espécie é listada entre as dez frutíferas nativa com maior potencial de uso imediato no Brasil pelo programa “Plantas do Futuro”, desenvolvido em parceria Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Banco Mundial/*Global Environment Facility*/ Ministério do Meio Ambiente/Projeto de Conservação e Uso Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (SILVA JUNIOR et al., 2018).

A mangabeira, apesar de ampla distribuição por quase todo o território brasileiro, vem sofrendo uma drástica redução populacional em função da intensa diminuição na área original dos ecossistemas em que ocorre, principalmente nos Tabuleiros Costeiros e Baixadas Litorâneas nordestinas, pois são regiões em que há intenso processo de desmatamento. Em decorrência disso, a conservação de germoplasma de mangabeira em campo tem sido realizada instituições de pesquisa e ensino nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Entretanto, técnicas complementares á conservação em campo devem ser desenvolvidas, principalmente para espécies recalcitrantes como é o caso da mangabeira.

O armazenamento de grãos de pólen é uma estratégia de conservação útil para programas de melhoramento genético em cruzamentos controlados de plantas com flores (ASSIS et al., 1993). A vantagem deste tipo de conservação é demandar um pequeno espaço físico para a manutenção de coleções (SOUSA-LANG e PINTO JÚNIOR, 1997).

O desenvolvimento de métodos confiáveis para determinar a qualidade funcional do pólen ajuda a monitorar a viabilidade do pólen durante o armazenamento e inclui estudos de interação do pólen com o estigma, otimização de meios de cultura, bem como estudos de incompatibilidade e fertilidade (SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992). A viabilidade do pólen pode ser avaliada pelo uso de corantes, germinação *in vitro* do tubo polínico; germinação *in vivo* e porcentagem de formação efetiva de frutos obtida por polinização (GALETTA, 1983). A germinação *in vitro* do tubo polínico é eficiente e oferece resultados rápidos (EINHARDT et al., 2006).

O sucesso da conservação do pólen depende de vários fatores, como o estágio fisiológico da flor, a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, assim como do grau de umidade do grão de pólen (GIORDANO et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade *in vitro* do pólen desidratado de mangabeira em temperatura ambiente e a conservação em temperaturas baixas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As inflorescências no estágio de pré-antese de quatro acessos de mangabeira foram coletadas do Banco de Germoplasma de Mangaba (Tabela 1), localizado no município de Itaporanga d'Ajuda, SE, Brasil e, em seguida, encaminhadas para o laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil.

Tabela 1: Acessos de mangabeira do BAG Mangaba da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil.

Código do acesso	Origem
CP – Capoã	Barra dos Coqueiros, SE
IP – Ipiranguinha	Conde, PB
GU – Guaiamum	Sirinhaém, PE
PA – Paratibe	João Pessoa, PB

Fonte: Autores

Após a coleta, as flores foram colocadas em caixas com vedação juntamente com sílica gel para a desidratação dos grãos de pólen, em incubadora biológica a  $27 \pm 2$  °C por 24 horas.

As inflorescências foram abertas cortando-se a parte do receptáculo até o pedicelo e os grãos de pólen foram retirados das anteras com auxílio de um bisturi e pinça. Em seguida, foram inoculados imediatamente em placas de Petri contendo meio de cultura de Lora et al. (2006), composto por: 200 mg de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 300 mg de  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 100 mg de  $KNO_3$ ; 100 mg de  $H_3BO_3$  e 40 g de sacarose, com pH ajustado para 5,8. Os meios de cultura foram mantidos em temperatura ambiente para avaliações nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.

Os grãos de pólen também foram colocados em criotubos para o ensaio de conservação à baixa temperatura: ultrafreezer ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$  e  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ), freezer ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) e nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^\circ\text{C}$ ). Após 15 dias, os criotubos foram descongelados em banho-maria e, em seguida, os grãos de pólen foram inoculados em meio de Lora para a avaliação da sua viabilidade.

Para determinação da viabilidade por germinação *in vitro* do tubo polínico, amostras (0,0005 gramas) foram inoculadas em placas de Petri contendo 2 mL do meio de cultura de Lora et al. (2006). As placas de Petri (80 mm, Labomax Inc.) foram mantidas em incubadora por 24 horas a temperatura de  $27 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ . As placas de Petri foram analisadas quanto ao número de grãos de pólen germinados em microscópio (modelo DMSL, Leica, Bernsheim, Alemanha) com ampliação de 10x com câmera digital (modelo Moticam C2300, Motic Instruments, Hong Kong, China). Os grãos de pólen foram considerados germinados quando apresentavam comprimento do tubo polínico duas vezes maior que o diâmetro (PIO et al., 2004). Para obtenção da viabilidade *in vitro*, foi utilizada a seguinte fórmula: Viabilidade *in vitro* (%) = [(número de grãos de pólen germinados/número total de grãos de pólen) x 100].

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 x 4 (quatro acessos x quatro tempos de desidratação x quatro temperaturas de armazenamento) e quatro repetições, composta de uma placa de Petri com quatro campos de contagem, denominadas de quadrantes.

Os dados da viabilidade do pólen dos ensaios foram submetidos à análise da variância pelo teste F a 5% de significância. Para os fatores qualitativos (acesso e condições de armazenamento) as medias foram comparadas pelo teste de Tukey 5% de

probabilidade. Para os fatores quantitativos (tempo) foram estimadas equações de regressão. Foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação do tubo polínico *in vitro* de mangabeira foi facilmente detectada em microscópio com bom desenvolvimento em temperatura ambiente (Figura 1).

Figura 1: Germinação do tubo polínico de grãos de pólen de mangabeira em meio de cultura de Lora em temperatura ambiente.



Fonte: Autores

Houve diferenças significativas ( $F < 0,05$ ) para os acessos e tempos de desidratação em sílica gel na viabilidade *in vitro* à temperatura ambiente e entre os dois fatores (Tabela 2). Os acessos IP e PA apresentaram no tempo 0 as maiores porcentagens de germinação, seguidos do acesso CP (71,30; 72,12 e 65,50%, respectivamente). A partir de 24 horas de desidratação o acesso IP teve drástica redução na sua viabilidade apresentando um comportamento quadrático (Figura 2). Até 48 horas de desidratação, os acessos CP e PA mantiveram boa viabilidade (59,43 e 50,94%, respectivamente) com redução após esse período, seguindo um comportamento quadrático.

Tabela 2: Porcentagem da viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de acessos de mangabeira à temperatura ambiente em função do tempo de desidratação.

Tempo de desidratação (Horas)	Acessos			
	CP	GU	IP	PA
0	65,50Bb	42,00Cb	71,30a	72,12Aa
24	79,08Aa	58,83Ba	13,86Cb	63,70Ba
48	59,43Ab	9,80Cc	10,58Cb	50,95Bb
72	6,65Ac	5,27Ac	5,18Ac	3,84Ac

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

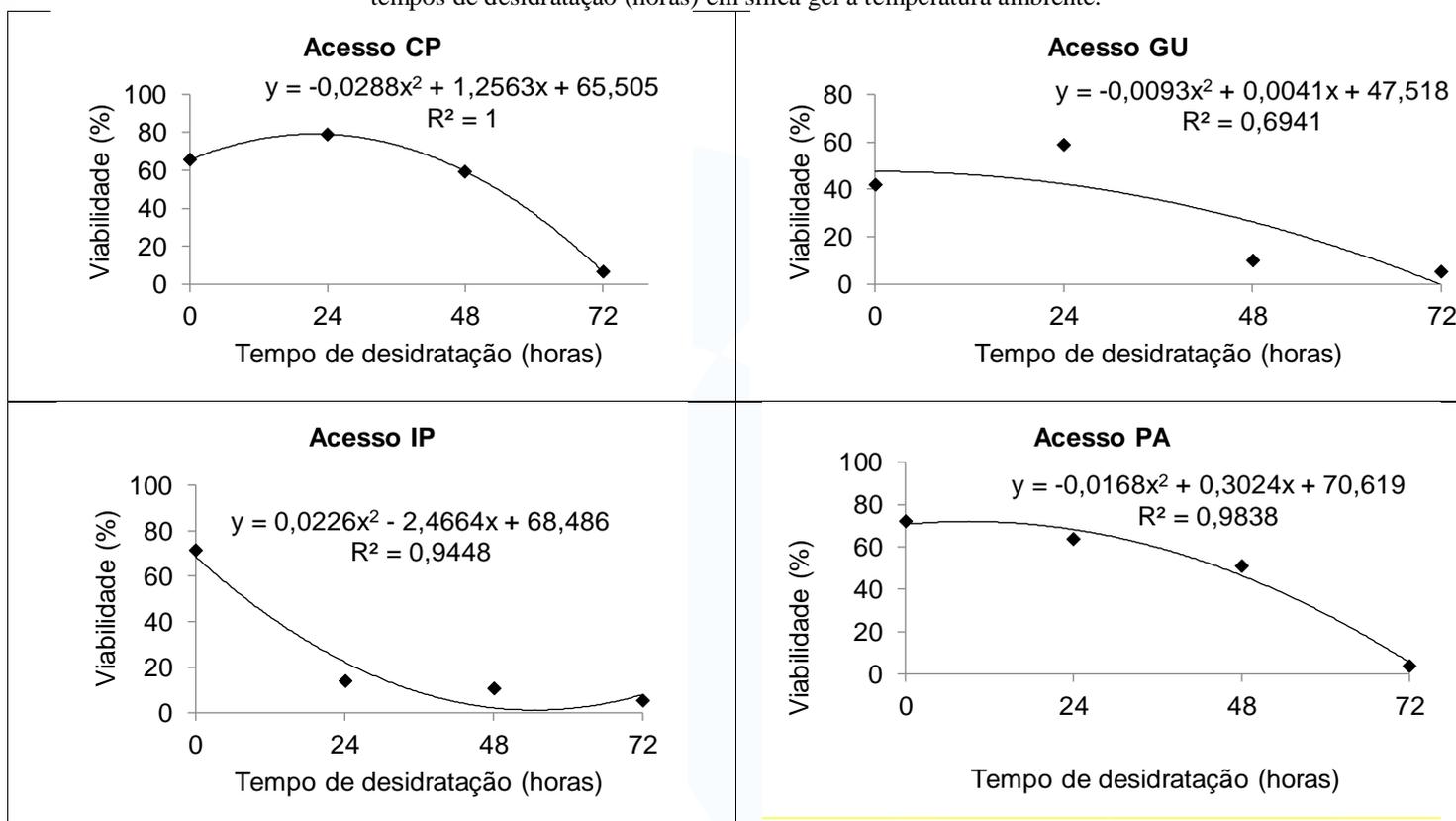
Fonte: Autores



Segundo Souza et al. (2002), valores acima de 70% são considerados de alta viabilidade polínica; de 31 a 69% como intermediário e até 30% como baixa viabilidade polínica. Após 72h, todos os acessos tiveram viabilidade muito baixa, em função da alta desidratação das inflorescências. Foi observada a oxidação dos grãos de pólen com a sua inviabilidade registrada pelas baixas porcentagens de viabilidade *in vitro*. Conforme relatos de Passos et al. (2012) à medida que se submete o pólen ao tratamento de desidratação, a viabilidade cai drasticamente, comprometendo severamente qualquer tentativa de conservação, nestas condições. Prováveis danos à membrana, causados pelo tratamento de desidratação, podem estar relacionados e esta queda abrupta da viabilidade com a manutenção de um teor de umidade considerado ainda relativamente alto.

Santos-Serejo et al. (2012) em estudos com grãos de pólen de bananeira, observaram que a porcentagem de germinação *in vitro* reduziu à medida que a umidade diminuiu, sendo que somente 28,26% dos grãos de pólen germinaram *in vitro* após a desidratação em sílica por 60 min. Vale et al. (2009), afirmam que, os grãos de pólen de bacuri, apresentam dificuldade na secagem, devido a presença de substância oleosa que aglomera os grãos numa massa viscosa, dificultando sua secagem e, como consequência, seu armazenamento por períodos mais longos. Este fato pode ser considerado para a mangabeira que apresenta látex o que dificulta os processos de desidratação, bem como de armazenamento em baixas temperaturas.

Figura 2: Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen (%) de acessos de mangabeira em função de diferentes tempos de desidratação (horas) em sílica gel à temperatura ambiente.



Fonte: Autores

Em relação à conservação dos grãos de pólen em baixas temperaturas, a maior viabilidade foi alcançada na temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  combinando com tempo de desidratação de 72h. Os acessos IP e CP apresentam média viabilidade polínica (53,38 e 38,84%, respectivamente) após 72 horas de desidratação à temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nas demais combinações acesso e tempo de desidratação não houve a germinação do tubo polínico.

Apesar de o acesso IP ter apresentado baixa viabilidade à temperatura ambiente, a baixa temperatura ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pode ter contribuído para a redução de processos metabólicos e, conseqüentemente, a oxidação, possibilitando a germinação *in vitro* após a conservação.



Os resultados obtidos sugerem que a metodologia de desidratação de grãos de pólen em sílica gel é promissora para o protocolo de conservação *in vitro* a baixas temperaturas.

#### 4 CONCLUSÕES

Existe variação entre acessos quanto à viabilidade polínica *in vitro* por meio da germinação do tubo polínico em temperatura ambiente e conservação à baixas temperaturas.

O acesso CP, apresenta alta viabilidade polínica após 24 horas de desidratação e o IP e GU média viabilidade. Os acessos CP e IP apresentam média viabilidade polínica até 48 horas de desidratação em sílica gel à temperatura ambiente.

Os acessos IP e CP apresentam média viabilidade polínica após 72 horas de desidratação à temperatura de -80 °C e podem ser conservados à baixa temperatura.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, T. F.; BAUER, J. F.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de Eucalyptus por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, v. 3, n. 1, p. 161-170, 1993.

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, 69f. Tese (Doutorado) - Pós Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

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

GIORDANO, L. B.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Melhoramento genético do tomateiro. **Informe Agropecuário**, v. 24, n. 219, p. 43-57, 2003.

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**, v. 1, p. 91-94, 2006.

PASSOS, R. R.; VIEIRA, L. de J.; OLIVEIRA, T. da S.; SANTANA, J. R. F.; LEDO, C. A. da; ALVES, A. A. C.; SOUZA, F. V. D. Desidratação de grãos de pólen de diferentes subespécies de *M. esculenta*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 2., Belém, **Anais...** 2010.

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germinação in vitro de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 3, p. 293-296, 2004.

SANTOS-SEREJO, J. A.; MENEZES, M. C.; SOUZA, F. V. D. Efeito da desidratação na viabilidade de pólen de bananeira. **Anais...** Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, Belém, PA. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

SHIVANNA, R. K.; RANGASWAMY, S. N. **Pollen biology**. New Delhi: Laboratory Manual, p. 23-31, 1992.

SILVA JUNIOR, J. F. da; LEDO, A. da S.; SILVA, A. V. C.; FERREIRA, E. G.; MOTA D. M. da; ALVES, R. E.; LEMOS, E. E. P. de. *Hancornia speciosa* mangaba, In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Org.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial plantas para o futuro: região Nordeste**. 2ed. Brasília: MMA, 2018, p. 177-192.



SOUSA-LANG, V, A.; PINTO JUNIOR, J. E. Efeito da concentração de ágar na germinação in vitro de pólen de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O, Kuntze, **Boletim de Pesquisa Florestal**, n,3 4, p, 55-63,1997.

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**, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.