

TÉCNICA PARA GERMINAÇÃO DO PÓLEN DE CUPUAÇUZEIRO, EM LABORATÓRIO.

Isaac Cohen Antonio¹, Nelcimar Reis Sousa¹, Cley Donizeti Martins Nunes² e Sergio de Araújo Silva³.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da biologia reprodutiva pode ser um importante fator para auxiliar no programa de melhoramento genético. Quando se utilizam técnicas de polinização artificial, o conhecimento da viabilidade do pólen é de fundamental importância na determinação dos procedimentos mais específicos, para se obter com sucesso a fecundação da flor. O sucesso da 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, que podem ser observados nos trabalhos de Brown (1960), Darlington & La Cour (1969), Lee (1967), Gonçalves et al. (1982), Paiva et al. (1983), Hong-Qi & Croes (1983), Pálfi & Köves (1984), Sousa (1988), Miranda & Clement (1990), Barbosa et al. (1991), Lacerda et al. (1995) e Neves et al. (1997)

Antonio et al. (2000), testaram 54 soluções e encontraram um excelente meio para germinação do pólen do cupuaçuzeiro, constituído de Lactose 5 %, mais ágar 1 % e ácido bórico a 0,01 %. Este trabalho tem como objetivo descrever a técnica inédita do preparo da solução e do meio para a germinação do pólen de cupuaçuzeiro usada por Antonio et al. (2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Devido à inexistência de uma técnica para germinação do pólen de cupuaçuzeiro, foram feitos vários testes no Laboratório de Fisiologia da Embrapa Amazônia Ocidental, sem contagem dos grãos germinados, usando 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 uma solução estoque, na proporção de 1:1. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada. As observações ao microscópio ótico foram feitas após 2 e 5 horas.

As amostras foram preparadas em placas de Kline, que eram colocadas sobre papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri de vidro, com tampas. Para contagem dos grãos de pólen germinados, definiu-se o tempo de germinação em torno de 2 horas, que foi o tempo suficiente para o tubo polínico desenvolver-se. Acima de 2 horas, o tubo pode desenvolver-se muito, formando um emaranhado que dificulta a contagem. A contagem, foi efetuada usando microscópio ótico, com objetiva 10/0.30 e ocular P16 \times 12.25, em faixas alternadas, segundo a metodologia de ANTONIO (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A solução base usada por Antonio et al. (2000) para a germinação do pólen de cupuaçuzeiro, pode proporcionar até 100 % de germinação. É elaborada da seguinte forma: 1- Pesa-se em balança com precisão de 1 mg: 5 g de lactose, 1 g de ágar e 10 mg de ácido bórico. 2- Em seguida, adiciona-se o ágar em um Elenmeyer com aproximadamente 90 ml de água destilada e deionizada, coloca-se em uma placa aquecedora elétrica (Figura 1), sem deixar a água ferver, até completa diluição do ágar. 3- Adiciona-se a lactose e o ácido bórico à solução, completa-se o volume até 100 ml e agita-se com um bastão magnético, em um aquecedor e agitador magnético, até a completa diluição do açúcar e

do ácido. Esta solução pode ser conservada em geladeira por volta de 90 dias, sem perder suas propriedades e mantendo seu pH de 6,1.

Os procedimentos para a preparação do meio para a germinação dos grãos de pólen são os seguintes: 1- Aquecer a solução de lactose 5% + ágar 1 % + H₃BO₃ em aquecedor elétrico até liquefação da solução (Figura 1). 2- Enquanto a solução está sendo aquecida para liquefação, colocar uma Placa de Kline sobre um papel de filtro umedecido dentro de uma placa de Petri, apoiadas nas extremidades por quatro lâminas de microscópio, sobreposta, sendo duas de cada lado da Placa de Kline (Figura 2). 3- Com auxílio de uma pipeta, colocar em cada uma das escavação da placa de Kline, 2 a 3 gotas da solução liquefeita de lactose 5% + ágar 1 % + H₃BO₃ (Figura 3). 4- Esperar a solução esfriar e solidificar na Placa de Kline. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, retirar cuidadosamente o estame com pólen liberado na antera (Figura 5) de botões florais no estágio A a E descritos por Antonio et al. (2000), que devem ser usados no teste de germinação, até duas horas depois de coletados da planta (Figura 4). 5- Com auxílio de um bastão, efetuar ligeiras batidas na pinça com o estame, para que o pólen se desprenda da antera e caia sobre a solução sólida e fria (Figura 6). Cada amostra deve ser constituída por pólen de todas as 5 anteras do botão floral, devido variações na germinação de botões, encontradas por Antonio et al. (2000). 6- Esperar cerca de duas horas em ambiente com temperatura entre 27⁰ a 30⁰ C, para fazer a verificação da germinação em microscópio ótico (Figura 7).

Figura 1 . Solução recomendada por Antonio et al. (2000) pré-aquecendo para uso.



Figura 3 . Adição de 2 a 3 gotas da solução de Antonio et al. (2000) pré-aquecida, para germinação do pólen.



Figura 2 - Placa de Kline dentro da placa de Petri, sobre papel de filtro umedecido e lâminas de microscópio.

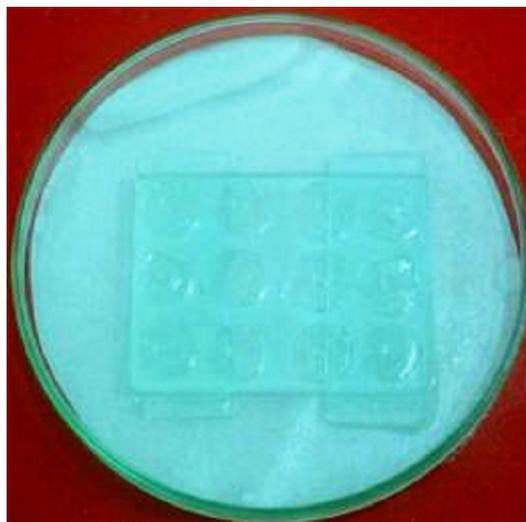


Figura 4 - Botões florais com pólen liberado nas anteras, usados até duas horas depois de coletados da planta.



Figura 5 - Retirada do estame com pólen liberado na antera.

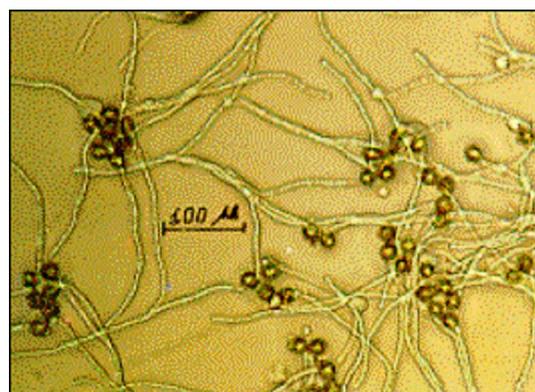




Figura 6 . Desprendimento do pólen obre a solução sólida e fria nas escavações da Placa de Kline.

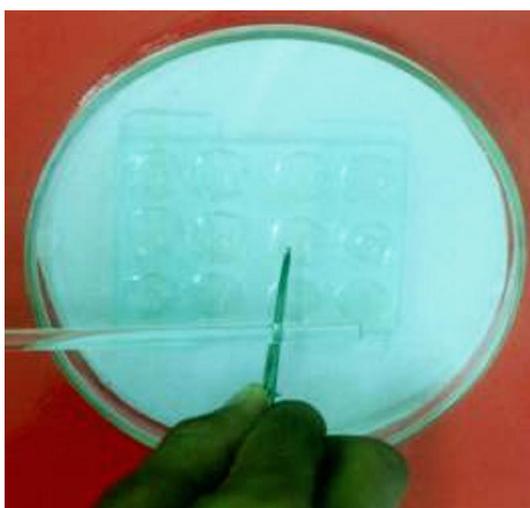


Figura 7 . Grãos de pólen de cupuaçuzeiro germinados, depois de 2 horas no meio de germinação.

CONCLUSÃO

Usando esta técnica para germinação *in vitro* do pólen de cupuaçuzeiro, pode-se obter até 100 % de germinação, quando se usa pólen advindo de plantas saudas e bem nutridas, coletados de botões maduros e usados até 2 horas depois de coletados da planta, em meio contendo solução de germinação que esteja preparada e conservada sob refrigeração por até 90 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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).
- ANTONIO, I. C., NUNES, C. D. M., SOUSA, N. R. Germinação in vitro do pólen de cupuaçuzeiro. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. 2000. 23 p. (Embrapa Amazônia Ocidental, **Boletim de Pesquisa, 8**).
- 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. 1991. p. 17- 28.
- BROWN, C. A. **Palynological Techniques**. Louisiana, Baton Rouge. 1960.
- 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. 1982. p. 287-291.
- DARLINGTON, C. D.; La COUR, L. F. **The Handling of the Chromosomes**. 5th ed. London, George Allen and Unwin. 1969. 272 p.
- HONGI-QI, Z.; CROES, A. F. Protection of pollen germination from adverse temperatures: a possible role for proline. **Plant, Cell and Environment**. N. 6. 1983. p. 471-476.
- 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 *Licopersicon esculentum* Mill. Cv. Santa Cruz Kada. **Revista Ceres vol. XLII N. 241. 1995**. p. 308-318.
- LEE, A. E. **Crescimento e desenvolvimento das plantas**. S. Paulo, SP. Edart. 1967. 96 p.
- MIRANDA, I. P. de A.; CLEMENT, C. R. Germinación y almacenamiento del polen de pejíbaye (*Bactris gasipaes* H. B. K., Palmae). **Revista de biologia Tropical**, v. 38, n. 1. 1990. p. 29-33.
- 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. **XIV Congresso Brasileiro de Fruticultura; 42ª Reunião Interamericana de Horticultura Tropical; Simpósio internacional de Mirtáceas – Resumos**. Curitiba, PR. 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. 1983. p. 1021-1029.
- PÁLFI, G.; KÖVES, E. Determination of vitality of pollen on the basis of its Amino Acid Content. **Biochem. Physiol.** N. 179, 1984. p. 237-240.
- SOUSA, V. A. de. **Manejo e viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp.** Piracicaba, SP. USP-ESALQ. 1988. 155 p. dissertação (mestrado em Ciências Florestais).