

VIABILIDADE DE PÓLEN *IN VIVO* E *IN VITRO* EM GENÓTIPOS DE AÇAIZEIRO

Maria do Socorro Padilha de Oliveira¹
Márcia Motta Maués²
Maura Anjos de Andrade Kalume³

Recebido em 17/8/1999. Aceito em 14/4/2000

RESUMO – (Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro). Determinou-se a viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em 20 genótipos de açaizeiro, da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Os grãos de pólen *in vivo* foram retirados de botão floral (BF) e de flor recém-aberta (FA) e os *in vitro* de ampolas armazenadas em freezer (-10°C), com período de armazenamento (PA) de um (PA1), três (PA3), seis (PA6) e doze (PA12) meses. Utilizou-se a solução de Baker, sendo foi retirada uma amostra para cada estágio. Calculou-se a taxa de viabilidade pela contagem de, aproximadamente, 500 grãos de pólen. Pólen *in vivo*, na maioria dos genótipos exibiram alta viabilidade com médias de 84,8% para botões e 93,2% para flores recém-abertas, sendo as melhores taxas registradas nos genótipos 3 e 19. Para pólen *in vitro*, os genótipos apresentaram redução na viabilidade com o aumento do período de armazenamento (PA1: 79,6%, PA3: 77,4%, PA6: 74,1% e PA12: 61,3%) mas o armazenamento não foi prejudicial, pois grande parte dos genótipos alcançaram valores acima de 50%, destacando-se os genótipos 3 e 9 com as maiores percentagens. Portanto, pode-se considerar que, nos genótipos testados, pólen *in vivo* têm alta viabilidade e os *in vitro* devem ser usados em polinizações controladas sem prejuízos na fecundação, em até doze meses de conservação.

Palavras-chave – *Euterpe oleracea*, Arecaceae, Melhoramento, conservação, pólen fresco, pólen armazenado

ABSTRACT – (*In vivo* and *in vitro* pollen viability of açai palm genotypes). The rate of *in vivo* and *in vitro* pollen viability, in 20 açai palm (*Euterpe oleracea* Mart.) genotypes, belonging to the germplasm collection of Embrapa Eastern Amazon, was determined. The *in vivo* pollen grains were extracted from floral buds (FB) and recently opened flowers (ROF). The *in vitro* pollen grains were obtained from flasks stored in the freezer under -10°C, with storage period (SP) of one (SP1), three (SP3), six (SP6) and twelve (SP12) months of storage. The pollen viability was assessed utilizing the Baker's procedure. The viability rate was achieved by counting up to 500 grains per slide. Most of the genotypes showed high viability for *in vivo* pollen, with an average of 84.8% in the BF samples and 93.2% in the ROF samples. For the *in vitro* pollen, a decrease in the viability in relation to the storage period was observed (SP1: 79.6%, SP3: 77.4%, SP6: 74.1% and SP12: 61.3%). Nevertheless, this decrease was not hazardous, observing that most of the genotypes achieved rates over 50% of viability, particularly the genotypes 3 and 9, which presented the major percentages. Therefore, all the tested genotypes presented high viability for *in vivo* pollen, and the *in vitro* pollen can be used for controlled pollination without any fecundity injury up to one year of storage.

Key words – *Euterpe oleracea*, Arecaceae, Breeding, Conservation, Stored pollen, Pollen viability

¹ Eng. Agro., MSc., Embrapa Amazônia oriental, C. Postal 48, Belém, PA, CEP 55095-100, spadilha@cpatu.embrapa.br

² Bióloga, MSc., Embrapa Amazônia oriental, C. Postal 48, CEP 66095-100, marcia@cpatu.embrapa.br

³ Eng. Agro., Aluna do curso de Mestrado em Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará

Introdução

O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia que ocorre em grandes concentrações no Pará, principalmente no Estuário Amazônico, onde encontra-se em estado selvagem (Cavalcante 1991).

Destaca-se como produtor de frutos e palmito mas, grande parte dessas produções, ainda, provém do extrativismo, não garantindo produtos de qualidade e nem produções contínuas, havendo necessidade de serem desenvolvidos estudos que viabilizem seu cultivo. A expansão do mercado de frutos vem estimulando muitos agricultores no plantio comercial do açaizeiro, os quais têm encontrado barreiras na escolha de sementes, devido a ausência de sementes melhoradas que possam garantir maiores produtividades e qualidades nos produtos obtidos e, conseqüentemente lucros certos aos produtores.

Na tentativa de solucionar este problema, a Embrapa Amazônia Oriental instalou uma coleção de germoplasma de açaí e vem realizando várias pesquisas com vista a subsidiar programas de melhoramento, dentre as quais a polinização controlada. Nesse aspecto, tem-se como relevante o conhecimento da viabilidade do pólen dos genótipos existentes.

A viabilidade do pólen pode ser determinada através de um grande número de técnicas (Dafni 1992; Kearns & Inouye 1993). É considerada uma medida de fertilidade masculina muito empregada no monitoramento de pólen armazenado, de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos de potencial econômico que apresentam floração em épocas distintas (Kearns & Inouye 1993; Miranda 1993).

Na literatura disponível, há apenas um trabalho que aborda superficialmente sobre a viabilidade de pólen no açaizeiro, sendo considerada pelos autores como de alta percentagem (Bovi *et al.* 1988). Em outras palmeiras, este estudo tem recebido atenção especial, devido a produção de híbridos, sendo realizado em grãos

de pólen frescos e conservados sob baixas temperaturas (Whitehead 1966; Rognon & Nucé de Lamothe 1978; Akihama *et al.* 1979; Arnaud 1980; Ekaratne & Senathirajah 1983; Miranda 1986; Bovi *et al.* 1988).

Assim, na tentativa de obter subsídios para programas de melhoramento do açaizeiro, este trabalho teve como objetivo determinar a taxa de viabilidade de grãos de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos dessa palmeira existentes na coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará.

Material e métodos

Para a realização desse estudo, foram selecionados ao acaso, na coleção de germoplasma de açaí da Embrapa Amazônia oriental, localizada em Belém, PA (1°27'S 48°29'W), 20 genótipos com aproximadamente treze anos de idade, em plena fase reprodutiva.

O tipo climático de Belém, segue o padrão Afi, segundo classificação de Köppen, caracterizado por apresentar temperatura média anual de 25,9°C, umidade relativa do ar média de 84% e precipitação pluviométrica de 2.900mm/ano.

Em cada indivíduo foi marcada uma inflorescência próxima a maturação e, no momento da exposição do cacho, foi retirada uma parte das ráquias, sendo levada ao laboratório para beneficiamento do pólen. O pólen obtido foi acondicionado em ampolas com rótulos de identificação, para conservação em baixa temperatura (freezer, -10°C). Outra parte da inflorescência ficou na planta para completar o ciclo de floração e, permitir a coleta de grãos de pólen *in vivo*.

Na ocasião da plena fase de floração masculina, coletou-se uma ráquia/inflorescência, entre 8 e 9 horas da manhã, e retirou-se dois estádios florais: botão floral em pré-antese (BF) e flor aberta (FA) para determinação da viabilidade do pólen *in vivo*, através da solução de Baker (Dafni 1992). Para tanto, retirou-se uma amostra (duas anteras) de cada estádio, sendo

macerada em lâmina identificada, acrescentando-se uma gota desta solução, homogeneizando-a, colocando-a em uma câmara úmida (placa de Petri com papel umedecido) e, em seguida, dentro de uma incubadora biológica por 25 a 30 minutos em temperatura de $37 \pm 3^\circ\text{C}$.

Dos grãos de pólen armazenados (*in vitro*), foi retirada uma amostra por período, durante quatro períodos de armazenamento (PA): um (PA1), três (PA3), seis (PA6) e doze (PA12) meses de conservação, sendo colocada para hidratar por duas horas, em câmara úmida e, após a hidratação seguiu-se a mesma metodologia aplicada para pólen *in vivo*.

Pelo fato de, nessa técnica, o corante reagir onde há plena atividade enzimática, indicada pela presença da esterase localizando tecido vivo, considerou-se como grãos de pólen viáveis aqueles corados de azul e como não viáveis os incolores.

Com os dados obtidos em cada genótipo, calculou-se a percentagem de pólen viáveis, sendo realizada através da contagem de grãos de pólen viáveis e inviáveis existentes em cada lâmina para pólen *in vivo* nos dois estádios florais (BF e FA) e *in vitro*, para os quatro períodos (PA1, PA3, PA6 e PA12), totalizando 500 grãos/lâmina, sendo usada para o cálculo da percentagem a seguinte fórmula:

Viabilidade do pólen (%) = $\frac{\text{N. de grãos corados}}{\text{N. de grãos contados}} \cdot 100$

Resultados e discussão

As taxas de viabilidade do pólen *in vivo* e *in vitro*, obtidas nos 20 genótipos de açaizeiro estudados, encontram-se nas Tab. 1 e 2.

Para pólen *in vivo*, os genótipos mostraram viabilidade alta, tanto em botões florais como em flores recém-abertas, com médias de 84,8% e 93,2%, respectivamente, atingindo no segundo estágio valor próximo a 100% (Tab. 1). Tais resultados foram superiores aos obtidos por Bovi *et al.* (1988), quando avaliaram açaizeiros e outras espécies de estipe único e múltiplo pertencentes ao gênero *Euterpe*, nas condições climáticas de Ubatuba, no litoral do estado de São Paulo, cujos valores variaram de 76 a 89%.

Tabela 1. Viabilidade para pólen *in vivo*, em dois estádios florais: botões florais (BF) e flores recém-abertas (FA), obtidas em 20 genótipos de açaizeiro, pertencentes a coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 1998.

Genótipos	Viabilidade de pólen (%) / estádios florais	
	Botão floral	Flor aberta
1	87,7	93,6
2	85,9	90,8
3	94,8	98,0
4	86,9	88,1
5	80,0	92,2
6	87,4	91,9
7	76,3	93,0
8	89,4	96,5
9	90,8	93,6
10	87,6	95,0
11	89,6	96,2
12	82,2	94,6
13	73,6	87,3
14	82,1	95,1
15	75,9	90,0
16	74,7	85,6
17	78,5	95,2
18	88,1	92,4
19	94,8	98,3
20	89,6	96,2
Média	84,8	93,2
Cv (%)	8,0	4,0

centes ao gênero *Euterpe*, nas condições climáticas de Ubatuba, no litoral do estado de São Paulo, cujos valores variaram de 76 a 89%.

Vale mencionar que, no trabalho em questão, a coleta dos estádios florais foi realizada durante a fase masculina, porém no horário entre 8 e 9 horas quando as anteras começam a abrir, levando a crer que a viabilidade deva atingir sua plenitude na ocasião da antese máxima, momento em que ocorre a abertura total da anteras, existindo maior disponibilidade de pólen (entre 10h30 e 12h30), ou logo após a antese, como relatam Kearns & Inouye (1993) para a maioria das espécies. Na Fig. 1, encontra-se o detalhe de pólen viável (corado) e inviável (não corado) em botões florais e flores recém-abertas.

A variação entre o percentual de viabilidade de pólen *in vivo*, nos genótipos, foi conside-

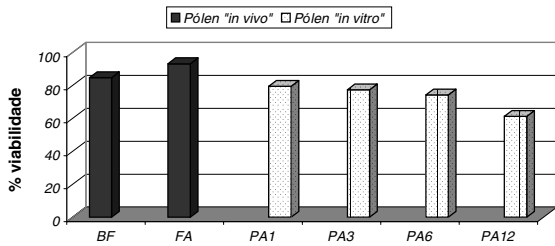


Figura 1. Viabilidades médias para grãos de pólen *in vivo*, em dois estádios florais, botão floral (BF) e flor aberta (FA) e *in vitro*, em quatro períodos de armazenagem (PA1, PA2, PA6 e PA12), obtidas em açaizeiros da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 1998.

rada baixa para os dois estádios, 8,04 e 4,04% respectivamente, fornecendo indícios de que os genótipos não diferem entre si ou que esta característica seja pouco influenciada pelo ambiente.

Em relação ao botão floral, o genótipo que exibiu a percentagem mais baixa foi o 13 com 73,6%, enquanto a mais alta foi registrada nos genótipos 3 e 19 (94,8%). No caso de flores recém-abertas, apesar de todos terem atingido alta viabilidade, o destaque ficou com o genótipo 19 que apresentou 98,3%, ficando o menor valor com o genótipo 16 que alcançou 85,6% de grãos de pólen viáveis. Pelo fato do genótipo 19 ter atingido a maior viabilidade para pólen *in vivo*, pode-se considerar como um bom indicativo para que seja usado em programas de melhoramento. Contudo, os demais genótipos também podem ser úteis, pois apresentaram percentagens significativas.

No que diz respeito a viabilidade de pólen *in vitro*, avaliada nos quatro períodos de armazenagem (um, três, seis e doze meses), pode-se verificar que houve uma redução com o aumento do tempo de conservação (Tab. 2) mas, esta diminuição não foi drástica. Detalhe dos grãos de pólen viáveis e inviáveis em cada período encontra-se na Fig. 2. Para um mês, a percentagem média foi de 79,6%, enquanto nos demais períodos as taxas caíram para 77,4%, 74,1% e 61,3%, respectivamente. Entretanto, apresentaram percentagens menores que as obtidas para

Tabela 2. Viabilidade para pólen *in vitro*, em quatro períodos de armazenamento: um, três, seis e doze meses, obtidas em 20 genótipos de açaizeiro, pertencentes a coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 1998.

Genótipos	Viabilidade de pólen (%) / Períodos de armazenamento			
	1 mês	3 meses	6 meses	12 meses
1	79,3	76,5	72,1	59,6
2	83,0	80,4	77,3	66,3
3	90,2	88,0	85,6	63,1
4	84,8	81,5	77,9	65,8
5	69,1	65,2	63,4	49,4
6	81,5	79,3	75,3	61,2
7	74,7	72,1	69,4	57,8
8	85,2	83,1	80,2	68,9
9	88,3	86,7	85,6	74,5
10	86,2	84,6	80,1	67,6
11	85,0	81,2	77,3	65,0
12	78,0	75,4	70,0	58,1
13	71,7	70,5	68,9	55,4
14	80,3	78,6	75,7	63,2
15	74,1	73,8	70,2	59,0
16	74,0	72,0	70,5	57,6
17	75,5	73,7	69,3	57,3
18	75,2	74,5	72,4	60,1
19	84,8	82,0	80,3	67,6
20	70,3	68,9	65,1	48,9
Média	79,6	77,4	74,1	61,3
CV (%)	8,3	8,6	9,0	11,5

pólen *in vivo* (Fig. 3). Resultados semelhantes foram obtidos em pólen armazenado de outras palmeiras (Ekaratne & Senathirajah 1983 e Miranda 1986). Porém, Rognon & Nuce de Lamothe (1978) encontraram 40% de viabilidade para pólen armazenado de coqueiro.

Bérnard & Noiret (1970) ressaltam que pólen com pelo menos 60% de viabilidade podem ser considerados como bem conservados, enquanto para Arnaud (1979) só podem ser armazenados grãos de pólen que possuam viabilidades iniciais superiores a 70%, devendo ser descartados os que atingirem taxas inferiores a 40%. Como os resultados aqui encontrados foram superiores a este valor, acredita-se que os grãos de pólen de açaizeiro armazenados até doze meses poderão ser aplicados com sucesso em

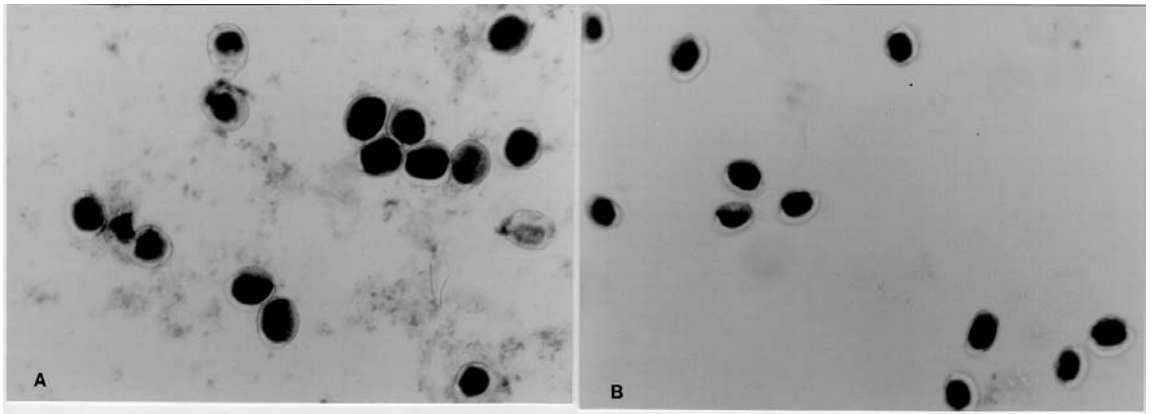


Figura 2. Aspecto geral do pólen *in vivo* viável (corado) em dois estádios: a) botão floral (142x) e b) flor recém-aberta (142x) de açaizeiros da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 1998.

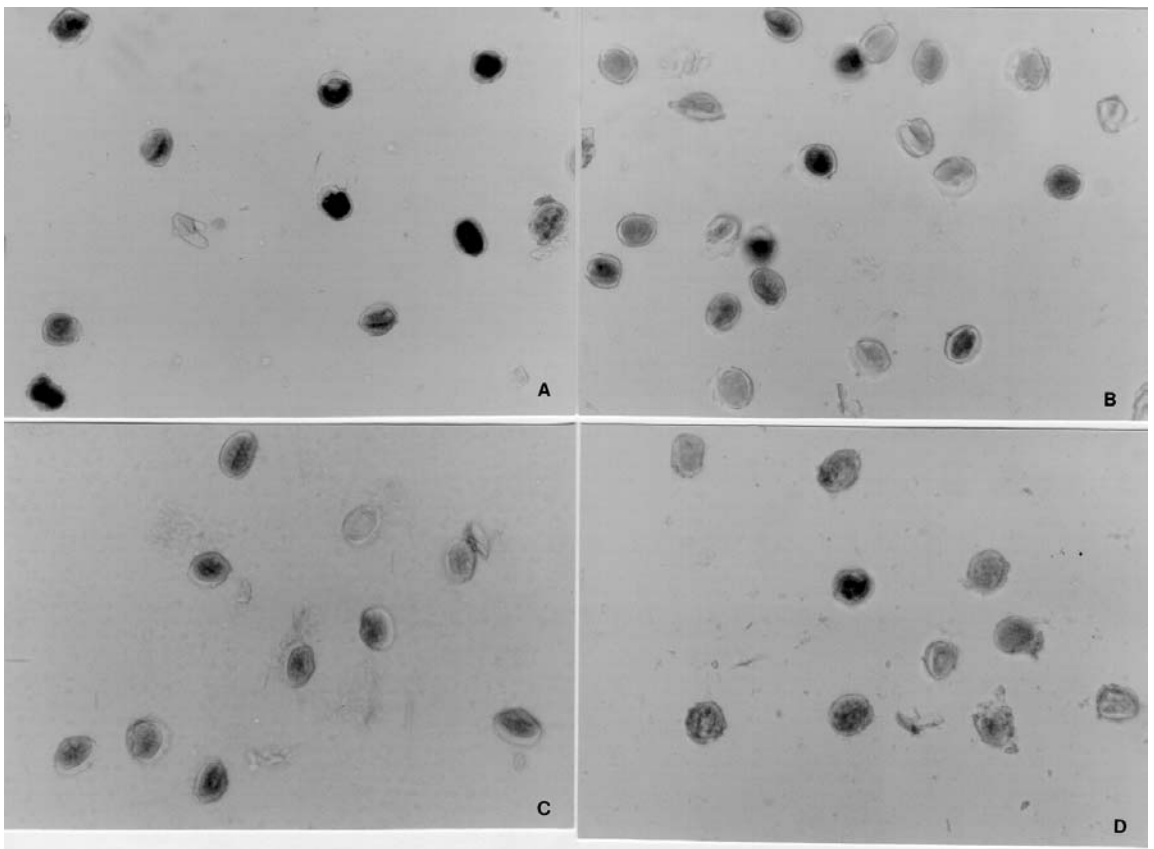


Figura 3. Aspecto geral do pólen *in vitro* viável (corado) em quatro períodos de armazenamento em freezer: a) um (142x), b) três (142x), c) seis (142x) e d) doze meses (142x), de açaizeiros da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 1998

polinizações controladas.

É importante enfatizar que a diminuição na percentagem de pólen viáveis encontrada neste trabalho pode está relacionada com vários fatores, tais como: as condições de armazenamento, o recipiente usado no acondicionamento do pólen e a manipulação dos recipientes. Em várias palmeiras a viabilidade do pólen armazenado é mantida se os grãos de pólen obtidos estiverem secos (Bérnard & Noiret 1970; Rognon & Nucé de Lamonthe 1978; Miranda 1986) e conservados em baixas temperaturas (Rognon & Nucé de Lamonthe 1973; Akihama *et al.* 1979 e Miranda 1986). Contudo, os coeficientes de variações obtidos para os períodos avaliados foram baixos, levando a crer que fatores externos tenham exercido pouca influência.

Analisando os genótipos verifica-se que para o armazenamento de um mês, a melhor viabilidade ocorreu no genótipo 3 (90,2%) com o indivíduo 5 apresentando o menor valor (69,1%). Os mesmos genótipos apresentaram comportamentos semelhantes para três e seis meses de conservação, onde o genótipo 3 continuou se destacando com 88,0 e 85,6% e o genótipo 5 mostrando os menores valores (Tab. 2). Já no último período, os genótipos 9 e 20 exibiram o melhor e o pior resultado, respectivamente. Os resultados demonstram que apesar dos genótipos terem exibido taxas de viabilidades variáveis, no último período de armazenagem, a maioria deles (dezoito genótipos) alcançou valores acima de 50%, podendo-se destacar o genótipo 9 com 74,5%. Por outro lado, os genótipos 5 e 20 tiveram valores menores que 50%, atingindo 49,4% e 48,9%, respectivamente. Com base nas informações apresentadas por Miranda (1993), pode-se considerar que os resultados obtidos para pólen *in vitro* possam subsidiar programas de melhoramento com o açaizeiro, viabilizando cruzamentos entre indivíduos com potencial econômico que apresentem barreiras temporais de floração, baixa taxa de polinização natural ou geograficamente separados.

Conclusões

Os resultados obtidos, nas condições do estudo, permitem concluir que:

- Grãos de pólen *in vivo* de açaizeiro, retirados de botões florais e flores recém-abertas, apresentam viabilidade alta, sendo maior no segundo estágio. Enquanto, grãos de pólen *in vitro* possuem redução na viabilidade com o aumento do tempo de armazenamento;
- Para pólen *in vivo*, a maior viabilidade ocorreu no genótipo 19, nos dois estádios avaliados;
- Para pólen *in vitro*, os genótipos 3 e 9 alcançaram os melhores resultados, com as menores reduções de viabilidade nos quatro períodos de armazenamento;
- Com exceção dos genótipos 5 e 20, os demais podem ser utilizados em polinizações controladas sem prejuízos na fecundação em até doze meses de conservação nas condições testadas.

Referências bibliográficas

- Akihama, T.; Omura, M. & Kosaki, I. 1979. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research** 13(4): 238-241.
- Arnaud, F. 1979. La pollinisation assistée les plantations de palmier à huile. Récolte et conditionnement du pollen. **Oléagineux**, Paris: v. 34, n. 4, p. 175-176.
- Arnaud, F. 1980. Fertilité pollinique de l'hybride *Elaeis melanococca* x *E. guineensis* et des espèces parentales. **Oléagineux**, Paris: v. 35, n. 3, p. 121-127.
- Bernard, G. & Noiret, J. M. 1970. Le pollen de palmier à huile réclote. Préparation, conditionnement et utilisation pour la fécondation artificielle. **Oléagineux**, Paris: v. 25, n. 2, p. 67-73.
- Bovi, M. L. A.; Godoy Junior, G. & Saes, L. A. 1988. Pesquisas com os gêneros *Euterpe* e *Bactris* no Instituto Agrônomo da Campinas. Pp. 1-43. In: Encontro Nacional de Pesquisadores em Palmito, 1, Curitiba, PR, 1987. **Anais...**, Curitiba, PR. EMBRAPA - CNPF. Documentos, 19.
- Cavalcante, P. B. 1991. Frutas comestíveis da Amazônia. 5ª ed. Belém: CNPq, p. 25-28 (Coleção Adolfo Ducke).

- Dafni, A. 1992. **Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)**. New York, Oxford: University press. 250p.
- Ekaratne, S. N. R & Senathirajah, S. 1983. Viability and storage of pollen of the oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. **Ann. Bot.**, Paris: n. 51, p. 661 - 668, 1983.
- Kearns, C. A. & Inouye, D. 1993. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado. 579p.
- Miranda, I. P. A. 1986. **Morfologia e aspectos práticos de germinação e do armazenamento do pólen de pupunha *Bactris gasipaes* H.B.K (Arecaceae)**. Dissertação de Mestrado. PPG INPA/FUA, Manaus, 85p.
- Miranda, I. P. A. 1993. A importância da conservação *in vitro* do pólen da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) Arecaceae para o melhoramento genético. Pp. 361-171. In: Ferreira, E. J. G; Santos, G. M.; Leão, E. L. M. & Oliveira, L. A. (Eds.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia**. v. 2, SCT/INPA, Manaus.
- Rognon, F. & Nuce de Lamouthe, M. 1973. Action du froid sur la conservation du pollen de cocotier. **Oléagineux**, Paris, v. 28, n. 12, p. 565-566.
- Rognon, F. & Nuce de Lamouthe, M. 1978. Récolte et conditionnement du pollen pour la pollinisation des champs semenciers de cocotiers. **Oléagineux**, Paris, v. 33, n. 1, p. 17-21.
- Whitehead, R. A. 1966. Progés dans la lyophilisation du pollen de cocotier. **Oléagineux**, Paris, v. 21, n. 5, p. 281-284.