

CONSERVAÇÃO E LONGEVIDADE DE PÓLEN DE ACESSOS DE *Manihot esculenta*

Lívia de Jesus Vieira¹, José Ranieri Ferreira de Santana², Thamyres Cardoso da Silveira³, Alfredo Augusto Alves Cunha⁴ e Fernanda Vidigal Duarte Souza⁴

¹. Aluna de Doutorado Biotecnologia - Universidade Estadual de Feira de Santana, Avenida Transnordestina, S/N, 44036-900, Feira de Santana, BA Brasil. liviabiol@gmail.com

². Professor da Universidade Estadual de Feira de Santana, Avenida Transnordestina, S/N, 44036-900, Feira de Santana, BA Brasil. jose.ranieri@gmail.com

³ Aluna de graduação - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. thsilveira@gmail.com.

⁴. Pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua da Embrapa, S/N, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. alfredoalves3@gmail.com. fernanda@cnpmf.embrapa.br.

Introdução

A conservação de pólen é importante para pesquisas básicas, assim como para o intercâmbio e preservação de germoplasma (HANNA, 1994; EINHARDT, 2006; FERES, 2009). O pólen conservado, no entanto, deve preservar sua viabilidade e por isso a necessidade de monitorar essa capacidade antes, durante e depois da conservação. Dessa forma, pode-se estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar e fertilizar, tornando-se dessa forma uma importante ferramenta para o melhoramento e para o intercâmbio entre instituições (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008).

Dentre as técnicas de conservação, somente a criopreservação (armazenamento em nitrogênio líquido a -196 ° C) pode garantir um armazenamento de germoplasma em longo prazo. De acordo com Bajaj (1995), o armazenamento de pólen em nitrogênio líquido, se realizado adequadamente, é capaz de manter sua viabilidade por longos períodos de tempo.

Protocolos de criopreservação de pólen de diversas espécies como *Mangifera indica*, *Carica papaya*, *Carica cauliflora*, *Citrus limon*, *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, entre outras, já foram estabelecidos (SHIVANNA & SAWHNEY, 1997). O sucesso da conservação do pólen, além do período, depende principalmente de fatores como o estágio fisiológico da flor, a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento, e do grau de umidade do grão de pólen (AKIHAMA et al., 1979; GIORDANO et al., 2003).

Estudos referentes à produção, morfologia e viabilidade do pólen conservado são, portanto, parte de uma demanda importante no melhoramento genético da mandioca e têm sido foco de estudos (VIEIRA, 2010). Os resultados destes estudos poderão ser aplicados de forma prática viabilizando a realização de cruzamentos de interesse entre mandioca cultivada e espécies silvestres do gênero *Manihot* e a geração de novos híbridos com características superiores. Assim, o objetivo deste trabalho foi estimar a viabilidade por testes *in vivo* e colorimétrico de grãos de pólen fresco e criopreservados e avaliar a longevidade do pólen de mandioca.

Material e métodos

Como material vegetal utilizou-se acessos de mandioca oriundos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Para a realização dos estudos da longevidade polínica, considerou-se pólen fresco e pólen armazenado, considerando as seguintes condições: 1- pólen armazenado por uma hora; 2 - pólen armazenado por 24 horas e 3 - pólen criopreservado em nitrogênio líquido por 1 hora.

Para a realização dos cruzamentos com pólen fresco e armazenados, flores pistiladas e estaminadas foram cobertas com sacos de pano de 20 x 15 cm de comprimento, a fim de protegê-las da contaminação por pólen exógeno no momento da abertura floral. Foram eliminados frutos, flores estaminadas e flores pistiladas já fecundadas presentes na mesma inflorescência com o auxílio de uma tesoura. O pólen foi colhido entre 11:00 da manhã e 14:00 horas, horário já designado como ideal para a realização de cruzamentos (VIEIRA, 2010).

A polinização foi alcançada a partir do contato das anteras sobre o estigma da flor pistilada. A flor foi coberta após a polinização e logo em seguida foi realizada a identificação dos tratamentos com o uso de etiquetas contendo informações sobre o nome dos parentais, o número de flores polinizadas e a data da polinização. A viabilidade do pólen, em porcentagem, foi estimada após a contagem do número de sementes obtidas pelo número de flores nos cruzamentos, considerando o número de frutos que produziram sementes.

Para a estimativa da viabilidade de pólen por meio de testes colorimétricos, os grãos de pólen frescos e os grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido foram aspergidos com o auxílio de um pincel sobre lâminas de vidro, onde foi adicionado cinco gotas dos corantes a serem usados: lugol 1%, carmim acético 3% e oceína acética 1%. Após cinco minutos, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico para avaliação.

A porcentagem de pólen viável foi estimada pelo número de grãos corados, de tamanho grande ou médio e formato regular. Os dados de viabilidade foram expressos em porcentagem, e transformados em $\arcsin(\sqrt{x/100})$, para atendimento das pressuposições da ANOVA. As análises

de variância dos dados foram realizadas pelo programa estatístico SASM Agri (2001). Nos testes colorimétricos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (condição de armazenamento x corantes) com três repetições, sendo cada repetição formada por 3 lâminas com 100 grãos de pólen. As médias foram comparadas pelo teste de Scott knott ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e discussões

Na Tabela 1 estão os resultados obtidos com o teste de viabilidade *in vivo* do pólen fresco e do pólen armazenado em diferentes condições. A viabilidade *in vivo* de pólen fresco (coletado no momento da antese), seguido da viabilidade do pólen uma hora após à antese foram os tratamentos que apresentaram maior porcentagem de grãos de pólen viáveis, com o registro de 70 e 50% de frutos com sementes, respectivamente. Enquanto que a viabilidade do pólen 24 horas após à antese e a viabilidade do pólen armazenado em nitrogênio líquido por uma hora foi inexistente.

Tabela 1. Viabilidade *in vivo* de pólen fresco, armazenado em temperatura ambiente por uma hora e 24 horas e armazenado em nitrogênio líquido por uma hora.

Progenitor feminino	Progenitor masculino	Tratamento	Nº de flores	Frutos com sementes (%)
BGM 540	BGM 358	Pólen fresco	10	70
BGM 540	BGM 358	Pólen 1h (27°C)	10	50
BGM 540	BGM 358	Pólen 24h (27°C)	10	0
BGM 540	BGM 358	Pólen 1h (-196°C)	10	0

A maior porcentagem de pólen viável foi registrada no cruzamento realizado com pólen fresco, enquanto a medida que aumentou o tempo de armazenamento registrou-se um comprometimento da viabilidade e conseqüentemente dos cruzamentos realizados. Após uma hora de armazenamento do pólen fresco em temperatura ambiente houve um declínio de 20% da viabilidade e após 24 horas registrou-se uma perda total de viabilidade polínica. Já Leyton (1993) em estudo de viabilidade do grão de pólen de mandioca após 24 horas e 48 horas obteve a viabilidade de 54% e 48 0,9%, respectivamente. As diferenças observadas entre os dois trabalhos podem ser devido a vários fatores, mas principalmente aos genótipos. De qualquer forma a perda de viabilidade em mandioca parece ser bem marcante logo nos primeiros dias.

Ficou registrado também a intolerância do pólen ao congelamento e a necessidade de pre-tratamentos para viabilizar esta opção de armazenamento. Trabalhos com outras espécies mostram a eficiência da desidratação para a eficiência do ultra congelamento (FRANÇA, 2008; VARGAS,

2006).

Segundo Scorza e Sherman (1995) um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem, comprometendo, dessa forma, a fertilização.

Não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de corantes utilizados, ainda que se registrou a diferença entre o pólen fresco e o ultracongelado (Tabela 2). Os resultados encontrados por meio dos testes colorimétricos mostram uma falta de correspondência com o que se obteve com a fertilização *in vivo* e deixou, claro a fragilidade deste tipo de avaliação para as variedades estudadas.

Tabela 2. Viabilidade (%) dos grãos de pólen de mandioca frescos e criopreservados mediante o uso de três corantes distintos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e a mesma letra minúscula na coluna pertencem ao mesmo agrupamento ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Tratamento	Carmim acético	Lugol	Oceína acética
Pólen fresco	90 Aa	94 Aa	94 Aa
Pólen criopreservado	63 Ab	68 Ab	66 Ab

Por outro lado fica evidente a necessidade de tratamentos de desidratação para a criopreservação eficiente de grãos de pólen destas variedades de mandioca. Provavelmente, as pequenas rupturas na camada externa do pólen, observadas no microscópio podem estar relacionadas com a formação de cristais de gelo e a perda de viabilidade dos grãos de pólen oriundos deste tratamento.

Conclusão

A ausência de sementes nos cruzamentos e a redução da viabilidade observada nos corantes carmin acético, lugol e oceína acética, deixam evidente que o método utilizado para o ultracongelamento não manteve a integridade dos grãos de pólen de mandioca.

Referências

- AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**. v. 4, p. 238-241, 1979.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell. tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj, Y. P. S. ed. Cryopreservation of plant germplasm I. Biotechnology in agriculture and Forestry, volume 32, Berlim, Springer, 1995. p. 03-28.
- CREPALDI, C. I. Biologia da reprodução em *Manihot* Mill. Campinas, 1987. 160p.

- DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. *Conservação de pólen de mamoeiro (Carica papaya L.)*. **Ceres**. Rio de Janeiro. n. 55, v. 5, p. 433-438, 2008
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de Pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.
- FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.**: Implicações para a conservação. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Universidade de São Paulo, 2009.
- FRANÇA, L. V. **Secagem e conservação de grãos de pólen de berinjela**. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências Agrárias. Brasília, 2008.
- GIORDANO, L. B. ARAGÃO, F. A. S., BOITEUX, L. S. **Melhoramento genético do tomateiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 24, n.219, p. 43-57, 2003.
- HANNA, W. N. Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. **Crop Science**, v. 34, p. 1681-1682, 1994.
- LEYTON, M. **Crioconservacion de polen de yuca**. 1993. (Monografia). Universidade. do Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biologia, Cali, 1993.
- SAS Agri. ALTHAUS, R.A., CANTERI, M.G., GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica, Parte 1, Ponta Grossa, p.280-281, 2001.
- SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John; Sons, p. 325-440, 1995.
- SHIVANNA, K. R.; SAWHNEY, V. K. Pollen biotechnology for crop production and improvement. SHIVANNA, K. R.; CRESTI, M.; CIAMPOLINI, F. (ed), Pollen development and pollen-pistil interaction. Cambridge. p. 15-39. 1997.
- VARGAS, D. P. et al. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de manona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae): conservação e viabilidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p.115-120, 2006.
- VIEIRA, L.J. Uso de recursos genéticos do gênero *Manihot* no pré-melhoramento genético de mandioca. 2008. 61f. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2010.