

Viabilidade e conservação de grãos de pólen da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Miller) H.E. More)

Emanuel Lucas Bezerra Rocha¹ Cássia Silva¹ Ana Carolina de Carvalho¹ Daniel Tavares de Farias¹
Poliana Coqueiro Dias Araujo^{1*}

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Departamento de Ciências Agrônômicas e Florestais, Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva, Mossoró – Rio Grande do Norte, Brasil

Original Article

*Corresponding author:
poliana.coqueiro@ufersa.edu.br

Keywords:

Genetic conservation
Storage of pollen
Germination of pollen

Palavras-chave:

Conservação genética
Armazenamento de pólen
Germinação de pólen

Received in
2022/08/02

Accepted on
2023/02/06

Published in
2023/03/31



DOI:
<http://dx.doi.org/10.34062/af.s.v10i1.14217>

RESUMO: Objetivou-se com o presente estudo estabelecer uma metodologia para a conservação de grãos de pólen da Carnaúba (*Copernicia prunifera* (Miller) H.E. More). A viabilidade dos grãos de pólen, recém-liberados, foi avaliada pelas técnicas de coloração por carmim acético 1%, Reativo de Alexander e lugol. A taxa de germinação *in vitro* foi verificada através de três meios de cultura: M1: 100g L⁻¹ de sacarose; 10g L⁻¹ de ágar; M2: 100g L⁻¹ de sacarose; 500mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10g L⁻¹ de ágar; M3: 100g L⁻¹ de sacarose; 300mg L⁻¹ de CaCl₂; 10g L⁻¹ de ágar. A influência da redução do teor de água dos grãos de pólen foi verificada por meio de quatro processos: 1) em dessecador com sílica gel, sob vácuo, por 24 h; 2) em liofilizador por 24h; 3) cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂ 2H₂O) e 4) pólen sem redução de umidade. Os grãos de pólen com melhor resposta à dissecação foram armazenados: congelador (-4°C), geladeira (10°C), e temperatura ambiente (26°C). Todos os corantes utilizados são adequados e práticos para analisar a viabilidade polínica dos grãos de pólen da Carnaúba. O meio de cultura adequado para avaliar a viabilidade polínica da Carnaúba contém em sua composição sacarose e ácido bórico. O armazenamento do grão de pólen da carnaúba pode ser realizado nas temperaturas de 10°C e -4°C.

Viability and conservation of carnauba pollen grains (*Copernicia prunifera* (Miller) H.E. More)

ABSTRACT: The objective of this study was to establish a methodology for the conservation of Carnauba (*Copernicia prunifera* (Miller) H.E. More) pollen grains. The viability of newly released pollen grains was evaluated by the 1% acetic carmine staining technique, Alexander reactive and Lugol. The *in vitro* germination rate was verified through three culture media: M1: 100g L⁻¹ sucrose; 10g L⁻¹ of agar; M2: 100g L⁻¹ sucrose; 500mg L⁻¹ of H₃BO₃; 10g L⁻¹ of agar; M3: 100g L⁻¹ sucrose; 300mg L⁻¹ of CaCl₂; 10g L⁻¹ of agar. The influence of the reduction of the water content of the pollen grains was verified by means of four processes: 1) in desiccator with silica gel, under vacuum, for 24 h (10% final moisture); 2) in lyophilizer for 24h; 3) calcium chloride dihydrate (CaCl₂ 2H₂O) and 4) pollen without reduction of humidity. The pollen grains with the best response to dissection were stored at three different temperatures: freezer (-4 ° C), refrigerator (10 ° C), and room temperature (26 ° C). All dyes used are suitable and practical to analyses the pollen viability of Carnauba pollen grains. The culture medium suitable for evaluating the pollen viability of Carnauba contains sucrose and boric acid in its composition. The storage of pollen grains of dehydrated carnauba with silica gel can be carried out at temperatures of 10 ° C and -4 ° C.

Introdução

A carnaúba, *Copernicia prunifera* (Miller) H.E. More, é uma palmeira endêmica e de suma importância ao semiárido nordestino. Essa espécie, possui alto valor social, econômico e cultural (Rodrigues et al. 2013), sendo explorada, com predominância, no período de estiagem (Ferreira et al. 2013) para a produção de forragem ou produção de cera (Vieira et al. 2016), gerando renda para manter economicamente famílias rurais no Nordeste (Salm et al. 2011). Além disso, é a única espécie do gênero *Copernicia* na região do semiárido, que vêm alcançando grande importância social e industrial pela extração e uso da cera produzida em suas folhas (Queiroga et al. 2013; Rodrigues et al. 2013).

O conhecimento da biologia floral e reprodutiva, juntamente com os mecanismos de dispersão de pólen e sementes, tem papel central em programas de conservação, por permitir delinear estratégias que aperfeiçoam a amostragem da variabilidade genética (Vieira et al. 2016; Melo Junior et al. 2015). Um trabalho que discorra sobre o conhecimento da viabilidade e conservação de grãos pólen de populações naturais da carnaúba contribui para o conhecimento do germoplasma da espécie, o que pode auxiliar em trabalhos de coleta, conservação e avaliação do germoplasma da *Copernicia prunifera* que é pouco estudado. A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância, pois além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos e ecológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como no cultivo da espécie (Cuchiara et al. 2012; Campos et al. 2015; Hister & Tedesco 2016). Além disso, a determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial reprodutivo de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (Abdelgadir et al. 2012; Novara et al. 2017).

A avaliação da viabilidade do grão de pólen pode ser feita por métodos diretos, tais como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e métodos indiretos (Cuchiara et al. 2012; Campos et al. 2015). Estes últimos são baseados em parâmetros citológicos como a coloração (Hister e Tedesco 2016). Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduro, diferenciando polens férteis (viáveis) dos estéreis (inviáveis) (Abdelgadir et al. 2012). Quando é feita a germinação do pólen *in vitro* é sempre relevante ajustar e determinar o melhor meio de cultura, pois a viabilidade pode variar em função da composição do meio de cultura, bem como do período de armazenamento do grão de pólen e dos aspectos fisiológicos da espécie estudada (Souza et al. 2014; Zambon et al. 2014; Shekari et al. 2016).

O armazenamento do grão de pólen a baixas temperaturas consiste em conservar o material genético para futura utilização, também, proporciona condições ótimas para manutenção do poder germinativo, vigor e processos genéticos (Vieira et al. 2016). O pólen conservado deve preservar sua capacidade de germinação e por isso a necessidade de monitorar essa capacidade com testes de viabilidade antes, durante e após o armazenamento (Novara et al. 2017). É possível estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar (Wang et al. 2015). Com tudo, o método e o período de armazenamento dependerão do objetivo do trabalho a ser desenvolvido e da viabilidade polínica expressa ao longo do período de armazenamento.

Nesse contexto, observa-se que a carnaúba é uma espécie com relevância social, econômica e cultural, a qual precisa ser adequadamente conservada, estudada e utilizada. Justificando, portanto, estudos que visam o conhecimento da espécie a fins de uso e conservação genética.

Diante das justificativas apresentadas, o objetivo do estudo concentra-se em estabelecer uma metodologia para a conservação de grãos de pólen de Carnaúba. Bem como, estimar a viabilidade polínica através de testes colorimétricos e germinação *in vitro*.

Material e Métodos

As amostras das inflorescências foram coletadas de maneira aleatória, em 20 palmeiras com distância espacial de 100 metros entre si, sendo a população localizada no município de Russas, Ceará. As inflorescências foram coletadas em estádios de desenvolvimento floral diferentes, pré-antese e antese, colhidas com $\pm 50\%$ de antese. Estas foram levadas ao laboratório e mantidas em água destilada à temperatura ambiente até a completa abertura floral. Em seguida, foram colocadas em cone de papel até a deiscência e liberação do pólen. A mistura de pólen, oriundas das inflorescências de 20 plantas, foi coletada e acondicionada em tubo eppendorf.

Este estudo foi dividido em três ensaios, nos quais foi verificado: 1) a viabilidade e germinação do pólen recém-coletado; 2) o efeito da dessecação dos grãos de pólen; e 3) o efeito de diferentes temperaturas e condições de umidade na germinação do grão de pólen, ao longo do tempo.

Ensaio 1: Viabilidade do pólen recém coletado por meio de testes colorimétricos e germinativos

A viabilidade dos grãos de pólen, recém liberados (frescos), foi avaliada pela técnica de coloração por carmim acético 1% (Kearns e Inouye 1993), Reativo de Alexander (Alexander 1980) e lugol (Dafni 2005). Para cada corante foram preparadas cinco lâminas e contados 200 grãos de

pólen (mistura das 20 plantas coletadas) por lâmina, perfazendo um total de 1.000 grãos de pólen. As observações foram feitas em microscópio óptico com aumento de 100x. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado composto de três corantes e cinco repetições (lâminas).

Os grãos de pólen corados foram analisados e classificados em normais/viáveis, com citoplasma corado e anormais/inviáveis, aqueles com pouco ou nenhum citoplasma evidenciado.

Para a verificação da taxa de germinação *in vitro*, o pólen foi avaliado em três meios de cultura distintos, tendo em vista que cada espécie responde de modo diferencial a certas combinações de nutrientes do meio. Os meios testados tiveram as seguintes composições:

Meio 1 (M1): 100g L⁻¹ de sacarose; 10g L⁻¹ de ágar

Meio 2 (M2): 100g L⁻¹ de sacarose; 500mg L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃); 10g L⁻¹ de ágar

Meio 3 (M3): 100g L⁻¹ de sacarose; 300mg L⁻¹ de cloreto de cálcio (CaCl₂); 10g L⁻¹ de ágar

Após o ajuste do pH para 6,5 os meios foram autoclavados e posteriormente vertidos em lâminas escavadas. Após esfriamento, os grãos de pólen foram pincelados sobre esses meios. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em placas de Petri, previamente revestidas com papel filtro e umedecidas com água, simulando uma câmara úmida e, mantidas em temperatura ambiente. A avaliação da germinação *in vitro* ocorreu 24 h após a inoculação do pólen. Foram considerados germinados os grãos de pólen que obtiveram crescimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen, avaliados em microscópio óptico com aumento de 40x.

Para cada meio de cultura foram preparadas oito lâminas, e contados 200 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 1.600 grãos. O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado, composto por três meios de cultura e oito repetições. Os dados obtidos nos testes colorimétricos e germinativos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias.

Ensaio 2: Efeito da dessecação dos grãos de pólen

A influência da redução do teor de água dos grãos de pólen foi verificada por meio de quatro processos: 1) em dessecador com sílica gel, sob vácuo, por 24 h (10% de umidade final); 2) em liofilizador por 24h; 3) cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂ 2H₂O) e 4) pólen sem redução de umidade, sendo denominado como: sem dessecação. Após a redução da umidade foi verificada a viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen por meio da germinação no meio de cultura com melhor resposta a emissão do tubo polínico, avaliado no experimento anterior. O experimento foi disposto em delineamento

inteiramente casualizado, com oito repetições, sendo cada repetição contida em uma placa de Petri. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias.

Ensaio 3: Efeito de diferentes temperaturas no armazenamento dos grãos de pólen

No estudo da germinação do pólen, armazenado ao longo de oito meses, foi avaliado o efeito da interação entre temperatura de armazenamento e meios de cultura. De modo que os grãos de pólen submetidos ao tratamento com melhor resposta à dissecação (ensaio 2), foram armazenados em três temperaturas distintas: congelador (-4°C), geladeira (10°C), e temperatura ambiente (26 °C). A cada 34 dias, uma amostra de grãos de pólen armazenado em cada ambiente (temperatura) foi retirada e avaliada através da germinação *in vitro* em placas de Petri contendo meio de cultura. A avaliação das condições de estocagem foi feita por meio da germinação do tubo polínico em três diferentes meios de cultivos, com as seguintes composições:

Meio 1 (M1): 100g L⁻¹ de H₃BO₃; 300mg L⁻¹ de nitrato de cálcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂ 4(H₂O)); 10g L⁻¹ de ágar;

Meio 2 (M2): 100g L⁻¹ de sacarose; 50 mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10g L⁻¹ de ágar;

Meio 3 (M3): 100g L⁻¹ de sacarose; 10g L⁻¹ de ágar.

O experimento foi estabelecido em esquema fatorial 3x3 (três temperaturas de armazenamento e três meios para avaliação da germinação do grão de pólen) em delineamento inteiramente casualizado, com nove repetições. Os dados obtidos nas avaliações foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias. Os procedimentos estatísticos foram realizados no pacote computacional R (R Development Core Team, 2011).

Resultados e Discussão

Ensaio 1: Viabilidade do pólen recém coletado por meio de testes colorimétricos e germinativos

Os corantes analisados se mostraram capazes de distinguir os pólenes de *Copernicia prunifera* viáveis dos inviáveis, por meio da coloração. Quando viáveis os grãos de pólen obtiveram forte coloração, ficando o interior escurecido e quando inviáveis o interior do grão de pólen ficou translúcido. Verificou-se a não existência de diferença significativa entre os tratamentos, a 1% de probabilidade (Figura 1), $p > 0,05$. Os grãos de pólen recém coletados, frescos, obtiveram alta viabilidade polínica (acima de 86%), conforme indicado pelo teste colorimétrico (Figura 1).

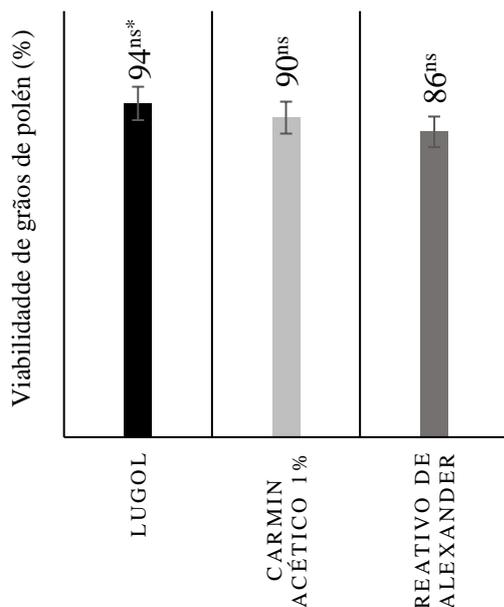


Figura 1. Percentual de viabilidade do pólen recém-coletado de *Copernicia prunifera* por meio de teste colorimétrico (Lugol, Carmim acético 1 % e Reativo de Alexander). *ns: não significativo, $p > 0,05$.

A avaliação colorimétrica dos grãos de pólen da carnaúba permitiu a discriminação satisfatória no que diz respeito à estimativa de viabilidade dos pólenes. O uso dos distintos corantes demonstrou a boa capacidade destes em avaliar a viabilidade polínica na Carnaúba, também revelou que o reativo de Alexander não diferiu do Lugol e do Carmim acético 1 % no que diz respeito à estimativa da viabilidade dos grãos de pólen através da capacidade de coloração.

Na literatura, não há descrição de um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico. A maioria dos trabalhos relata o uso dos corantes nucleares, sobretudo carmin acético, para vários grupos de plantas (Hister e Tedesco 2016; Radice et al. 2020). O corante lugol é indicado para espécies cujo material de reserva do grão de pólen é o amido, pois esse teste baseia-se em uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido, dando aos grãos de pólen viáveis coloração marrom e aos inviáveis, devido à ausência de amido, coloração amarelo-clara ou transparentes.

Diante do exposto é possível inferir que a carnaúba apresenta grande quantidade de amido na constituição do grão de pólen devido apresentar mais de 90% dos pólenes corados quando da aplicação do corante Lugol.

As análises usando o reativo de Alexander fornecem dados mais acurados sobre a viabilidade do pólen, pois se obtém coloração diferencial dos pólenes viáveis e não viáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais possuem dupla coloração. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular,

corando-a de verde, enquanto o protoplasma é corado pela fucsina ácida de roxo. Dessa maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander 1980; Hister & Tedesco 2016). Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os tratamentos, o corante reativo de Alexander pode apresentar maior acurácia em relação aos demais corantes estudados, devido sua dupla capacidade de coloração.

No presente estudo, a partir da contagem visual, as análises em nível de laboratório mostraram que a Carnaúba tem alto percentual de viabilidade polínica (acima de 80%) podendo ser observado com o uso dos corantes reativo de Alexander, do lugol e do carmin acético 1 %. Cabral et al. (2013) também constatou que o corante lugol e o carmin acético foram capazes de distinguir com segurança os pólenes de *Theobroma cacao* L. viáveis dos inviáveis. Assim como Hister & Tedesco (2016) que indicam o corante reativo de Alexander para obtenção da viabilidade polínica de *Psidium cattleianum* Sabine.

A eficiência do uso de corantes tem sido variável dependendo da espécie e resultados positivos foram relatados para várias técnicas de coloração em diferentes espécies de plantas (Abdelgadir et al. 2012; Cabral et al. 2013; Machado et al. 2021). Através da análise colorimétrica torna-se possível realizar somente a estimativa da viabilidade do pólen (no caso, capacidade de coloração). Entretanto, ressalta-se que a fertilidade do pólen é determinada por testes de germinação e crescimento do tubo polínico.

Com base na análise de variância realizada, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos referentes ao meio de germinação do grão de pólen, a 5% de probabilidade. Na avaliação da germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *Copernicia prunifera*, o meio de cultura que se mostrou mais adequado foi o meio 2 (M2): 100g L⁻¹ de sacarose; 500mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10g L⁻¹ de ágar, com 84 % dos grãos de pólen avaliados com emissão do tubo polínico. Já o meio M1, obteve 66 % de pólen germinado e o meio M3 76 % (Figura 2).

Os meios analisados se mostraram capazes de promover e sustentar o processo de germinação dos grãos de pólen de Carnaúba. Toda via, o meio de cultura M1 obteve menor capacidade de promover a emissão do tubo polínico *in vitro*. Esse meio de germinação possui em sua composição somente a sacarose associada ao ágar. Entre os constituintes que compõem o meio de cultivo, a concentração de sacarose é um fator fundamental, em que altas concentrações (acima de 30%) podem inibir a germinação dos grãos de pólen. A sacarose tem papel de controlador osmótico e nutricional, sendo que altas concentrações causam desequilíbrio, impedindo a germinação dos grãos de pólen (Almeida et al. 2019; Abdelgadir et al. 2012). Entretanto, no presente trabalho a menor emissão do

tubo polínico no meio M1 provavelmente não está relacionada com a adição em excesso da sacarose no meio de germinação, pois os meios M2 e M3, que proporcionaram maior taxa de germinação do grão de pólen, possuíam a mesma concentração de sacarose que o meio M1. Assim, as diferenças observadas podem estar correlacionadas com a presença do boro no meio M2 e do cálcio no meio M3.

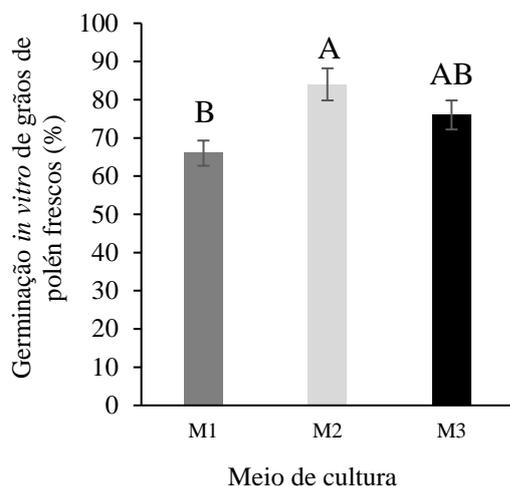


Figura 2. Percentual de germinação *in vitro* de grãos de pólen frescos de *Copernicia prunifera* em três diferentes meios: meio 1 (M1): 100g L⁻¹ de sacarose, 10g L⁻¹ de ágar; meio 2 (M2): 100g L⁻¹ de sacarose, 500mg L⁻¹ de H₃BO₃ e 10g L⁻¹ de ágar e meio 3 (M3): 100g L⁻¹ de sacarose; 300mg L⁻¹ de CaCl₂; 10g L⁻¹ de ágar. As barras com letras distintas diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No presente estudo a emissão do tubo polínico foi favorecida na presença de boro e cálcio no meio de cultivo. Sabe-se que a germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico são significativamente regulados pelo transporte de íons inorgânicos como Ca²⁺ através da membrana plasmática do pólen (Abdelgadir et al. 2012; Machado et al. 2021). O cálcio também é conhecido por estar envolvido na síntese de pectina e no controle de condições osmóticas. A presença de 300 mg L⁻¹ de CaCl₂ no meio de cultura, no presente estudo, proporcionou condição favorável a emissão do tubo polínico.

O boro, que é fornecido por estigmas e estilos, facilita a absorção de açúcar e tem papel importante na produção de pectina no tubo polínico. Tem contribuição efetiva na translocação e metabolismo dos carboidratos, no metabolismo do ácido indolacético e é necessário para a operação eficiente dos sistemas de transporte de membrana. O boro na presença de sacarose forma o complexo

ionizável sacaroseborato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares, facilitando o desenvolvimento *in vitro* do grão de pólen (Figueiredo et al. 2013). No presente estudo, a germinação do pólen foi maximizada em meio contendo 500 mgL⁻¹ de H₃BO₃ enquanto em meios sem adição do boro ocorreu redução significativa do potencial de emissão do tubo polínico.

Os resultados do teste de germinação *in vitro* demonstram que a carnaúba possui alta porcentagem de germinação *in vitro*. Resultados semelhantes foram encontrados por Mondal e Ghata (2012), no qual apontou uma germinação de até 88% dos grãos de pólen de *Solanum macranthum* Dunal com a adição de 100 mg L⁻¹ de ácido bórico ao meio de cultura. A adição de boro também foi benéfica na germinação dos grãos de pólen de amoreira-preta (Figueiredo et al. 2013). Entretanto, Silva et al. (2017) estudando grãos de pólen de *Physalis* (*P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. minima*, *P. peruviana* e *P. pubescens*), mostrou que a adição de boro não propiciou elevação acentuada na porcentagem de germinação.

Uma espécie para ser considerada com boa viabilidade polínica deve apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos (Scorza & Sherman 1995). Como no presente trabalho foram encontrados valores superiores aos relatados pelos autores é possível inferir que a carnaúba possui boa viabilidade dos grãos de pólen, considerando as condições em que foram realizados os ensaios.

Entretanto, o uso de corantes e contagem direta é o método mais rápido e geralmente mais usado para verificar a viabilidade de pólen. No presente estudo a porcentagem de germinação *in vitro* e a porcentagem de viabilidade do pólen, por meio da técnica de coloração, estão em completa concordância devido haver alta correlação entre esses dois fatores.

Entretanto, as reações com corantes podem não se correlacionar bem com a germinação *in vitro* ou com a habilidade de efetuar fertilização, especialmente com pólen armazenado, podendo superestimar o resultado. No presente trabalho observou-se alta conformidade entre germinação do grão de pólen *in vitro* e a utilização da técnica de coloração por meio de corantes, como observado nas figuras 1e 2. Pode-se, então, optar pela observação da capacidade germinativa dos grãos de pólen, em razão de ser um caráter que se correlaciona diretamente com a habilidade para fertilização.

Ensaio 2: Efeito da dessecação dos grãos de pólen

Verificou-se diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade para as metodologias de desidratação dos grãos de pólen (Figura 3).

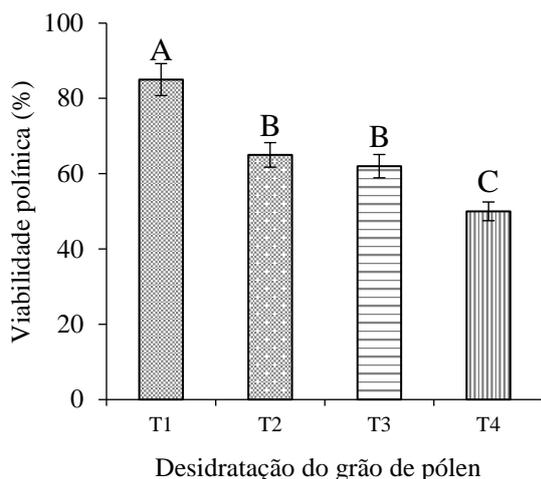


Figura 3. Porcentagem de viabilidade de grãos de pólen de *Copernicia prunifera* submetidos a quatro tratamentos de desidratação: T1) em dessecador com sílica gel, sob vácuo, por 24 h; T2) em liofilizador por 24h; T3) cloreto de cálcio hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e T4) pólen sem redução de umidade. As barras com letras distintas diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A desidratação em sílica gel proporcionou maiores índices de viabilidade polínica, 85 %. Os tratamentos utilizando liofilizador por 24h e cloreto de cálcio dihidratado são estatisticamente semelhantes e a viabilidade do pólen quando submetido a esses tratamentos de desidratação fica entre 65% e 62%, respectivamente. O tratamento sem redução da umidade, pólen sem desidratação, obteve menor viabilidade polínica, 50 % de pólen viáveis após 30 dias da coleta (Figura 3).

Entre os tratamentos de desidratação, os polens sem redução da umidade obtiveram a menor porcentagem de germinação após 30 dias da coleta. Essa acentuada redução na germinação do grão de pólen pode estar relacionada ao alto teor de umidade do pólen, o que pode reduzir a viabilidade ao longo do tempo devido à alta atividade metabólica. Sabe-se que a preservação da viabilidade dos grãos de pólen, durante curto ou longo período de conservação, envolve a redução do grau de umidade, a utilização de temperaturas mais baixas durante o armazenamento e, em alguns casos, a exclusão do oxigênio do interior dos recipientes de armazenamento. Com isto, as variações da taxa respiratória e de outros processos metabólicos são minimizadas, tornando o pólen, então, quase inativo ou dormente durante o tempo de armazenado (França et al. 2010; Giovannini et al. 2017). Somase a isto, a redução da proliferação de microorganismos e, consequentemente da deterioração dos grãos de pólen (Novara et al. 2017). Portanto, a influência desses fatores pode ter promovido uma

menor taxa de germinação do pólen da Carnaúba quando não submetido a processos de desidratação.

A desidratação dos grãos de pólen por meio da liofilização e o uso do cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) não promoveram as melhores condições para a manutenção do grão de pólen da carnaúba. A significativa redução da germinação do grão de pólen pode ser atribuída à baixa eficiência do $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como desidratante, em que o cloreto de cálcio dihidratado tem umidade de 20,8%. Os gametas tendem a equilibrar sua umidade com a umidade do sal. Assim, é possível presumir que os grãos de pólen sob o efeito do desidratante $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ teriam umidade em torno de 20%, não sendo, portanto, suficiente para manter a viabilidade polínica em seu potencial máximo. Todavia, a liofilização é capaz de reduzir a umidade a níveis em torno de 4%. Porém, pólen muito seco pode reduzir sua capacidade germinativa por perder água de constituição (França et al. 2010). A perda elevada de umidade do grão de pólen da carnaúba quando aplicada a técnica de liofilização pode ter, portanto, reduzido à viabilidade polínica.

Por outro lado, a dissecação dos grãos de pólen em sílica gel propiciou a manutenção da viabilidade polínica em níveis mais elevados. A sílica gel tem indicativo de umidade por meio da coloração, sendo a coloração azul indicativo de umidade em torno de 10% e incolor, umidade de 20%. A sílica gel, de cor azul, utilizada para a desidratação dos grãos de pólen não obteve mudanças na coloração, indicando uma umidade próxima a 10%. Esta umidade proporcionou maior conservação da viabilidade do pólen.

Ensaio 3: Efeito de diferentes temperaturas no armazenamento dos grãos de pólen

A análise dos dados indicou interação significativa entre os fatores avaliados (temperatura e meio de germinação), permitindo uma análise de meios de germinação dentro dos níveis de temperatura. As interações foram analisadas e em todos os tratamentos ocorreu redução significativa da viabilidade do pólen ao longo do período de estocagem (Tabela 1). Para avaliar a eficiência da temperatura no armazenamento dos grãos de pólen, foram testados diferentes meios de cultura, a fim de verificar a viabilidade dos grãos de pólen. Na temperatura de 26 °C os meios de cultura usados para germinação do grão de pólen só obtiveram diferença significativa na primeira avaliação, aos 34 dias, onde o M2 diferiu significativamente dos demais. Por outro lado, após 68 dias de estocagem observou-se queda abrupta do percentual de germinação *in vitro* na temperatura de 26 °C e não se observou diferença estatística entre os meios de cultura usados para verificar a viabilidade polínica.

Nas temperaturas de armazenamento referente a 10 °C e -4°C o meio de cultura M1 foi menos eficiente para a germinação dos grãos de

pólen ao longo do período de conservação. Entretanto, os meios M2 e M3 obtiveram melhores condições para a germinação do grão de pólen quando armazenados nas temperaturas de 10 °C e -

4°C., após 68, 102, 136 e 170 dias (Tabela 1). Todavia, o grão de pólen quando germinado no meio M2, aos 34 dias, resultou em maior percentual de germinação.

Tabela 1. Percentagem de germinação de grãos de pólen de carnaúba (*copernicia punifera*) ao longo de 170 dias, em função das temperaturas de armazenamento (26 °C, 10 °C e -4 °C) e meios para germinação *in vitro* (Meio 1 (M1): 100g L⁻¹ de H₃BO₃, 300mg L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4(H₂O) e 10g L⁻¹ de ágar; Meio 2 (M2): 100g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de H₃BO₃ e 10g L⁻¹ de ágar; Meio 3 (M3): 100g L⁻¹ de sacarose e 10g L⁻¹ de ágar).

Temp °C	Meio de cultura	Viabilidade (%)				
		34 Dias	68 Dias	102 Dias	136 Dias	170 Dias
26° C	M 1	55.33 Bb	15.33Ab	10.33Ab	8.41Ab	8.14 Ab
	M 2	65.73Ab	17.61Ab	12.40Ab	10.53Ab	10.12 Ab
	M 3	52.84Bb	23.22Ab	13.73Ab	12.01Ab	11.52 Ab
10° C	M 1	82.13Ba	71.73Ba	58.82Ba	51.87Ba	50.12 Ba
	M 2	88.03Aa	84.27Aa	75.73Aa	66.53Aa	60.14 Aa
	M 3	82.27Ba	84.27Aa	70.67Aa	61.07Aa	59.01 Aa
-4° C	M 1	85.07Ba	66.93Ba	65.87Aa	55.33Ba	50.01 Ba
	M 2	88.53Aa	79.22Aa	66.67Aa	66.13Aa	60.10 Aa
	M 3	84.81Ba	84.27Aa	64.26Aa	59.47ABa	57.10 Aa

*As médias seguidas pela mesma letra maiúscula, entre meios de cultura em uma mesma temperatura de armazenamento, não diferem estatisticamente a $p < 0.05$. As médias seguidas pela mesma letra minúscula entre diferentes temperaturas de armazenamento e mesmo meio de germinação não diferem estatisticamente a $p < 0.05$. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A temperatura de conservação de pólen mostrou ser outro fator de extrema importância. Nesse sentido, os resultados do presente trabalho mostram que a temperatura de estocagem de 10 °C e -4 °C proporcionaram maior viabilidade para o pólen armazenado. Entretanto, no armazenamento ao longo do tempo, a temperatura de 26 °C obteve perda da viabilidade polínica precoce, a partir dos 30 dias (Tabela 1), independente do meio de cultura utilizado para a avaliação da viabilidade polínica. Por outro lado, nas temperaturas de armazenamento de 10°C e -4°C observou-se menor perda da viabilidade polínica, acima de 50% aos 170 dias de armazenamento (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a presença do boro e da sacarose no meio de cultura são mais adequados para a germinação e rápida formação do tubo polínico, devido esses constituintes exercerem influência sobre o equilíbrio osmótico da solução, fornecer energia para o crescimento do tubo polínico, facilitar a absorção de açúcar, auxiliar na produção de pectina no tubo polínico, contribuir efetivamente na translocação e metabolismo dos carboidratos (Araújo et al. 2021).

Meios contendo sacarose e ácido bórico também são bastante utilizados em testes de germinação de grãos de pólen de banana (Souza et al. 2014), obtendo-se resultados significativos de

germinação *in vitro*, acima de 60%. Como também, Figueiredo et al. (2013) ressaltaram que o ácido bórico é fundamental na germinação dos grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. Nogueira (2015), verificou que a aplicação de 900 mg L⁻¹ de ácido bórico em panículas de nespereira “Mizauto” proporcionou aumento de 24,3% na germinação de grãos de pólen, corroborando com o resultado do presente estudo, onde o Meio 2 (100g L⁻¹ de sacarose; 500mg L⁻¹ de H₃BO₃; 10g L⁻¹ de ágar) e o Meio 3 (100g L⁻¹ de sacarose e 10g L⁻¹ de ágar), proporcionaram germinação *in vitro* acima de 50% dos pólenes de Carnaúba armazenados por 170 dias a 10 °C e -4 °C.

Evidenciou-se que a temperatura ambiente não foi adequada para o armazenamento de grãos de pólen de carnaúba, sendo a viabilidade reduzida rapidamente após 34 dias de armazenamento. Esse resultado é corroborado por vários autores (Gomez et al. 2000; Mesnoua et al. 2018), onde a viabilidade de grãos de pólen armazenados em temperatura ambiente pode ser mantida a curto prazo por no máximo 30 dias.

Por outro lado, baixas temperaturas de armazenamento tendem a manter a viabilidade do grão de pólen, devido à redução do metabolismo (Cuchiara et al. 2012; Calic et al. 2021). Torna-se evidente que o pólen dissecado com sílica gel e armazenado em temperaturas entre 10 °C e -4 °C

obteve maiores porcentagens de germinação em relação ao pólen armazenado à temperatura ambiente, mesmo sendo dissecado em sílica gel. Em baixas temperaturas as variações da taxa respiratória e de outros processos metabólicos são minimizadas, tornando o pólen, então, quase inativo ou dormente durante o tempo de armazenamento e como resultado tem-se maior longevidade, altas taxas de viabilidade e emissão do tundo polínico. Além disso, quando se pretende submeter o pólen a temperaturas muito baixas (10 °C ou menos), a redução de umidade é necessária para evitar o rompimento dos tecidos, provocado pelo congelamento intracelular da água contida no pólen (Novara et al., 2017; Impe et al. 2020).

Estes resultados concordam com vários autores (Shekari et al. 2016; Araújo et al. 2021; Calic et al. 2021) que mantiveram o pólen armazenado em temperaturas entre 10 °C e -4 °C por vários meses, embora com um decréscimo de viabilidade em função do tempo de armazenamento. Nesse sentido, os resultados do presente trabalho mostram que a temperatura de estocagem entre 10 °C e 4 °C, com pólen desidratado em sílica propiciou maior viabilidade de pólen, podendo este método ser empregado em programas de melhoramento para permitir cruzamentos entre genótipos com assincronismo diferenciado para o florescimento, conservação dos recursos genéticos da espécie, armazenar pólen para polinização manual.

Conclusões

Os corantes: carmim acético 1%, Reativo de Alexander e lugol são adequados e práticos para analisar a viabilidade polínica dos grãos de pólen da carnaúba;

O meio de cultura adequado para avaliar a viabilidade polínica da Carnaúba contém sacarose e ácido bórico.

A desidratação dos grãos de pólen da carnaúba em sílica gel reduz a umidade interna do grão de pólen a 10%, o que auxilia na viabilidade polínica ao longo do tempo de armazenamento.

O armazenamento do grão de pólen da carnaúba pode ser realizado nas temperaturas de 10 °C e -4 °C. A estocagem do pólen desidratado nessas temperaturas permite manter a viabilidade dos grãos de pólen acima 50 % aos 170 dias de armazenamento.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Referências

Abdelgadir HA, Johnson SD, Staden VJ (2012) Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas*

(Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, 79:132-139. doi: 10.1016/j.sajb.2011.10.005

Alexander, MPA (1980.) Versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, 55:13-18.

Almeida NV, Naziki CYN, Cardoso JC (2019) Characterization of cultivars and low-temperature pollen grain storage in amaryllis (*Hippeastrum* sp.). *Ceres*, 66(6):451-459. doi: 10.1590/0034-737X201966060006

Araújo DCB, Chagas PC, Chagas EA, Moura EA, Oliveira RR, Taveira DL, Ribeiro MI, Grigio ML (2021) Flower stages, germination and viability of pollen grains of *Annona squamosa* L. in tropical conditions. *Acta Scientiarum*, 43:1-10. doi: 10.4025/actascitechnol.v43i1.51013

Cabral JC, Rossi AAB, Klein ME, Vieira FS, Giustina LD (2013) Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes calorimétricos. *Enciclopédia Biosfera*, 9(17):2780-2788.

Calic D, Milojevic J, Belic M, Miletic R, Korac SZ (2021) Impact of storage temperature on pollen viability and germinability of four serbian autochthon apple cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 12:1-6. doi: 10.3389/fpls.2021.709231

Campos SS, Wittmann MTS, Schwarz SF, Veit PA (2015) Biologia floral e viabilidade de pólen em cultivares de caqui (*Diospyros kaki* L.) e *Diospyros virginiana* L. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, 37(3):685-691. doi: 10.1590/0100-2945-154/14.

Cuchiarra CC, Silva DAS, Bobrowski VL (2012) Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. *Revista Ceres*, Viçosa, 59(1): 82-87. doi: 10.1590/S0034-737X2012000100012

Dafni A, Kevan PG, Husband BC (2005) *Practical pollination biology*. Ontario: Enviroquest Ltd. 200p.

Ferreira CdaS, Nunes JAR, Gomes RLF (2013) Manejo de corte das folhas de *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore no Piauí. *Revista Caatinga*, Mossoró, 26(2):25-30.

Figueiredo MA, Pio R, Silva. TC, Silva KN (2013) Características florais e carpométricas e germinação in vitro de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 48(7):731-740.

França LVde, Nascimento W M, Carmona R, Freitas R (2010) Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(1):053-059, 2010.

Giovannini A, Macovei A, Caser M, Mansuino A, Ghione GG, Savona M, Carbonera D, Scariot V,

- Balestrazzi A (2017) Pollen grain preservation and fertility in valuable commercial rose Cultivars. *Plants*, 6(17):1-8. doi: 10.3390/plants6020017.
- Gomez P, Gradziel TM, Ortega E, Dicenta F (2000) Short term storage of almond pollen. *HortScience*, Alexandria, 35(6):151-152.
- Hister CAL, Tedesco SB (2016) Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, 18(1):135-141. doi: 10.1590/1983-084X/15_081
- Impe D, Reitz J, Köpnick C, Rolletschek H, Börner A, Senula A, Naguel M (2020) Assessment of pollen viability for wheat. *Frontiers in Plant Science*, 10(1588):1-13. doi: 10.3389/fpls.2019.01588
- Kearns CA, Inouye DW (1993) *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, 583p.
- Machado CA, Vandrame WA, Neto AR, Chagas EA, Chagas PC, Lédo AS (2021) In vitro viability of pollen grain of dwarf coconut accession. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 17:1-8. doi: doi.org/10.46526/pccm.2021.v17.166
- Melo Júnior AF, Carvalho D, Brandão MM, Sousa LG, Vieira FA, Menezes EV, Royo VA, Oliveira DA (2015) Spatial genetic structure of *Cavanillesia arborea* K. Schum. (Malvaceae) in seasonally dry tropical forest: implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58:114-119. doi: 10.1016/j.bse.2014.11.004
- Mesnoui M, Roumani M, Salem A (2018) The effect of pollen storage temperatures on pollen viability, fruit set and fruit quality of six date palm cultivars. *Scientia Horticulturae*, 236:279-283. doi: 10.1016/j.scienta.2018.03.053
- Mondal S, Ghanta R (2012) Effect of sucrose and boric acid on in vitro pollen germination of *Solanum Macranthum* Dunal. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 2:202-206.
- Nogueira PV (2015) Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. *Bragantia*, Campinas, 74(1):9-15. doi: 10.1590/1678-4499.0264
- Novara C, Ascari L, Morgia V, Reale L, Siniscalco C (2017) Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. *Scientia Horticulturae*, 214(5):295-303. doi: 10.1016/j.scienta.2016.11.042
- Queiroga VP, Ramos GA, Assunção MV, Almeida FAC (2013) *Carnaubeira*: tecnologia de plantio e aproveitamento industrial. Campina Grande: UFCG, 204p.
- R Development Core Team. R: A language, environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2011.
- Radice S, Galati BG, Zarlavsky G, Arena ME (2020) Histological changes of *Berberis mikuna* pollen grains in relation to viability and germinability. *Flora*, 268:1-6. doi: 10.1016/j.flora.2020.151623
- Rodrigues LC, Silva AA, Silva RB, Oliveira AFM, Andrade LHC (2013) Conhecimento e uso da carnaúba e da algaroba em comunidades do sertão do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. *Revista Árvore*, 37(3):451-457.
- Salm R, Sardim MAG, Albernaz ALKM (2011) Abundância e diversidade de palmeiras no Distrito Florestal Sustentável da rodovia BR-163, Pará, Brasil. *Biota Neotropica*, Campinas, 11(3):99-105.
- Scorza R, Sherman WB (1995) Peaches. In: Janik J, Moore JN. *Fruit breeding*. New York: John & Sons, 440p.
- Shekari A, Nazeri V, Shokrpour M (2016) Pollen viability and storage life in *Leonurus cardiaca* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3):101-104. doi: 10.1016/j.jarmap.2016.02.004
- Silva DF, Pio R, Nogueira PV, Silva PAO, Figueiredo AL (2017) Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. *Revista Ciência Agronômica*, 48(2):365-373. doi: 10.5935/1806-6690.20170042
- Souza EH, Souza FVD, Rossi ML, Brancalleão N, Ledo CAS, Martinelli AP (2014) Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic Forest. *Euphytica*, 44:37-42. doi: 10.1007/s10681-014-1273-3
- Vieira IR, Oliveira JS, Verola CF, Loiola MIB (2016) Traditional knowledge, use, and management of *Copernicia prunifera* H. E. Moore (carnaúba) in Northeastern Brazil. *Espacios*, Venezuela, 37(8):18.
- Wang LWUJ, Chen J, Fu D, Zhang C, Cai C, Ou L (2015) A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Scientia Horticulturae*, 188(4):78-83. doi: 10.1016/j.scienta.2015.03.021.
- Zambon CR, Silva LFO, Pio R, Figueiredo MA, Silva KN (2014) Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36:400-407. doi: 10.1590/0100-2945-095/13.