

Influência da Sacarose na Germinação de Pólen *In vitro* de Passifloras Silvestres

Taliane Leila Soares¹; Eder Jorge de Oliveira²; Onildo Nunes de Jesus²; Cássia Adriana Dourado Martins³; Janay Almeida dos Santos-Serejo²

Resumo

Métodos rápidos e fáceis para avaliar a qualidade do pólen são essenciais em programas de melhoramento genético, especialmente em maracujazeiro. O objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade polínica mediante a germinação *in vitro* de pólen, bem como a emissão do tubo polínico em meio de cultura contendo diferentes concentrações de sacarose. O pólen foi coletado de flores em antese e inoculado em meio de cultura 0,03% de Ca(NO₃).4H₂O, 0,02% de Mg(SO₄).7H₂O, 0,01% de KNO₃, 0,01% de H₃BO₃, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0, variando-se a concentração de sacarose. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro acessos de maracujazeiro (BGM 172, BGM 046, BGM 148 e BGM 002) e quatro doses de sacarose (0, 5, 10, 15, 20%) com quatro repetições. As avaliações foram realizadas 24 horas após a inoculação do pólen no meio. A concentração de 15% acrescida no meio de cultura proporcionou maior porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico. O acesso BGM 172 apresentou a mais alta taxa de germinação na concentração de 15% de sacarose, embora não diferindo estatisticamente dos acessos BGM 046 e BGM 002.

Introdução

Com a recente inclusão de espécies de passifloras silvestres ao próspero mercado de plantas ornamentais, tornam-se essenciais informações a cerca da viabilidade polínica, principalmente para a identificação de genitores masculinos para posterior utilização em programas de hibridação. Para dessa forma, contribuir para conservar e explorar os recursos biológicos existentes nos programas de pesquisa da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Existem várias técnicas para estimar a viabilidade dos grãos de pólen, como coloração com corantes químicos (Kearns and Inouye 1993); germinação *in vitro* (Cruz et al. 2008) e *in vivo* pela observação do crescimento do tubo polínico sobre o estigma e o pistilo, e formação de sementes após a polinização (Ferreira et al. 2006). Entretanto, a germinação *in vitro* é o método mais utilizado para determinar a fertilidade do pólen, já que simula as condições do estilo-estigma, induzindo a germinação do tubo polínico. Cada espécie requer um protocolo específico de meio de cultura para a obtenção de boa germinação de pólen.

A maioria dos trabalhos na literatura vem apontando, por sua vez, a sacarose como ingrediente estimulador necessário à germinação do pólen além de ser considerado como fonte de energia para o crescimento do tubo polínico (Baloch et al. 2001, Salles et al. 2006). Mesmo em meios com concentrações adequadas de açúcar e/ou complementados com alguns elementos estimulantes, nem sempre é possível obter a maximização da germinação do pólen maduro. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a germinação de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico de quatro espécies silvestres de passiflora em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

Material e Métodos

Os grãos de pólen de quatro espécies silvestres de passiflora *P. racemosa*, *P. edmundoi*, *P. giberti* e *P. cincinnata* (Figura 1) provenientes da coleção de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 35 mL de meio de cultura 0,03% de Ca(NO₃).4H₂O, 0,02% de Mg(SO₄).7H₂O, 0,01% de KNO₃, 0,01% de H₃BO₃, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0, variando-se a concentração de sacarose (0, 5, 10 e 15%) no meio.

Com auxílio de um pincel, o pólen coletado de flores na antese (momento em que a flor está completamente aberta, permitindo a liberação do pólen), foi distribuído sobre o meio de cultura de modo a

¹Pós-Doutoranda Embrapa/UFRB, Cruz das Almas,BA, CEP: 44380-000, E-mail: talialeila@gmail.com.

²Pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, C.P 007, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; onildo@cnpmf.embrapa.br; janay@cnpmf.embrapa.br.

³Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP: 44380-000, E-mail: cassia_ef@yahoo.com.br

promover uma distribuição mais homogênea do material. Utilizou-se para cada placa uma amostra composta de pólen oriundo de cinco flores de cada espécie.



Figura 1. Aspecto geral das flores de passifloras silvestres: A) BGM 002 (*P. cincinnata* Mast.); B) BGM 172 (*P. racemosa* Brot.); C) BGM 046 (*P. edmundoi* Sacco); D) BGM 148 (*P. giberti* N. E. Br.).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com 16 tratamentos, com quatro acessos silvestres (BGM 002; BGM 172; BGM 046 e BGM 148) e quatro doses de sacarose (0; 5; 10 e 15%) e seis repetições.

Para a percentagem de germinação *in vitro* (GIV) de pólen foram contabilizados todos os grãos da placa, enquanto para o comprimento do tubo polínico foram mensurados aleatoriamente 5 tubos em cada placa de Petri, totalizando 40 tubos polínicos de cada genótipo estudado. O comprimento do tubo polínico (CP) foi medido em micrômetros, utilizando-se estereomicroscópio e lâmina micrométrica e os dados foram transformados em milímetros. Foram considerados germinados os grãos de pólen que possuíam tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

Os dados de percentagem foram transformados para $\arcsin(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística. Em seguida foram submetidos à análise de variância e os graus de liberdade entre os fatores, assim como suas interações, foram desdobrados via teste de comparações de médias e análise de regressão polinomial, com nível de significância a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Houve diferenças significativas ($p < 0,01$) nos valores de germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico, tanto dentro das concentrações de sacarose quanto entre os acessos de passifloras, ocorrendo também à interação entre os fatores estudados. Observaram-se uma grande quantidade de grãos de pólen estourados nos genótipos em meio sem sacarose (Figura 1a). A germinação desses genótipos foi muito baixa, variando de 0% do acesso BGM 148 para 16,90% no acesso BGM 172 (Tabela 1). Muitos trabalhos na literatura relatam à eclosão dos grãos de pólen *in vitro* cultivados em meio contendo apenas água ou em baixas

concentrações de sacarose. Segundo Loguercio (2002), os tubos se rompem devido entre outros fatores ao aumento da pressão osmótica e à baixa resistência da parede celular, ocorrendo um rápido influxo de água no pólen, causando perda de substâncias e íons solúveis no citoplasma, o que é conhecido como *inhibition damage*.

Dentre acessos avaliados o BGM 172 apresentou ligeiramente os mais altos percentuais de germinação com 71,30% de pólen germinados na concentração de 15% de sacarose (Figura 1b), embora não difera estatisticamente dos acessos BGM 046 e BGM 002 (Tabela 1). Por outro lado, os mais baixos valores de germinação nessa concentração de sacarose foram registrados para o acesso BGM 148 com 13,30% (Figura 1c).

Na avaliação da melhor dose de sacarose, os acessos apresentaram comportamento semelhante, sendo o melhor resultado obtido na concentração de 15% de sacarose. Resultados de pesquisa mostram que maior porcentagem de germinação com a elevação da concentração de sacarose pode ser explicada pela maior disponibilidade de energia na forma de carboidrato.

A adição de sacarose como fonte de carboidratos visa a suprir as necessidades metabólicas dos explantes, participando na geração de energia ou como fonte de esqueletos carbônicos para os processos biossintéticos implicados na diferenciação celular. Maior porcentagem de germinação com a elevação da concentração de sacarose pode ser explicada pela maior disponibilidade de energia na forma de carboidrato. Resultados semelhantes foram obtidos com outras espécies no ajuste de diferentes componentes do meio de cultura, que observaram um acréscimo na porcentagem de germinação de grãos e pólen com o aumento da concentração de sacarose (Xie et al. 2004, Chagas et al. 2010).



Figura 1. Comportamento dos grãos de pólen *in vitro*: A) Grãos de pólen estourados (seta); B) Alta porcentagem de germinação do acesso BGM 172; C) Baixa porcentagem de germinação do acesso BGM 148.

Tabela 1. Percentagem de germinação dos grãos de pólen de maracujazeiro cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

Genótipos	Concentração de sacarose (%)			
	0	5	10	15
BGM 172 (<i>P. racemosa</i>)	16,90 aC	21,30 aC	36,30 aB	71,30 aA
BGM 046 (<i>P. edmundoi</i>)	3,65 bC	11,55 abBC	19,80 bB	69,90 aA
BGM 148 (<i>P. giberti</i>)	0,83 bAB	1,57 cB	7,55 bAB	13,30 bA
BGM 002 (<i>P. cincinnata</i>)	0 bC	4,55 cBC	16,30 bB	64,55 aA
CV (%)	18,04			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação ao comprimento do tubo polínico, os valores variaram conforme os acessos estudados e as concentrações de sacarose avaliadas (Tabela 2). O acesso BGM 172 apresentou maior comprimento do tubo polínico com 3,36 mm quando o pólen foi cultivado em meio suplementado com 15% de sacarose. Por outro lado, os menores tubos polínicos foram observados no meio isento de sacarose. Para Scorza and Sherman (1995), um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de germinação, com tubos bem desenvolvidos.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam observações em outras culturas, de que a sacarose é um dos componentes necessários para a germinação de pólen e também exerce a função do equilíbrio osmótico da solução, além de fornecer energia necessária para o crescimento do tubo polínico (Stanley and Linskens 1974).

Tabela 2. Comprimento do tubo polínico de maracujazeiro cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

Genótipos	Concentração de sacarose (%)			
	0	5	10	15
BGM 172	1,05 aC	1,69 aC	2,49 abB	3,36 aA
BGM 046	0,89 abB	1,46 aB	2,63 aA	2,47 bA
BGM 148	0,26 bcB	0,69 bB	1,84 bcA	2,35 bA
BGM 002	0,00 cC	1,26 bBC	1,74 cAB	2,39 bA
CV (%)	72,00			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conclusões

Existe variabilidade no percentual de pólen germinado e comprimento do tubo polínico em relação às concentrações de sacarose utilizadas no estudo;

A adição de 15% de sacarose no meio de cultura favorece maior germinação de pólen e o desenvolvimento do tubo polínico;

Para utilização como parental masculino em programas de hibridação a maioria dos acessos estudados, à exceção do BGM 148 mostra-se aptos já que apresentam uma taxa de germinação acima de 60%, e tubos polínicos bem desenvolvidos.

Referências Bibliográficas

- Baloch MJ, Lakho AR, Bhutto H and Solangi MY BGM (2001) **Journal of Biological Sciences** 4: 402-403.
- Chagas EA, Pio R, Chagas PC, Pasqual M, Bettiol Neto J and Et al (2010) Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciências Rural** 40: 231-236.
- Cruz TV, Souza MM, Roza FA, Viana AJC, Belo GO and Fonseca JWS (2008) Germinação *in vitro* de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. **Revista Brasileira de Fruticultura** 30: 875-879.
- Ferreira CA, Von Pinho EVR, Alvim PO and Silva TTA (2006) Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: **XXVI Congresso Nacional de milho e sorgo – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO**, ABMS/EMBRAPA-CNPMS, Belo Horizonte.
- Kearns CA and Inouye D (1993) **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado, 579p.
- Loguercio LL (2002) Pollen treatment in high osmotic potencial: a simple tool for *in vitro* preservation and manipulation of viability in gametophytic populations. Brazilian. **Journal Plant Physiology** 14: 65-70.
- Scorza R and Sherman WB (1995) Peaches. In: Janik J and Moore JN. (ed.). **Fruit breeding**. New York: John & Sons, p.325-440.
- Salles LA, Ramos JD, Pasqual M, Junqueira KP and Silva AB (2006) Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciências e Agrotecnologia** 30: 170-174.
- Stanley RG and Linskens HF (1974) **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer-Verlag, 17p.
- Xie S, Luo X, Wu Y and Lovatt CJ (2004) Pollen viability of Asian pear and effect of PGR, B and sucrose on germination and pollen tube development. **Journal of Fruit Science** 21: 289-294.