

VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DO PÓLEN DE LINHAGENS PARENTAIS DE CEBOLA HÍBRIDA¹

MARIA CRISTINA AFFONSO LORENZON² e ÉLCIO CRUZ DE ALMEIDA³

RESUMO - Experimentos foram conduzidos em Igarapé, MG, em campo de produção de cebola híbrida (*Allium cepa* L.), e em Viçosa, MG, com o objetivo de investigar a fertilidade de linhagens parentais de cebola híbrida. A viabilidade do pólen foi testada pelo contraste com carmim acético. A capacidade germinativa foi estudada nos seguintes meios de cultura: a) solução de sacarose a 5%; b) solução de sacarose a 10%; c) solução com 50 ppm de ácido bórico + 0,5 g de ágar + 10 g de sacarose. O pólen germinado ficou contrastado com azul-de-amã. Foram observados lipídios em presença de sudam IV. Avaliou-se a produção de sementes híbridas por flor em condições de polinização natural e artificial. Pelo teste com carmim acético o pólen apresentou-se viável, porém não germinou adequadamente em meio de cultura. Existem fatores que interferem negativamente em sua fertilidade. Em campo, a germinação do pólen no estigma da linhagem macho-estéril foi satisfatória. A presença de lipídios no pólen e no estigma indicou a importância da ação de insetos polinizadores nesta florada.

Termos para indexação: *Allium cepa*, fertilidade, carmim acético, lipídios, sementes.

POLLEN VIABILITY AND GERMINATION OF PARENTAL LINES OF ONION HYBRIDS

ABSTRACT - Experiments were conducted in Igarapé, MG, Brazil, on hybrid onion culture, and in Viçosa, MG, to investigate the fertility of parental lines of hybrid onion. Pollen viability was tested by contrast with acetic carmine. The germinate capacity was studied in the following culture media: a) saccharose 5% solution; b) saccharose 10% solution; c) 50 ppm solution of boric acid + 0.5 g of agar + 10 g of saccharose. The germinated pollen formed a contrast with "azul-de-amã". Lipids were observed in the presence of sudam IV. The production of hybrid seeds per flower under conditions of natural and artificial pollinization was evaluated. By the acetic carmine test, the pollen showed to be viable, but did not germinate adequately in culture medium. There are factors which interfere negatively with its fertility. In the field, pollen germination in the stigma of the sterile male lines was satisfactory. The presence of lipids in the pollen and in the stigma showed the importance of the action of insect pollinators in this flowering.

Index terms: *Allium cepa*, fertility, acetic carmine, fat, saccharose, seeds.

INTRODUÇÃO

A descoberta da macho-esterilidade genético-citoplasmática permitiu a obtenção em grande escala de cultivares híbridas (F₁) de cebola, com repercussão favorável entre os produtores (Melo & Ribeiro, 1990).

Entretanto, vêm-se observando dificuldades e flutuações na produção de sementes híbridas (Campbell et al., 1968). Para Ali et al. (1983), o elevado grau de endogamia presente nas linhagens parentais macho-fértil e macho-estéril torna-as suscetíveis a estresse ambiental. Entre inúmeros fatores que afetam a produção de sementes híbridas, Mann & Woodbury (1969) citam a duração do tempo de receptividade do estigma e a longevidade do pólen. Ockendon & Gates (1975) verificaram que plantas macho-férteis que floresceram em agosto apresentaram alto nível de pólen não-viável. Para Ali et al. (1983), pequenas diferenças no tempo de florescimento entre plantas macho-férteis e macho-estéreis e características de viabilidade e germina-

¹ Aceito para publicação em 13 de novembro de 1996.

Extraído da Tese de Mestrado em Entomologia apresentada à Universidade Federal de Viçosa pela autora.

² Zoot., M.Sc., Prof. Assistente, DZ/CCA/UFPB, Caixa Postal 49, CEP 58397-000 Areia, PB.

³ Biól., M.Sc., Prof. Assistente, DBV/UFV, CEP 36570-000 Viçosa, MG.

bilidade provavelmente teriam influência considerável na produção final de sementes. Lacerda (1991) verificou a ação negativa da aplicação dos pesticidas cartape, clorotalonil, mancozebe, dibromo, metalaxil + mancozebe sobre a germinação do pólen do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.).

Considerando que as características fisiológicas do pólen podem comprometer a eficiência dos insetos polinizadores e, portanto, repercutir na produção de sementes, investigou-se a fertilidade do pólen em linhagens parentais de cebola híbrida.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em área comercial de produção de sementes híbridas de cebola, localizada no Município de Igarapé, Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais (19°58' S latitude sul, 44°12' W longitude e, 822 m de altitude, obtidas de Betim, a 15 km de Igarapé). Em outra área, com 4 m², localizada no Horto Botânico da Universidade Federal de Viçosa, no Município de Viçosa, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais (20°44' S latitude sul, 42°54' W longitude e 640 m de altitude, situada a 350 km de Igarapé), foram replantadas plantas em floração, originárias da área comercial, escolhidas ao acaso.

Utilizaram-se as linhagens BP 5-6, como macho-estéril, e BP 1-3 (macho-fértil), como polinizadora. O plantio dos bulbos ocorreu em 23 e 24 de maio de 1990.

Durante o período de floração na área comercial, houve necessidade de duas irrigações, tipo infiltração, por semana, além de duas pulverizações com inseticidas, em mistura, fenitrotion + deltametrina e os fungicidas metalaxil + mancozebe para o controle de *Thrips tabaci*, *Alternaria porri* e *Peronospora destructor*, respectivamente. As amostragens foram feitas após a aplicação dos pesticidas. Foram obtidos dados diários de temperatura (em graus centígrados) e de precipitação pluvial (em mm). As coletas de pólen e a análise do estigma foram feitas pela manhã entre 7h 30 min e 10h 30 min.

A viabilidade e os meios de cultura para a germinação do pólen, foram testados em estudos preliminares com a linhagem macho-fértil, cultivada em abril, cujo plantio e tratamentos culturais foram idênticos aos das plantas experimentais. Essa amostragem, ocasional, ocorreu no início da floração, antes da aplicação dos pesticidas. Posteriormente, esses testes - feitos após a aplicação dos inseticidas - foram repetidos nas linhagens experimentais cultivadas em maio, também ocasionais. Utilizaram-se os seguintes

meios de cultura: a) solução com 5% de sacarose; b) solução com 10% de sacarose (Prasad & Batham, 1975); c) solução com 50 ppm de ácido bórico + 0,5 g de ágar + 10 g de sacarose (Maisonneuve & Den Nijs, 1984). Quatro placas-de-petri e os meios de cultura foram autoclavados a 180°C, por duas horas. A germinação do pólen foi feita à temperatura ambiente (aproximadamente, 25°C), e em incubadora com controle de temperatura (25°C), conforme Barham & Munger (1950) e Minami & Haag (1989), com luz regular de 40 w, a 40 cm de distância da placa. Nos três meios de cultura, foi semeado o pólen de diversas anteras de dez plantas diferentes. Após duas horas, e, em seguida, de hora em hora, até o período de 24 horas, foram preparadas cinco lâminas de cada placa, coloridas com azul-de-amã (Jonhansen, 1940); fez-se a contagem dos tubos polínicos formados em microscópio ótico, aumentado em 400 vezes. O percentual de germinação representou a taxa entre o número de grãos que emitiram tubo polínico, pelo menos com o diâmetro do grão (Mann & Woodbury, 1969), e os que não emitiram.

Para testar a viabilidade do pólen, esses grãos foram retirados de anteras oriundas de 15 flores recém-abertas e de plantas diferentes. Os grãos de pólen foram contrastados em presença de carmim acético (Linsley & Cazier, 1963; Terrel et al., 1965; Lawrence, 1966; Almeida, 1986). Foram observados diversos pontos da lâmina em microscópio ótico aumentado em 400 vezes. Estimou-se o percentual de viabilidade do pólen que representou a taxa entre o número de grãos corados e os não-corados (não-viáveis).

A receptividade do estigma foi observada, analisando-se a germinação de grãos de pólen em 16 gineceus maduros no estágio quatro (Currah & Ockendon, 1978), quando os estigmas se mostravam brilhantes e com papilas, coletados ao acaso, de 40 plantas macho-estéreis, de diversas flores e em diferentes horários e dias. Para tanto, os estigmas foram cortados, macerados em lâminas e contrastados com azul-de-amã. Os tubos polínicos formados foram contados em microscópio ótico aumentado em 400 vezes.

Com o intuito de verificar a fertilidade da linhagem macho-estéril em condições de campo, analisou-se, na área comercial, a produção de sementes híbridas através da polinização natural, manual e por autofecundação. Esta última é recomendável, já que a esterilidade da linhagem macho-estéril não é absoluta. De 100 plantas foram escolhidas dez umbelas e, em cada uma delas, 20 flores foram tomadas ao acaso para cada tratamento. As plantas polinizadas manualmente e autofecundadas foram isoladas em gaiolas teladas de náilon (0,5 x 0,5 mm).

Para destacar a importância da polinização entomófila, observou-se a presença de lipídios no pólen. Colheram-se 20 flores ao acaso, pela manhã, e retirou-se o pólen das anteras. Os estigmas de 20 flores coletadas de cada linhagem foram cortados e macerados. Pólen e estigmas macerados foram contrastados com sudam IV e observados em microscópio ótico, aumentado em 400 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o florescimento da cebola das plantas experimentais, que durou 50 dias (de julho a setembro), as condições climáticas foram amenas. O tempo esteve ensolarado durante a maior parte do período, sem interrupções prolongadas, decorrentes de frio, chuva ou seca. A temperatura oscilou entre 20 e 27°C, a umidade relativa do ar variou entre 61 e 71% e a pluviosidade acumulada durante a floração foi de 3 mm.

As plantas mostraram desenvolvimento satisfatório e não houve estresse naquelas isoladas por telado. As aplicações de pesticidas foram suficientes para controlar as doenças e pragas de maior incidência na cebola.

Pelo teste com carmim acético, mais de 84% dos grãos de pólen ficaram bem avermelhados (viáveis) e menos que 16% não se coloriram (Tabela 1). A receptividade do estigma foi baixa, porém, na linhagem feminina, observou-se poucos (no máximo 5) tubos polínicos nos estigmas após contraste com azul-de-amã (corados de azul) (Tabela 2). Provavelmente, o baixo número de plantas disponíveis no Horto Botânico tenha sido um fator limitante à atratividade dos insetos por essas flores, reduzindo as possibilidades de fecundação.

TABELA 1. Viabilidade média do pólen, em presença de carmim acético, da linhagem macho-fértil BP 1-3. Leitura feita em três lâminas e em cada cinco campos sob microscópio ótico, aumentado em 400 vezes. Viçosa, MG, setembro/1990.

Tipo de pólen	Viabilidade do pólen (%)		
	Lâmina 1	Lâmina 2	Lâmina 3
Colorido	88,40	98,20	84,42
Não-colorido	11,60	1,80	15,58

TABELA 2. Número de tubos polínicos observados em 8 estigmas macerados da linhagem macho-estéril BP 5-6, duas a cinco horas após a polinização manual. Leitura sob microscópio ótico, aumentado em 400 vezes. Viçosa, MG, setembro/1990.

Horas após polinização (h)	Estigma							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2	1	1	1	0	1	1	0	2
3	3	1	2	5	0	2	1	3
4	0	0	0	0	0	1	0	0
5	0	1	0	0	0	1	0	0

Os ensaios de germinação do pólen em meio de cultura com a linhagem macho-fértil, BP 1-3, cultivada em abril (não-experimental), apresentaram taxas de germinação acima de 90% em meio de solução com ácido bórico, em condições ambientais. No entanto, a mesma linhagem cultivada em maio apresentou germinação não superior a 30% em todos os meios estudados (Tabela 3). Verificou-se que o meio de cultura sólido contendo ágar (5 g/L), ácido bórico (50 ppm) e sacarose (10 g/L) foi o mais adequado à germinação da linhagem macho-fértil BP 1-3. Entretanto, para se verificar a influência na germinação do pólen, são necessárias observações com aplicação e não-aplicação de defensivos.

Em relação à polinização manual, verificou-se que esta também não foi eficiente para aumentar o número de pólenes germinados (máximo de 7 tubos polínicos). Currah & Ockendon (1978, 1984) e Ali et al. (1983) encontraram, na maioria das amostras observadas, número de tubos polínicos acima de 20 e abaixo de 50. Baixo também foi o número médio de sementes por flor (2,09 sementes). Sob condições climáticas favoráveis e com alta população de insetos, a polinização natural na área comercial apresentou-se mais eficiente, com média de 3,57 sementes híbridas por flor, produção esta relevante se comparada aos dados de Ewies & El-Sahhar (1977), que obtiveram 3,2 sementes por flor em cultivares não-híbridas. Deve-se considerar que, em ambas as condições, a produção poderia ser maior, caso a germinação do pólen não se mostrasse tão baixa.

TABELA 3. Percentual médio de pólen germinado da linhagem macho-fértil BP 1-3 de cebola, em três meios de cultura, a temperatura ambiente e controlada. Leitura em cinco campos, por lâmina, sob microscópio ótico, aumentado em 400 vezes. Viçosa, MG, setembro/1990.

Meio de cultura	Lâmina 1		Lâmina 2		Lâmina 3		Lâmina 4		Lâmina 5	
	Ambiente	Controlada	Ambiente	Controlada	Ambiente	Controlada	Ambiente	Controlada	Ambiente	Controlada
5% sacarose	4,16	2,41	3,75	2,89	3,87	2,32	3,90	3,12	3,97	2,85
10% sacarose	3,89	3,75	3,65	3,75	3,76	3,10	3,23	2,80	4,05	4,45
0,5% ágar + 50 ppm H ₂ BO ₃ + 10 g sacarose	0,80	29,41	11,20	9,13	9,56	8,67	10,53	9,62	11,50	10,23

Não se observou produção de sementes nas plantas isoladas (sem insetos), conforme o esperado, mostrando que a macho-esterilidade foi absoluta e que a linhagem macho-fértil não apresentou auto-incompatibilidade entre flores da mesma planta. Este fato é confirmado pela presença de lipídios no pólen e nos estigmas, após contraste com sudam IV (coloração amarelo-alaranjada), em ambas as linhagens. Como o pólen e o estigma ficam pegajosos, torna-se necessária a ação de insetos para a fecundação das flores da cebola, em coincidência com as afirmações de Bohart et al. (1970), Free (1970) e Benedek & Gaal (1972).

CONCLUSÃO

Há fatores extrínsecos à flor que interferem na fertilidade do pólen, e que afetam a produção de sementes da cebola híbrida.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão de bolsas de estudo que possibilitaram a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ALI, M.; DOWKER, B.D.; CURRAH, L.; MUNFORD, P.M. Floral biology and pollen viability of parental lines of onion hybrids. *Annals of Applied Biology*, v.104, p.167-174, 1983.
- ALMEIDA, E.C. DE Biologia floral e mecanismo de reprodução em *Crotalaria mucronata* Desv. *Revista Ceres*, v.33, p.528-540, 1986.
- BARHAM, W.S.; MUNGER, H.G. The stability of male sterility in onions. *Proceeding of the American Society for Horticultural Science*, v.56, p.401-403, 1950.
- BENEDEK, P.; GAAL, E. The effect of insect pollination on seed onion with observations on the behavior of honeybees on the crop. *Journal of Apicultural Research*, v.11, p.175-180, 1972.
- BOHART, G.E.; NYE, W.P.; HAWTHORN, L.R. Onion pollination as affect by different levels of pollination activity. *Bulletin of Utah Agriculture Experimental Station*, v.482, p.1-60, 1970.

- CAMPBELL, W.F.; COTNER, S.D.; POLLOCK, B. M. Preliminary analyses of the onion seed (*Allium cepa* L.). Production problem, 1966. Growing season. *Hortscience*, v.3, n.1, p.40-41, 1968.
- CURRAH, L.; OCKENDON, D.J. Pollination activity by blowflies and honeybees on onions in breeder's cages. *Annals of Applied Biology*, v.105, p.167-176, 1984.
- CURRAH, L.; OCKENDON, D.J. Protandry and the sequence of flower opening in the onion (*Allium cepa* L.). *New Phytologist*, v.81, p.419-423, 1978.
- EWIES, M.A.; EL-SAHHAR, K.F. Observations on the behavior honeybees on onion and their effects on seed yield. *Journal of Apicultural Research*, v.16, n.4, p.194-196, 1977.
- FREE, J.B. *Insect pollination of crops*. London: Academic Press, 1970. 544p.
- JONHANSEN, J.B. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.
- LACERDA, C.A. *Interferência in vitro de agrotóxicos na germinação e no desenvolvimento do tubo polínico do tomateiro, Lycopersicum esculentum Mill. cv. Santa Cruz Kada*. Viçosa: UFV, 1991. 52p. Tese de Mestrado.
- LAWRENCE, G.H.M. *Taxonomy of vascular plants*. New York: McMillan, 1966. 823p.
- LINSLEY, E.G.; CAZIER, M.A. Further Observations on bees which take pollen from plant of the genus *Solanum*. *Pan Pacific Entomologist*, v.30, p.1-18, 1963.
- MAISONNEUVE, B.; DEN NIJS, A.P.M. In vitro pollen germination on the growth of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) and its relation with plant growth. *Euphytica*, v.33, p.833-840, 1984.
- MANN, L.P.; WOODBURY, G.W. The effect of flower age, time of day and variety on pollen germination of onion, *Allium cepa* L. *American Society for Horticultural Science*, v.94, p.102-104, 1969.
- MELO, T.P.C.; RIBEIRO, A. Produção de sementes de cebola: cv. de polinização aberta e híbridos. In: CASTELLANE, P.D.; NICOLORI, W.M.; HASEGAWA, M. (Eds.). *Produção de sementes de hortaliças*. Jaboticabal: FCAV/FUNEP, 1990. p.15-59.
- MINAMI, K.; HAAG, H.P. *O Tomateiro*. Campinas: Fund. Cargill, 1989. 397p.
- OCKENDON, D.J.; GATES, P.J. Reduced pollen viability in the onion (*Allium cepa* L.). *New Phytologist*, v.76, p.511-517, 1975.
- PRASAD, A.; BATHAM, R.D. Studies on pollen morphology, viability and germination in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Plant Science*, v.7, p.71-75, 1975.
- TERREL, E.E.; HOVIN, A.W.; HILL, H.D. Natural hybrids between *Shenopholis obtusada* and *Trisetum pensylvanicum* (Graminae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, v.92, p.169-182, 1965.