

Germinação *In vitro* e Viabilidade Polínica em Passifloras Silvestres

Ádila Melo Vida¹; Taliane Leila Soares²; Eder Jorge de Oliveira³; Onildo Nunes de Jesus³; Fernanda Vidigal Duarte Souza³; Thaina Teixeira de Cerqueira⁴; Janay Almeida dos Santos-Serejo³

Resumo

Os programas de melhoramento genético em *Passiflora* utilizam, em sua maioria, as espécies silvestres como fontes de resistência a doenças. Porém, novo enfoque vem sendo dado para sua utilização como plantas ornamentais. O objetivo do trabalho foi identificar o meio adequado para a germinação *in vitro* de pólen de seis espécies silvestres de maracujazeiro bem como examinar a viabilidade do pólen por meio do uso do corante 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e do lugol. O meio de cultura contendo 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de KNO_3 , 0,01% de H_3BO_3 , 15% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0, proporcionou maior percentual de grãos de pólen germinados. O corante TTC e o lugol, superestimou a viabilidade de pólen, já que todos os acessos apresentaram índice de viabilidade alto, quando comparado aos resultados obtidos *in vitro*.

Introdução

Diversas espécies de passifloras silvestres do Brasil possuem características importantes que podem ser introduzidas no maracujazeiro comercial, como por exemplo, a resistência a doenças e pragas, a autocompatibilidade e outras características morfológicas e aspectos fenológicos relacionados ao florescimento, com forte apelo ornamental. Neste último aspecto, o Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro (BAG-Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura contém diversas espécies silvestres com potencial ornamental dentre elas, *Passiflora suberosa*, *P. cincinnata*, *P. giberti*, *P. caerulea*, *P. morifolia*, *P. coccinia* e *P. setacea*.

Estas espécies apresentam flores com coloração variando de branca, rósea, lilás, azulada a vermelha. Devido à grande variabilidade existente nesse Banco de Germoplasma, recentemente foi iniciada ações de pesquisas voltadas para investigação da fertilidade polínica desses materiais para a realização de cruzamentos direcionados, orientando a escolha de genitores e o planejamento dos cruzamentos.

Informações sobre viabilidade e desenvolvimento de grãos de pólen das passifloras silvestres são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permitem obter maior sucesso nos cruzamentos controlados que tem como objetivo gerar novos híbridos com características de interesse agrônomo e ornamental. Assim, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar a viabilidade do pólen de seis espécies silvestres de maracujazeiro por meio de dois corantes (lugol e o 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio), bem como examinar a capacidade de emissão do tubo polínico para posterior utilização como genitor masculino em programas de hibridação.

Material e Métodos

Teste germinativo *in vitro* de pólen

Para selecionar o melhor meio de cultura para a germinação dos grãos de pólen de passifloras silvestres foram conduzidos dois experimentos, sendo o primeiro constituído por dois meios de cultura descrito como ideais para as espécies de Passifloras (Bruckner et al, 2000, Cruz et al. 2008) os quais foram utilizados como parâmetro para investigar a capacidade de emissão do tubo polínico.

Experimento 1

Meio M1: 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de KNO_3 , 0,01% de H_3BO_3 , 5% de sacarose e pH ajustado para 6,5;

Meio M2: 0,01% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de H_3BO_3 , 5% de sacarose, pH ajustado para 6,5.

¹Doutoranda em Fitotecnia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, CEP: 44380-000, E-mail: amelovidal@yahoo.com.br;

²Bolsista PNPB - Embrapa/UFRB, Cruz das Almas-BA, CEP: 44380-000, E-mail: talialeila@gmail.com

³Pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, C.P 007, E-mail: eder@cnpmf.embrapa.br; onildo@cnpmf.embrapa.br; fernanda@cnpmf.embrapa.br; janay@cnpmf.embrapa.br

⁴Estudante de Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Bahia, E-mail: thainatc@yahoo.com.br

Experimento 2

Meio M3: 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de KNO_3 , 0,01% de H_3BO_3 , 15% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0;

Meio M4: 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de KNO_3 , 0,01% de H_3BO_3 , 10% de sacarose, solidificado 10% de ágar e pH ajustado para 6,5;

Meio M5: 0,01% de KNO_3 , 0,01% de H_3BO_3 , 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30% de sacarose, solidificado 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,3;

Meio M6: 0,03% de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,02% de $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% de KNO_3 , 0,01% de H_3BO_3 , 5% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar pH ajustado para 6,5.

Como material vegetal foram utilizados grãos de pólen oriundos de anteras coletadas na antese (Figura 1a) de seis acessos da coleção de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura: *Passiflora giberti* N.E.Br (BGM 008); *P. setacea* D.C. (BGM 237); *P. morifolia* Mast. (BGM 107); *P. coccinea* Aubl (BGM 151); *P. cincinnata* Mast. (BGM 322) e *P. suberosa* L. (BGM 152). Os pólenes sem qualquer processo de desinfestação foram inoculados em placas de Petri contendo 30 mL dos meios de cultura descritos acima.

As placas foram mantidas em condições controladas de temperatura a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, até a realização da contagem dos grãos de pólen germinados 24 horas, após a inoculação em meio de cultura, respectivamente, mediante observação em um estereomicroscópio. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 6 x 6 (acessos x meios de cultura) totalizando 36 tratamentos com quatro repetições.

Teste colorimétrico

A viabilidade do pólen foi realizada mediante coloração com dois corantes, lugol a 2% e solução de TTC 1% para investigar o corante mais eficiente para estimar a viabilidade polínica do maracujazeiro.

Os grãos de pólen retirados de cinco anteras por genótipo foi distribuído sobre uma lâmina de vidro e em seguida colocou-se uma gota do corante específico e fechou-se o conjunto com uma lamínula. A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura, sendo contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com três repetições cada, perfazendo um total de 300 grãos de pólen para cada corante investigado, com auxílio de um microscópio óptico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 2 (genótipo x corantes) com três repetições cada. Os grãos de pólen corados com lugol assumem uma coloração amarronzada como viáveis e os que não apresentam essa coloração são inviáveis. Já os grãos de pólen corados com TTC, assumem uma coloração vermelha quando viáveis e ficam transparentes quando não viáveis.

Os dados de porcentagem foram transformados para $\arcsin(\sqrt{x/100})$ antes da análise estatística. Em seguida foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas pelo Programa SAS.

Resultados e Discussão

Analisando-se inicialmente os dados obtidos nos testes de germinação *in vitro* de pólen pode-se constatar que houve diferenças entre os acessos estudados em relação os meios de cultura analisados, ocorrendo também à interação entre esses dois fatores (Tabela 1).

A germinação *in vitro*, em meio de cultura, é uma técnica 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. Alguns autores consideram que o meio de cultura deve incluir, além de carboidratos, elementos estimulantes como ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio (Taylor e Hepler 1997).

Nesta pesquisa ficou comprovado que o meio M3, apresentou maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen dos acessos de maracujazeiro avaliados. O BGM 322 apresentou maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen quando o pólen foi cultivado nesse meio (Figura 1b). Por outro lado, os menores valores para esses caracteres foi verificado nos meios indicados na literatura para a germinação de pólen de maracujá (M2 e M6), além disso, observou-se que houve rompimento da exina de muitos polens quando cultivado nestes meios, o que pode ser consequência da ausência de ágar (Figura 1c).

Um fator de grande importância para a germinação *in vitro* é a consistência do meio de cultura. Os meios líquidos apresentam a desvantagem de ocorrer um desprendimento do tubo, dificultando a avaliação, além de provocar uma subestimativa da viabilidade dos gametas, pelo fato de grãos de pólen sem tubo polínico serem considerados não germinados. Por outro lado, altas concentrações de ágar podem servir como barreira

física, impedindo a germinação do tubo polínico (Almeida et al. 2002). Embora Bruckner et al. (2000) tenham utilizado com sucesso placas de Petri para incubar os grãos de pólen de *P. edulis* em meio isento de ágar, em *P. suberosa* foi necessário adaptar a metodologia, uma vez que os tubos polínicos se soltavam dos GP facilmente e dificultava a contagem dos grãos de pólen germinados (Cruz et al. 2008).

Tabela 1. Porcentagens de germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de passifloras silvestres.

Genótipos	Germinação <i>in vitro</i> de pólen (%)						Viabilidade (%)	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Lugol	TTC
BGM 008	0,58 aC	1,48 aC	13,30 bA	5,23 aBC	8,10 bAB	3,20 aBC	78,50 bA	60,15 bB
BGM 237	0,0 aA	0,0 aA	2,49 cA	0,0 aA	1,25 cA	0,53 aA	77,90bA	61,20 bB
BGM 107	0,0 aA	0,0 aA	2,58 cA	0,0 aA	0,23 cA	0,0 aA	92,63 aA	60,70 bB
BGM 151	0,0 aA	0,0 aA	1,45 cA	0,0 aA	0,0 cA	0,0 aA	88,86 aA	58,45 bB
BGM 322	0,0 aC	0,0 aC	61,00 aA	0,0 aC	16,35 aB	0,0 aC	92,82 aA	83,98 aB
BGM 152	0,0 aB	0,0 aB	18,6 bA	0,0aB	0,0 cB	0,0 aB	93,48 aA	81,87 aB
CV(%)	51,99						6,02	

Médias seguidas por letras iguais minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

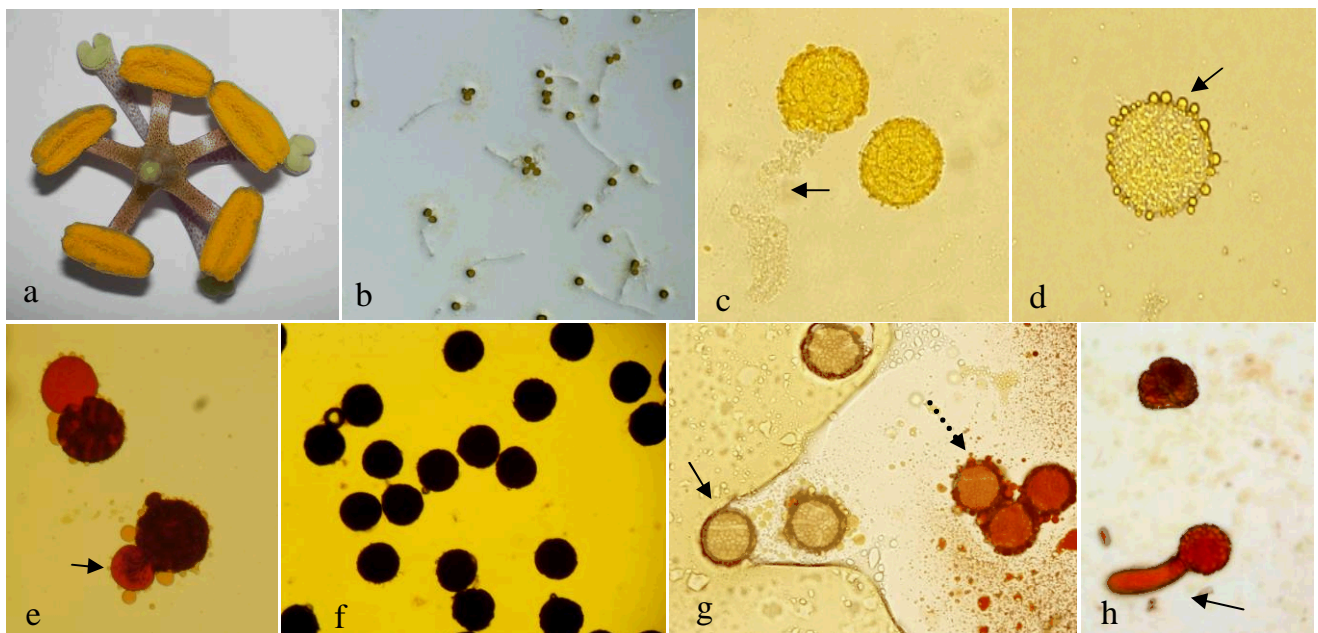


Figura 1. Fotomicrografias de grãos de pólen de Passifloras silvestres. a) Aspecto da antera do acesso BGM 322 (*P. cincinnata* Mast.); b) Alta percentagem de germinação dos grãos de pólen do acesso BGM 322 no meio M 3; c) Rompimento da exina do pólen no meio M1; d) Presença de *pollenkit* (seta); e) Pólen não germinado com liberação de exsudato; f) Aspecto do pólen corado com lugol; g) Grãos de pólen após coloração com TTC viáveis (seta pontilhada) e inviáveis (seta cheia); h) Grão de pólen germinado corado com TTC (seta).

Os grãos de pólen de *Passiflora* apresentam tipicamente grandes quantidades de substâncias lipofílicas junto à exina (Souza et al. 2004), na forma de grandes gotas (como se fosse um exsudato) ou de aspecto fibrilar entre as columelas livres do retículo, denominada *pollenkit* (Figura 1d-e) que dentre outras funções, atua como protetor minimizando a desidratação do pólen e conseqüente perda de viabilidade, adesão dos grãos ao estigma, atração de polinizadores pela coloração e volatilização de compostos, dentre outros.

Com relação ao teste colorimétrico, embora a diferença de viabilidade de pólen tenha sido perceptível entre os acessos de passifloras, as maiores amplitudes de variação realmente foram encontradas comparando-se os dois corantes (Tabela 1). A análise da viabilidade com o lugol indicou a presença de amido variando de 77,90% a 97,82% do acesso BGM 237 para o acesso BGM 322 que ficaram corados de marrom (Figura 1f). Já o teste com o corante TTC indicou a presença de enzimas desidrogenases ativas com amplitude de variação de 58,45% a 83,98% por meio da coloração vermelha dos grãos de pólen (Figura 1g – seta). Os grãos de pólen não corados apresentam tonalidade acinzentada (Figura 1e, seta). Diversos autores argumentam que o teste do TTC é uma estimativa confiável da viabilidade polínica, sendo próxima àquela fornecida pelos testes de germinação *in vitro* (Bolat and Pirlak 1999, Huang et al. 2004). Além disso, o TTC é muito utilizado por ser um método

relativamente rápido e simples. Segundo Souza et al. (2002) a viabilidade polínica é considerada alta para valores acima de 70%, esses percentuais não causariam danos em trabalhos de melhoramento da espécie.

Resultados de pesquisa mostram que a porcentagem de germinação e porcentagem de viabilidade do pólen estão em completa acórdância (Bolat and Pirlak 1999). Há observações de que o método do corante superestima a porcentagem de germinação do pólen, enquanto o teste *in vitro* a subestima (Galletta 1983). Para Scorza and Sherman (1995), as reações com corantes podem não se correlacionar bem com a germinação *in vitro* de pólen ou com a habilidade de efetuar fertilização. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam essa afirmativa. Por outro lado, trabalho de Munhoz et al. (2008), no qual, comparando cinco corantes, observaram que apenas o TTC (2,3,5 cloreto-trifeniltetrazólio) apresentou correlação positiva com a porcentagem de germinação de pólen de *Carica papaya*.

Neste estudo, ficou evidente a necessidade de ajustes no meio de cultura para desta forma proporcionar maiores índices de germinação de pólen *in vitro* das espécies de Passifloras estudadas e conseqüente identificação dos melhores genitores masculinos visando sua utilização no melhoramento genético.

Conclusões

Nas condições em que foi realizado o presente trabalho, o meio de cultivo M3 favoreceu o desenvolvimento do tubo polínico em os todos os acessos estudados.

O acesso BGM 322 pode ser utilizado como parental masculino em programas de melhoramento, já que apresenta os maiores índices de viabilidade de pólen.

Referências Bibliográficas

Almeida CCS, Amorim EP, Sereno MJCM e Barbosa Neto JF (2002) Efeito de desidratante e temperatura na estocagem de pólen de milho (*zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2002, Florianópolis. **Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo**: resumos. Sete Lagoas: ABMS/Embrapa Milho e Sorgo/Epagri, p. 480.

Bolat I e PIRLAK L (1999) An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits **Journal of Agriculture and Forestry** **23**: 383-388.

Bruckner CH, Silva MM, Falleiro TM, Andrade BB e Moreira AE (2000) Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Ceres** **47**: 523-531.

Cruz TV, Souza MM, Roza FA, Viana AJC, Belo GO e 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.

Galletta GJ Pollen e seed management (1983) In: Moore JN e Janick J (ed.) **Methods in fruits breeding, Indiana**: Purdue University press, p.23-47.

Huang Z, ZHU J, Mu X e Lin J (2004) Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany** **93**: 295-301.

Munhoz M, LUZ CFP, MEISSNER FILHO PE, BARTH OM e REINERT F (2008) Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica** **31**: 209-214.

Scorza R e Sherman WB (1995) Peaches. In: Janik J, Moore JN (ed.) **Fruit breeding** New York: John e Sons, p. 325-440.

Souza MM, Pereira TNS e Martins, ER (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia** **26**: 1209-1217.

Souza MM, Pereira TNS, Viana, AP, Silva LC e Sudré CP (2004) Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). **Beitrag zur Biologie der Pflanzen** **73**: 1-18.

Taylor LP e HEPLER PK (1997) Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **48**: 461-491.