

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE PÓLEN DE GUABIROBEIRA (*Campomanesia xanthocarpa* BERG)

Rodrigo Cezar Franzon¹
Maria do Carmo Bassols Raseira²
Américo Wagner Júnior³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar qual o meio de cultura e as condições que deveriam ser utilizadas em testes de germinação *in vitro* do pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), bem como verificar a possibilidade de armazenamento em freezer (-18°C). O pólen foi coletado de flores em estágio de balão e de flores logo após a antese. Os meios de cultura testados foram o padrão (testemunha) (10% de açúcar e 1% de ágar em água destilada) e este acrescido de duas concentrações de H₃BO₃ (0,65 mM e 1,3 mM). Foram testadas as temperaturas de incubação de 25 e 30°C. No geral, 3 horas a 25°C, em meio de cultura padrão, proporcionaram boas médias de germinação *in vitro*. O pólen coletado de flores logo após a antese apresentou maiores médias de germinação (55,8%) em relação ao coletado de flores em estágio de balão (27,6%). O boro não influenciou na germinação média do pólen, mas este apresentou perda quase total da viabilidade após 90 dias de armazenamento em freezer, caindo de 43,8% para 1,0%.

Palavras chave: Myrtaceae, viabilidade de pólen, armazenamento, meio de cultura, boro.

ABSTRACT

GERMINATION OF *Campomanesia xanthocarpa* BERG POLLEN *IN VITRO*

The objective of the present work was to determine the best media and conditions for the *in vitro* germination of guabirobeira pollen (*Campomanesia xanthocarpa* Berg). The possibility of storage in a freezer was also studied. The pollen was collected from flowers at the balloon stage or right after anthesis. The tested media included: standard (10% sucrose plus 1% agar dissolved in distilled water), the standard plus 0,65 mM of boric acid and the standard plus 1,3 mM of boric acid. Incubation temperatures of 25 and 30°C were tested in combination to the treatments. In general, good germination was achieved after 3 hours incubation at 25°C. Pollen grains collected from just opened flowers had a higher average germination percentage (55.8%) than those collected from flowers at the balloon stage (27.6%). Boron did not influence the average pollen germination rate. The guabirobeira pollen lost its viability after 90 days of storage in a freezer, decreasing from 43.8% to 1.0%.

Key words: Myrtaceae, pollen viability, storage, culture media, boron

¹ Engº Agrº, M.Sc., Aluno do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado, FAEM – Universidade Federal de Pelotas. Bolsista CAPES. E-mail: rcfranzon@hotmail.com

² Engº Agrº, Ph.D., Pesquisador Embrapa Clima Temperado – CFACT, Cx.P. 403, CEP: 96001-970, Pelotas, RS. Bolsista CNPq. E-mail: bassols@cfact.embrapa.br

³ Engº Agrº, Doutorando em Fitotecnia, UFV, Viçosa, MG. Bolsista CAPES.

INTRODUÇÃO

A guabirobeira, frutífera pertencente à família Myrtaceae, é nome comum de várias espécies, em diferentes locais do Brasil. Aquela que ocorre no sul do Brasil é *Campomanesia xanthocarpa* Berg, e o nome indígena é *wa'bi rob*, que significa fruto amargo (Donadio *et al.*, 2002).

Esta espécie, assim como outras frutíferas nativas do sul do Brasil, apresenta grande potencial para exploração econômica e pode constituir-se em nova alternativa, principalmente em nichos de mercado ávidos por novidades. Entretanto, trabalhos de melhoramento genético não são conhecidos tanto para guabirobeira como para a maioria das frutíferas nativas do Sul do Rio Grande do Sul.

Em um programa de melhoramento genético, um dos fatores importantes é o conhecimento da viabilidade do pólen a ser utilizado em hibridações. Há quatro métodos para se estimar a viabilidade de pólen (Galletta, 1983): a) testes de germinação *in vitro*, b) avaliação com o uso de corantes, c) testes de germinação *in vivo*, avaliando o crescimento do tubo polínico no estigma e/ou no pistilo, e d) a formação de sementes após polinização normal de um genitor feminino selecionado.

O uso de corantes é o método mais rápido, porém pode superestimar esta viabilidade, pois, muitas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ainda corar, por possuir quantidade suficiente de enzimas, amido, ou ainda outras substâncias. Já os dois últimos métodos são bastante trabalhosos, necessitando de maior tempo para se obterem os resultados (Galletta, 1983).

A germinação *in vitro* é o mais conveniente e seguro método usado para se testar a viabilidade de grãos de pólen, e revela o verdadeiro estado das reservas, a condição das membranas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar (Marcellán & Camadro, 1996). Este é, também, o método mais utilizado nos programas de melhoramento genético.

A germinação *in vitro* de pólen é influenciada por diferentes fatores, dentre eles a espécie, o meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, o estágio de desenvolvimento da flor quando da coleta do pólen, além das condições de armazenamento (Stanley & Linskens, 1974).

O meio padrão usado nos testes de germinação *in vitro* de pólen é constituído de açúcar e de ácido bórico

(Miranda & Clement, 1990), podendo variar ainda a combinação de outros nutrientes (Galletta, 1983). A adição de açúcar ao meio de cultura tem por objetivo o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, bem como fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974). Já a presença de boro no meio estimula o crescimento do tubo polínico, sendo a resposta variável de acordo com a espécie. O boro interage com o açúcar formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (Pfahler, 1967).

A Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS, iniciou, há alguns anos, pesquisas visando fornecer subsídios à implantação de futuro programa de melhoramento genético de espécies frutíferas nativas do sul do Brasil, para o seu aproveitamento em cultivos comerciais. Entretanto, para a maioria destas espécies, não há informações sobre condições ideais para se testar a viabilidade de pólen através da germinação *in vitro*.

Para espécies frutíferas da família Myrtaceae nativas do sul do Brasil, como a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg), há poucos trabalhos sobre germinação *in vitro* de pólen. Em pesquisa de literatura, apenas alguns estudos com algumas espécies do gênero *Psidium* foram encontrados (Hirano & Nakasone, 1969; Teatota *et al.*, 1970; Raseira & Raseira, 1996).

Os objetivos deste trabalho foram verificar o meio de cultura e condições que deveriam ser utilizados em testes de viabilidade do pólen de guabirobeira, através da germinação *in vitro*, bem como verificar a possibilidade de armazenamento em freezer.

MATERIAL E MÉTODOS

O pólen foi coletado de flores em estágio de balão e de flores logo após a antese em plantas do Banco Ativo de Germoplasma de fruteiras nativas da Embrapa Clima Temperado, no município de Pelotas, RS.

As anteras foram destacadas e colocadas para secar em bandejas de papel na temperatura ambiente (20 a 25°C), por dois a três dias, até que todas elas estivessem deiscentes. Após os testes iniciais, o pólen foi armazenado em frascos de vidro, mantidos em dessecador, com sílica como substância higroscópica, em freezer, à temperatura de -18 a -15°C e baixa umidade relativa do ar.

Foram testados os seguintes meios de cultura para germinação *in vitro* de pólen:

Meio 1 = 10% de açúcar* + 1% de ágar** (meio de cultura padrão)

Meio 2 = 10% de açúcar + 1% de ágar + 0,65 mM de ácido bórico (H_3BO_3 ***)

Meio 3 = 10% de açúcar + 1% de ágar + 1,3 mM de ácido bórico (H_3BO_3)

* Açúcar cristal

** Merk nº 1.01615.1000

*** Vetec

Foi adotado como meio de cultura padrão aquele utilizado em testes de rotina no Laboratório de Melhoramento Genético de Frutíferas da Embrapa Clima Temperado.

Os elementos constituintes dos meios de cultura foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em forno de microondas até a completa dissolução do ágar. O meio de cultura foi distribuído em lâminas preparadas para este fim (lâminas para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC de 21mm de diâmetro e 3mm de altura), em substituição às lâminas escavadas. Na avaliação dos resultados, cada anel de PVC, em cada uma das lâminas, representou uma repetição.

O pólen foi aspergido sobre o meio, e as lâminas foram então colocadas em câmara úmida simulada (placas de Petri ($\varnothing = 8,5$ cm)) com papel absorvente, umedecido com água destilada e levadas para incubação em estufa tipo BOD com temperatura controlada (25 ou 30°C). Após três horas de incubação, foi realizada a contagem da porcentagem de grãos de pólen germinados, sob microscópio óptico binocular (Carl Zeiss, Modelo Standart 044 BR C), considerando-se germinados aqueles que apresentavam o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. Foi contado um total de 100 grãos de pólen por repetição.

O delineamento estatístico foi completamente casualizado, em arranjo fatorial, com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Para análise, os dados foram transformados em *arco seno* ($\sqrt{x/100}$).

Todas as análises estatísticas foram efetuadas pelo programa SANEST – Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (Zonta & Machado, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre os fatores origem do pólen e temperatura de incubação. A germinação *in vitro* média de pólen de guabirobeira coletado de flores em estádio de balão diminuiu com o aumento de temperatura, o que não ocorreu com aquele coletado de flores após a antese (Tabela 1). Observa-se também que, em ambas as temperaturas de incubação (25 e 30°C), a germinação média foi maior para o pólen coletado de flores após antese.

Tabela 1 – Porcentagem (%) média de germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira, coletado de flores em dois estádios de desenvolvimento, após três horas em diferentes temperaturas de incubação

Temperatura de incubação (°C)	Origem do pólen ¹	
	Flor em estádio de balão	Flor após antese
25	33,4 a B	54,6 a A
30	22,2 b B	57,0 a A

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Duncan de comparação de médias ($p=0,05$).

Os diferentes meios de cultura testados não influenciaram a germinação média de pólen de guabirobeira, sendo esta de 42,0%, 42,5% e 39,5%, nos meios 1, 2 e 3, respectivamente.

Após três horas de incubação, verificou-se que o comprimento dos tubos polínicos era pelo menos 25 vezes maior do que o diâmetro do grão de pólen, bem como uma razoável porcentagem média de germinação (40,0%). Em testes de germinação *in vitro* de pólen, considera-se germinado aquele que apresentar o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. Desta forma, o período de três horas de incubação foi suficiente para estimar com boa precisão a viabilidade do pólen de guabirobeira através da germinação *in vitro*.

Na literatura, não são encontradas referências sobre testes de germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que o tempo de incubação necessário para iniciar a germinação *in vitro* varia de acordo com a espécie, e até mesmo entre cultivares da mesma espécie.

Para o araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), outra mirtácea frutífera nativa do sul do Brasil, há

diferenças no que se refere à condição ideal para avaliar a germinação *in vitro* de pólen. Verificou-se que houve períodos de incubação de 4 a 6 horas a 25°C (Raseira & Raseira, 1996), bem como relato de que o tubo polínico desta mesma espécie apareceu 13 horas após a inoculação no meio de cultura (Teatota *et al.*, 1970). Um período mais prolongado também foi utilizado por Hirano e Nakasone (1969), que avaliaram a germinação do pólen de diferentes espécies do gênero *Psidium*, aproximadamente 12 horas após a inoculação no meio.

Foram observadas, neste estudo, pequenas diferenças na germinação de pólen de guabirobeira nas diferentes temperaturas de incubação testadas. O pólen coletado de flores em estádio de balão apresentou menores médias a 30°C do que a 25°C, o que não aconteceu com o pólen coletado de flores logo após a antese. Embora essa diferença seja estatisticamente significativa, ela é pequena. As melhores médias foram obtidas com incubação a 25°C.

Temperaturas de incubação em torno de 25°C são citadas na literatura para uma grande quantidade de espécies. Para pólen de ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira, 24°C é a temperatura apropriada (Thompson & Batjer, 1950). Para noqueira inglesa, 27°C é o ideal (Hall & Farmer, 1971) e, para germinação de pólen de abacateiro, 25°C (Loupassaki *et al.*, 1997). Pelos resultados obtidos neste presente trabalho, a temperatura de 25°C é apropriada para testes de germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira.

Nos testes após 90 dias de armazenamento, houve interação significativa entre os fatores origem do pólen e período de armazenamento. Antes do armazenamento, a germinação foi maior para o pólen coletado de flores logo após a antese, conforme discutido anteriormente. No entanto, após o armazenamento observou-se grande perda de viabilidade do pólen, tanto aquele coletado de flores em estádio de balão quanto aquele coletado de flores logo após a antese, não havendo diferença estatística significativa entre estes (Tabela 2). A germinação média caiu de 43,8% para 1,0%.

A adição de boro ao meio de cultura não influenciou novamente na germinação média, que foi de 15,2%, 17,1% e 15,9%, para os meios 1, 2 e 3, respectivamente. Isso demonstra que este elemento não é um fator limitante

Tabela 2 – Percentagem (%) média de germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira, coletado de flores em dois estádios de desenvolvimento, a zero e 90 dias de armazenamento

Período de armazenamento (dias)	Origem do pólen ¹	
	Flor em estádio de balão	Flor após antese
00	33,4 a B ²	54,6 a A
90	0,6 b A	1,5 b A

¹ Médias de germinação obtidas após 03 horas de incubação a 25°C.

² Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Duncan de comparação de médias (p=0,05).

para testes de germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira. Entretanto, sabe-se que, para algumas espécies, pequenas quantidades de boro adicionado ao meio de cultura melhoram a germinação e o crescimento do tubo polínico e diminuem a probabilidade destes estourarem (Luza & Polito, 1985), sendo a resposta variável entre espécies. O boro, no meio de cultura, interage com o açúcar formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares do grão de pólen (Pfahler, 1967).

A maturação do pólen é um dos estádios de desenvolvimento no ciclo de vida das plantas. A germinação do pólen não ocorre dentro da antera, mas este deve estar pronto para germinar logo após a sua deiscência (Lin & Dickinson, 1984), desde que encontre condições favoráveis. Em programas de melhoramento genético é fundamental coletar o pólen em estádio adequado de maturação, para que ele mantenha a viabilidade e a capacidade de germinar quando for realizada a hibridação.

Visando verificar o melhor momento para a coleta do pólen, foi testada a germinação de pólen coletado de flores em estádio de balão e logo após a antese. A germinação média foi maior para pólen coletado de flores após a antese (55,8%), em relação ao coletado de flores em estádio de balão (27,6%). Diferenças ainda maiores do que as aqui encontradas foram obtidas em noqueira inglesa (Luza & Polito, 1985). Pólen coletado de flores um a dois dias antes da antese apresentou 0,6% de germinação contra 45,2% do pólen originário de flores após a antese.

Embora o pólen coletado de flores logo após a antese tenha apresentado maiores médias de germinação, devem-se tomar alguns cuidados durante a sua coleta. Deve-se ter a garantia de que o pólen a

ser utilizado em hibridações seja puro, sem contaminação por outras fontes.

Em casos de viabilidade baixa de pólen coletado de flores em estágio de balão, sendo necessária a coleta de pólen de flores após a antese, alguns procedimentos podem ser tomados. Uma alternativa é ensacar as flores ainda em estágio de balão, na planta, utilizando sacos de papel encerado, para evitar que, em caso de chuva, estes se desmanchem. Outra alternativa é coletar ramos com flores em estágio de balão e levá-los para uma sala ou laboratório, ou qualquer lugar abrigado de ventos e insetos, mantendo-os em frascos com água para evitar a desidratação e permitir que as flores abram normalmente, procedendo-se então à coleta do pólen logo após a antese.

O pólen de guabirobeira apresentou grande perda de viabilidade após 90 dias de armazenamento em freezer. Em programas de melhoramento genético, o armazenamento de pólen é de extrema importância, pois é necessário que este mantenha viabilidade até o momento em que será utilizado em hibridações. A manutenção da capacidade de germinação do pólen depende, além das características intrínsecas da espécie, das condições de armazenamento.

A germinação de pólen de diversas cultivares de ameixeira manteve-se por mais de três anos quando armazenado a -20°C , entretanto, a -1°C , a viabilidade reduziu-se drasticamente aos 11 meses de armazenamento (Lee *et al.*, 1981).

REFERÊNCIAS

- Donadio LC, Mório FV & Servidone AA (2002) Frutas Brasileiras. Jaboticabal, Ed. Novos Talentos. 288p.
- Galletta GJ (1983) Pollen and seed management. In: Moore JN & Janick J (Eds.) Methods in Fruit Breeding. Indiana, Purdue University Press. p. 23-47.
- Hall GC & Farmer JR RE (1971) *In vitro* germination of black walnut pollen. Canadian Journal of Botany 49:799-802.
- Hirano RT & Nakasone HY (1969) Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. Journal of the American Society for Horticultural Science 94:83-86.
- Lee CL, Bünemann G & Hermann S (1981) Long-term storage of plum pollen. Gartenbauwissenschaft 46:69-72.

Em nogueira inglesa, resultados completamente diferentes foram observados (Luza & Polito, 1985). O pólen apresentou grande perda de viabilidade com três meses de armazenamento a -20°C . Estes autores relatam que a perda de viabilidade está associada também com a diminuição de vigor do pólen, que ficou evidenciada pelo pequeno comprimento do tubo polínico emitido *in vitro*.

O pólen de duas populações de araçazeiro (*Psidium cattleianum*), pertencente à mesma família da guabirobeira, apresentou considerável perda de viabilidade após apenas 21 dias de armazenamento nas mesmas condições aqui testadas (Raseira & Raseira, 1996).

Os testes de germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira devem continuar, principalmente no que diz respeito às condições de armazenamento, pois é necessário que o pólen se mantenha viável por períodos maiores do que aqueles aqui testados.

CONCLUSÕES

A viabilidade do pólen de guabirobeira pode ser avaliada por germinação *in vitro* em meio de cultura padrão (10% de açúcar + 1% de ágar, dissolvidos em água destilada), três horas após a inoculação, e incubação a 25°C .

O pólen de guabirobeira não manteve sua viabilidade após 90 dias de armazenamento em freezer, à temperatura de -18 a -15°C e baixa umidade relativa do ar, mantidas em dessecador com sílica como substância higroscópica.

- Lin JJ & Dickinson DB (1984) Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination. Plant Physiology 74:746-748.
- Loupassaki M, Vasilakakis M & Androulakis I (1997) Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains. Euphytica 94:247-251.
- Luza JG & Polito VS (1985) *In vitro* germination and storage of english walnut pollen. Scientia Horticulturae 27:303-316.
- Marcellán ON & Camadro EL (1996) The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. Scientia Horticulturae 67:101-104.
- Miranda PA & Clement CR (1990) Germination and storage of pejobaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. Revista de Biologia Tropical 38:29-33.

- Pfahler PL (1967) *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium e boron effects. Canadian Journal of Botany 45:839-845.
- Raseira MdoCB & Raseira A (1996) Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum*. Pelotas, EMBRAPA/CPACT. 95p.
- Stanley RG & Linskens HF (1974) Pollen biochemistry management. Heidelberg, Berlin. 307p.
- Teaotia SS, Phogot KPS & Srisvatava VS (1970) Blossom biology studies in *Psidium* species. Progressive Horticulture 2:101-112.
- Thompson AH & Batjer LP (1950) The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. Proceedings of American Society for Horticultural Science 56:227-230.
- Zonta EP & Machado AA (1984) SANEST – Sistema de Análise Estatística para microcomputadores. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. 75p.