

Viabilidade e Longevidade dos Grãos de Pólen de

Camellia sasanqua, Thunb. (*)

JUREMA S. AROEIRA (**)

INTRODUÇÃO

O conhecimento a respeito da germinação dos grãos de pólen, assim como de sua vitalidade, constitui, não raro, problema de particular interesse, do ponto de vista da polinização artificial.

Da mesma forma, o estudo dos fatores que possam contribuir para o prolongamento dessa vitalidade é considerado de grande importância para os trabalhos relacionados com a hibridação de variedades, cujo florescimento se verifica em épocas diferentes.

Isso ocorre, presentemente, com relação ao melhoramento da Camélia, planta ornamental tradicionalmente cultivada no sul dos Estados Unidos e, notadamente, na Flórida. Das espécies existentes neste Estado, a *Camellia sasanqua*, Thunb., é a mais recente. Devido à alta qualidade ornamental de suas flôres, assim como à época do seu florescimento, intensifica-se o seu cultivo e cresce o interesse quanto à produção de novas variedades. Evidencia-se, desse fato, a necessidade e importância do estudo dos problemas de polinização, relacionados com esta planta.

A germinação dos grãos de pólen, sob condições ambientes favoráveis, geralmente ocorre poucos minutos depois de haverem eles entrado em contato com a superfície do estigma. Os da maioria das plantas podem germinar não apenas sobre o estigma mas, também, em meios de cultura artificiais, especialmente soluções de sacarose.

Segundo Maximow (1938), poucas são as plantas cujo pólen tem a propriedade de germinar em água pura. A razão é que, em virtude da alta pressão osmótica que dentro dele se desenvolve, suas membranas se rompem e ele morre.

(*) Trabalho de pesquisa feito, em 1947, no Departamento de Horticultura da Universidade da Flórida, Estados Unidos.

(**) Eng^o. Ag^o. M. S., Chefe do Departamento de Horticultura da ESA.

O desenvolvimento do tubo polínico tem por finalidade transportar o gameta masculino, do estigma ao interior do saco embrionário. Da quantidade de substâncias nitrogenadas, e outras existentes no grão de pólen é que depende, principalmente, o tamanho do tubo polínico. Admite-se, ainda, sejam por este utilizadas substâncias nutritivas provenientes do estilete. O estímulo de hormônios, assim como a ação de enzimas produzidas pelo próprio tubo polínico, são outros fatores considerados responsáveis pelo seu desenvolvimento.

Inúmeros trabalhos levados a efeito neste campo de estudo (Brink 1924, Blair and Loomis 1941 e Sartoris 1942), revelaram serem os grãos de pólen, da maioria das plantas, capazes de germinar em meios artificiais. Comumente estes são constituídos por soluções de sacarose cuja concentração, conforme a espécie do pólen, varia de 5 a 25%, ou da mistura ágar-sacarose (ágar a 0,5 — 1,5%).

Diversos pesquisadores e entre eles Addicott (1943) constataram a influência de vários extratos e compostos químicos, sobre a capacidade germinativa dos grãos de pólen, assim como sobre a taxa de crescimento dos tubos polínicos.

De acordo com Maximow (1938), sendo o pólen um gametófito masculino em estado de repouso, possui a capacidade de preservar, por certo período, o seu poder germinativo. A duração desse período de vitalidade é um característico específico da planta podendo, no entanto, ser alterada, de acordo com as condições de conservação a que o pólen for submetido. Segundo Holman and Brubaker (1926) essa longevidade varia conforme a espécie da planta, desde horas até meses.

Tem sido possível conservar-se o poder germinativo dos grãos de pólen de inúmeras espécies, por períodos maiores que o normal, mediante a sua conservação em câmaras frias e secas. Contudo, os de algumas plantas, especialmente cereais, representam um tipo fisiológico diferente dos mencionados acima. Possuem membranas extremamente permeáveis à água, de modo que, quando submetidos a condições de ar seco, dessecam rapidamente e morrem. Mesmo se conservado em ambiente úmido, este tipo de pólen tem mostrado possuir um período de vitalidade muito curto. É o que acontece, por exemplo, com o do milho. Em consequência, tanto a conservação, quanto a germinação em condições artificiais, têm constituído problema de difícil solução. De outro lado, sob condições favoráveis de temperatura e umidade, pólen de inúmeras plantas tem sido conservado por diversos meses e mesmo anos.

Segundo Nebel (1939), pólen de plantas frutíferas de clima temperado, por exemplo, pode ser conservado por longos períodos, à temperatura de 2 a 8° C e 50% de umidade relativa. Sob tais condições de conservação, tem sido possível, ainda, preservar-se a vitalidade dos grãos de pólen da macieira por mais de quatro anos. O mesmo autor observou ser o pólen da pereira capaz de produzir sementes viáveis, após 3 anos de conservação.

Com relação a outras espécies de plantas, conforme relatado por Pfeiffer (1936), pólenes de Lírio e *Amaryllis* têm sido conservados a 10° C e 35 a 65% de umidade relativa, por períodos de 7 e 5 meses, respectivamente.

Como estudo preliminar sobre pólen de *Camellia sasanqua*, *Thunb.*, os seguintes experimentos foram levados a efeito, tendo por objetivo determinar:

1. O meio de cultura padrão
2. A viabilidade e longevidade dos grãos de pólen
3. A capacidade de conservação do meio padrão.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Meio de cultura padrão

Para este experimento foram usadas as seguintes séries de tratamentos:

- A. — Solução de sacarose a 5,0-7,5-10,0-15,0 e 20,0%
- B. — Ágar a 0,3 e 0,5%+sacarose a 5,0-10,0-15,0 e 20,0%
- C. — Ágar a 0,3%+sacarose a 5,0 e 10,0%+fermento.

De modo a se obter u'a média, cada teste de germinação foi repetido 3 ou 4 vezes, tendo ainda, para cada um deles, sido usadas 2 amostras do meio de cultura em estudo. Considerou-se como amostra, 1 gota do meio colocada sobre uma laminula. Como proteção contra perda de umidade, tendo a amostra na sua parte inferior, foram as laminulas colocadas sobre uma câmara de Van Tieghem, montada sobre uma lâmina microscópica, ambas previamente esterilizadas. A colocação, antes, de algumas gotas de água na parte inferior da câmara, já montada, permitiu a improvização de um ambiente úmido.

A adição de fermento (Série C) foi feita de acordo com a técnica preconizada por Brink (1924): "Agitar um tablete

de fermento Fleishmann em 100 ml de água e ferver durante dois minutos, para esterilizar. Empregar duas gotas para cada 25 ml do substrato ágar-sacarose. Para cada novo teste de germinação foram usados meios de cultura recém-preparados. As culturas foram conservadas em temperatura ambiente (22-25°C), sendo os resultados da germinação dos grãos de pólen observados, ao microscópio, 24 horas após.

No início dos experimentos, empregou-se pólen de flôres destacadas da planta e conservadas, durante dois dias, em meio úmido, a fim de se evitar dessecação. Com o intuito de conseguir material mais uniforme, posteriormente passou-se a empregar somente pólen fresco, proveniente de flôres completamente abertas.

Visando-se a conseguir uma base de comparação quanto à germinação dos grãos de pólen e desenvolvimento dos tubos polínicos, adotaram-se, na falta de outros, os critérios abaixo que, apesar de arbitrários, acredita o autor tenham contribuído para se obterem melhores conclusões. No critério de pontos referente à germinação, os números 0 e 10 representam os limites de variação da escala adotada.

a. *Germinação*

0 — Ausência de germinação

10 — Muito boa.

b. *Desenvolvimento do tubo polínico*

Regular — Entre 10 a 40 vezes o tamanho do grão de pólen.

Bom — Entre 40 a 70 vezes o tamanho do grão de pólen.

Muito bom — Entre 70 a 100 vezes o tamanho do grão de pólen.

Visto o meio de cultura ágar 0,3% + sacarose 5% + fermento ter sido o que melhores resultados apresentou, foi considerado "padrão" e, como tal, empregado em todos os experimentos subsequentes.

2. *Viabilidade e longevidade dos grãos de pólen.*

Para este experimento utilizou-se o mesmo material e métodos descritos para o caso anterior, exceção feita para o meio de cultura, visto ter sido utilizado apenas o considerado padrão.

A viabilidade e longevidade dos grãos de pólen foram

investigadas utilizando-se flôres que apresentavam as seguintes condições:

A — *Flor não destacada da planta:*

1. Fechada
2. Semi-aberta
3. Recém-aberta
4. 24, 48 e 72 horas após a abertura

B — *Flor aberta e destacada da planta:*

1. Conservada em temperatura de laboratório durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas.
2. Conservada à temperatura exterior durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

3. *Capacidade de conservação do meio padrão.*

Para este experimento o meio de cultura padrão foi o único utilizado. Para cada teste foram empregados 5 ml do mesmo, colocados em tubos de ensaio e devidamente protegidos de contaminação por um chumaço de algodão. Em seguida, foram esterilizados, em autoclave a 121° C, durante 40 minutos. Os tubos de ensaio foram conservados em luz difusa, sendo o meio de cultura protegido da perda de umidade mediante uma rólha colocada acima do chumaço de algodão. Pólen fresco, proveniente de flôres completamente abertas foi o utilizado para este experimento. Os tratamentos foram os seguintes:

- A. Meio de cultura não conservado (testemunha)
- B. Meio de cultura conservado por 2, 4, 8 e 16 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Brink (1924), o meio semi-sólido tendo ágar como base pode ser considerado como o mais apropriado para a germinação dos grãos de pólen. O mesmo autor faz referência a diversos casos em que o melhor desenvolvimento do tubo polínico foi assegurado, adicionando-se ao meio ágar, 1 a 15% de sacarose.

Brink informa ainda ter havido sensível aumento na germinação de grãos de pólen no meio ágar-sacarose, sempre que a êle se adicionava extrato de fermento. Com referência à resistência deste ao calor, foi por êle observado não haver qualquer diminuição da sua capacidade promotora de crescimento, mesmo quando submetido à ebulição durante 15 minutos. A esterilização em autoclave a 120° C, durante

45 minutos, resultou na diminuição de sua ação. As propriedades originais, todavia, permaneceram intatas.

Jost (1907), trabalhando com pólen de "*Hypp eastrum auliculum*" conseguiu tubos polínicos com 17 a 20 m. m. de comprimento em cultura de ágar contendo 1% de sacarose. Também Wolfe (1944) obteve bons resultados empregando ágar 0,3% + 10,0% sacarose + fermento, na germinação de pólen de *Caméllia Sasanqua*.

Nos experimentos por ele levados a efeito, pôde o autor verificar que o pólen de *Caméllia Sasanqua* germina regularmente em meio de sacarose, desde 5 até 15%, porém os resultados foram muito melhores no meio ágar-sacarose. (Quadros I e II). Observou-se, ainda, que a adição de fermento a este substrato exerce, sobre a germinação deste tipo de pólen efeito estimulante acentuado. Maior germinação observou-se, tôdas as vêzes que este procedimento foi adotado. (Quadro III).

Relativamente à condição das flôres, verificou-se possuírem curta duração, decorrendo da abertura à queda apenas 3 dias. Já do início ao término da abertura decorrem exatamente 24 horas. Em qualquer dessas 2 últimas fases, elas se apresentavam com grande quantidade de pólen viável. (Quadro IV).

Flôres destacadas da planta e protegidas contra a perda de umidade puderam ser conservadas, por curto período, tanto em condições de temperatura de laboratório quanto externa. Grande quantidade de grãos de pólen viáveis pôde, desse modo, ser assegurada, dentro de um período de 48 horas. Após 72 horas, no entanto, deixaram de germinar. Esse fato parece indicar que, sob condições ordinárias de conservação, os grãos de pólen de *Caméllia Sasanqua* conservam sua vitalidade por 48 horas (Quadro V).

Procurou-se, ainda, determinar a capacidade de conservação do meio-padrão, sem perda de suas propriedades. Isso representa grande vantagem por evitar perda de tempo no preparo de novos meios de cultura para cada teste. Os resultados conseguidos esterilizando-se os meios de cultura em autoclave a 121° C. parecem indicar que o calor, pelo menos nas condições aqui mencionadas, não afeta as propriedades do fermento.

Foi no meio de cultura conservado durante 4 dias que se registraram os maiores índices de germinação. Esta decresceu, sensivelmente, aos 8 dias de conservação e, aos 16, tornou-se extremamente baixa (Quadro VI).

Todavia, as observações concernentes a estes dois últimos testes não devem ser consideradas como definitivas,

visto que, graças à escassez de material, para eles foram utilizados grãos de pólen sobre cuja vitalidade pairavam dúvidas.

QUADRO I — *Germinação de Pólen em Diferentes Meios de Cultura*

Série A

MEIO DE CULTURA :	Repetições				Desenvolvimento do tubo polínico
	1ª	2ª	3ª	4ª	
Sacarose 5,0%	4	0	2	2	Regular
Sacarose 7,5%	6	0	0	2	Regular
Sacarose 10,0%	2	2	0	2	Regular
Sacarose 15,0%	6	2	0	2	Regular
Sacarose 20,0%	2	0	0	2	Regular

« — Valores convencionais

0 — Ausência de germinação

10 — Muito boa

QUADRO II — *Germinação de Pólen em Diferentes Meios de Cultura*

Série B

MEIO DE CULTURA :	Repetições				Desenvolvimento do tubo polínico
	1ª	2ª	3ª	4ª	
Ágar 0,3% + sacarose 5,0%	0	10	8	6	Muito bom
Ágar 0,3% + sacarose 10,0%	0	10	8	8	Muito bom
Ágar 0,3% + sacarose 15,0%	0	10	6	8	Muito bom
Ágar 0,3% + sacarose 20,0%	2	0	6	6	Muito bom
Ágar 0,5% + sacarose 5,0%	8	4	2	4	Bom
Ágar 0,5% + sacarose 10,0%	6	2	4	2	Bom
Ágar 0,5% + sacarose 15,0%	2	2	0	2	Regular
Ágar 0,5% + sacarose 20,0%	2	0	2	0	Regular

QUADRO III — *Germinação de Pólen em Diferentes Meios de Cultura* — SÉRIE C

MEIO DE CULTURA :	Repetições			Desenvolvimento do tubo polínico
	1ª	2ª	3ª	
Ágar 0,5% + sacarose 5,0% + fermento	10	10	10	Muito bom
Ágar 0,5% + sacarose 5,0% "	6	8	8	Muito bom
Ágar 0,3% + sacarose 10,0% + fermento	10	6	8	Muito bom
Ágar 0,3% + sacarose 10,0% "	8	4	6	Muito bom

« Testemunhas.

QUADRO IV — *Vitalidade e Longevidade dos grãos de Pólen*
(Flôres não destacadas da planta)

Estado da flôr	Condição da antera:	Germinação média	Desenvolvimento do tubo polínico
Fechada	Turgidas. Coloração branca-amarelada. Pequena quantidade de pólen.	0,6	Regular
Semi-aberta	Túrgidas. Coloração branco-amarelada. Regular quantidade de pólen.	8	Muito bom
Recém-aberta	Sem turgescência. Coloração amarela escura. Grande quantidade de pólen.	10	Muito bom
24 horas após abertura	Parcialmente murchas. Coloração amarelo-escuro. Grande quantidade de pólen.	10	Muito bom
48 horas após abertura	Murchas. Coloração amarelo-escuro. Pequena quantidade de pólen.	8	Bom
72 horas após abertura	Caídas	—	—

QUADRO V — Vitalidade e Longevidade dos Grãos de Pólen
(Flôres destacadas da planta)

Temperatura interna (Laboratório)			
Nº de horas conservadas	Condição da flôr:	Germinação média	Desenvolvimento do tubo polínico
0	Aberta. Grande quantidade de pólen	10	Muito bom
24	Parcialmente murcha	10	Bom
48	Completamente murcha	7	Bom
72	Estames completamente murchos	0	—
TEMPERATURA EXTERNA			
0	Aberta. Grande quantidade de pólen	10	Muito bom
24	Parcialmente murcha	9	Muito bom
48	Parcialmente murcha	7	Bom
72	Completamente murcha	0	—

QUADRO VI — Capacidade de Conservação do Meio Padrão

Nº de dias conservados	Germinação média	Desenvolvimento do tubo polínico
0	10	Muito bom
2	10	Muito bom
4	10	Muito bom
8	4	Regular
16	1	Regular

CONCLUSÕES

1. Verificou-se a possibilidade da germinação e desenvolvimento dos tubos polínicos de grão de pólen de *Camellia sasanqua*, em soluções de sacarose a 5 e 10%.

2. Os resultados obtidos revelaram que o meio de cultura semi-sólido, constituído de ágar a 0,3% + sacarose a 5 ou 10% pode ser considerado eficiente para a germinação desse tipo de pólen.

3. A adição de fermento ao substrato mencionado no item 2 demonstrou sensível efeito estimulante sobre a referida germinação.

4. O meio de cultura ágar 0,3% + sacarose 5% + fermento foi, pelos resultados por ele apresentados, considerado padrão.

5. A esterilização do meio de cultura padrão, em autoclave a 121° C., durante 40 minutos, não afetou a sua capacidade promotora de crescimento.

6. Protegido de contaminação e perda de umidade, pôde o referido meio de cultura ser conservado em temperatura ambiente e luz difusa, sem perda de suas propriedades, durante 4 dias. Com 8 dias, sua capacidade de conservação parecia já em pleno declínio.

7. Verificou-se que a vitalidade máxima dos grãos de pólen de *Camellia sasanqua* corresponde à fase de abertura da flôr, assim se conservando durante 24 horas.

8. Flôres destacadas da planta e devidamente protegidas da perda de umidade conservaram a vitalidade dos seus grãos de pólen durante 48 horas, tanto em condições de laboratório quanto de temperatura externa.

9. Os resultados obtidos com flôres, tanto as destacadas da planta, quanto as não destacadas, parecem indicar ser a longevidade dos grãos de pólen de *Camellia sasanqua* inferior a 72 horas, a partir da abertura das flôres.

SUMMARY

As a preliminary study on pollen of *Camellia sasanqua*, Thunb., several experiments were carried out to determine:

1. The best artificial culture medium
2. The viability and longevity of pollen grains
3. The storage capacity of the "Standard Medium"

As an artificial medium for pollen germination were used the following series:

Sucrose solution varying from 5.0 to 20.0%

Agar at 0.3 and 0.5% + sucrose from 5.0 to 20.0

Agar at 0.3% + sucrose at 5.0 and 10.0% + yeast

The viability and longevity of pollen grains were tested under the following conditions:

Flower detached from the plant at different stages of development.

Flower opened, detached from the plant, and kept at room and outside temperatures.

The addition of yeast to the standard medium was made according to the Brink's procedure. After protected against contamination and loss of moisture it was autoclaved for 40 minutes at 121° C. and kept in diffused light. The conclusions to be drawn from the above data are:

1. Agar at 0.3% + sucrose at 5.0 or 10.0% may be considered as good artificial culture medium for germination of *Camellia sasanqua* pollen grains (Tables I and II).

2. The addition of yeast to agar-sucrose substrate showed a stimulative effect on the germination of pollen grains.

3. Standard medium (agar 0.3% + sucrose 5.0% + yeast) showed to be the best one for germination and development of pollen tubes (Table III).

4. The growth-promoting power of the yeast was not affected by autoclaving the standard medium for 40 minutes at 121° C.

5. The best time to secure great amount of viable pollen is from the anthesis up to 24 hours later (Table IV).

6. When protected against the loss of moisture, detached flowers can be kept either in room or outside temperatures and will furnish viable pollen during 48 hours (Plate V)

7. Standard medium maintains entirely its properties when stored during 4 days. The question of what will be its storage capacity beyond this period requires further investigation (Table VI).

BIBLIOGRAPHY

Addicott F. T.

- 1943 Pollen germination and pollen tube growth, as influenced by pure growth substances. *Plant Physiol.* 18 : 270-279.

Brink, R. A.

- 1924 The physiology of pollen. *Amer. Jour. Bot.* 11 : 218-228.

Blair, R. A. and W. E. Loomis

- 1941 The germination of maize pollen. *Science* 94 : 168-169.

Holman, R. M. and F. Brubaker

- 1926 On the longevity of pollen. *Univ. Cal. Publ. in Botany* 13 : 179-204.

Maximow, N. A.

- 1938 *Plant Physiology* ps. 432-450. Mc. Graw Hill Book Company, New York and London.

Nebel, B. R.

- 1939 Longevity of pollen of apples, pears, plums, peach, apricot and sourcherry. *Proceedings A. S. H. S.* 37 : 130-132.

Pfeiffer, N. E.

- 1936 Longevity of pollen of *Lillium* and hibrid *Amaryllis*. *B. I. I.* 8 : 141-150.

Sartoris, G. B.

- 1942 Longevity of sugar cane and corn pollen. *Amer Jour. Bot.* 29 : 395-150.

Wolfe, H. S.

- 1944 Laboratory notes. Não publicado.