

## GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE CAFEIEIRO ACAUÃ PARA ESTIMATIVA DE VIABILIDADE<sup>1</sup>

Paula Cristina da Silva Angelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

<sup>2</sup> Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Fundação Procafé, Varginha - MG, paula.angelo@embrapa.br

**RESUMO:** O estudo dos grãos de pólen ou micrósporos é interessante sob vários aspectos científicos, desde a ciência básica até a biotecnologia. A fase progâmica é quando os gametas masculinos competem para realizar fecundações. Estudos sobre esta competição e sobre a duração da fase progâmica em café foram publicados há alguns anos. O presente trabalho teve como objetivos testar condições para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cafeeiro Acauã e utilizar as melhores condições para comparar a viabilidade em diferentes estádios de desenvolvimento da flor e alterações na viabilidade dos grãos, nos dias seguintes à coleta. As flores e anteras foram examinadas sob microscópio estereoscópico para seleção de anteras íntegras, pré e pós-deiscência. Foram testados três meios de germinação para os grãos de pólen, designados como SAC18, CAS E CAS/10, em pólen de anteras pré e pós-deiscência em botões florais maduros fechados, flores no dia da antese, flores abertas preservadas por três dias à temperatura ambiente ou em refrigerador. Três anteras selecionadas ao acaso foram imersas em 300 µL de meio. Pelo menos três repetições de cada experimento foram preparadas. A viabilidade foi medida como a porcentagem de grãos de pólen que emitiram tubos polínicos com comprimento pelo menos igual ao diâmetro entre os presentes em cada campo de observação (oculares e objetivas de aumento 10X). Mais de 1000 grãos de pólen foram contados por experimento, com exceção de flores abertas por três dias que perderam os micrósporos no frasco em que estavam armazenadas. Para pólen de flores coletadas no dia da antese, os meios CAS e SAC18 não diferiram e uma porcentagem maior de grãos de pólen germinou nestes meios do que em CAS/10. Grãos de pólen em anteras pós-deiscência de botões maduros fechados foram aqueles que germinaram em maior porcentagem (média de 70,7%), o que pode estar relacionado com taxas de autopolinização.

**PALAVRAS-CHAVE:** gametogênese, cultivo *in vitro*, *Coffea*.

### ***IN VITRO* GERMINATING ACAUÃ COFFEE POLLEN GRAINS TO EVALUATE VIABILITY**

**ABSTRACT:** Studying pollen grains or microspores is interesting for many research fields from pure science to biotechnology. Progamic is the phase when male gametes compete for fertilization. Results on this competition and the extent of progamic phase in coffee had already been reported years ago. This work aimed to test conditions for *in vitro* germination of pollen grains from the Acauã coffee and to use the best conditions to compare viability in different developmental stages of the flowers and days after collect. Anthers were examined under microscope to select the healthier and to distinguish those already dehiscent from those still closed. Three media for *in vitro* germination of pollen grains, designated as SAC18, CAS and CAS/10, were tested for anthers pre and post-dehiscence in floral buds completely developed and closed, open flowers at anthesis, open flowers preserved under environmental temperature or in the refrigerator for three days. Three anthers, selected randomly from flowers in each stage, were immersed in 300 µL of media. At least three replicas were made for each experiment. Viability was measured as the percentage of pollen grains producing pollen tubes with length at least equal to the diameter among those counted per microscopic examination field (ocular and objective lens for 10X magnification). More than 1,000 microspores were counted per experiment, exception made for open flowers preserved for three days because microspores got lost in the collect flasks. For pollen collected from flowers at anthesis, media CAS and SAC18 did not differ and a lower percentage of germinated grains was observed in CAS/10 medium. Pollen grains from after-dehiscence anthers in closed mature floral buds germinated in higher percent (70.7% in average), and this can be related with self-pollination rates.

**KEYWORDS:** gametogenesis, *in vitro* culture, *Coffea*.

### **INTRODUÇÃO**

O estudo dos grãos de pólen ou micrósporos é interessante sob vários aspectos científicos, desde a ciência básica e evolução das plantas até o melhoramento vegetal, porque a interação do pólen com os estigmas e estiletos pode implicar diretamente no sucesso de cruzamentos controlados e a biotecnologia, quando se pretende trabalhar com haplóides ou duplo-haplóides. A fase que vai desde a polinização até a fertilização (singamia dos núcleos dos gametas) é conhecida como fase progâmica. Durante esta fase, os gametas masculinos competem para realizar fecundações (Williams, 2011). Nas plantas de café, a competição entre grãos da própria planta e grãos de plantas de outras variedades dentro dos

estiletos já foi objeto de análise (Mendes, 1961) e a duração da fase progâmica e a longevidade do pólen também (Conagin, 1961; Boaventura, 1990).

Os objetivos deste trabalho foram testar condições para a germinação *in vitro* de grãos de pólen e utilizar as melhores condições para avaliar a viabilidade em diferentes estádios de desenvolvimento da flor e dias subsequentes à coleta.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi coletado de planta da variedade Acauã, mantida na área da Fundação Procafé, B. Vila Verônica, em Varginha – MG, em tonéis com capacidade para 200 L com mistura de solo, areia e substrato para plantas de viveiro, onde recebem tratamentos culturais convencionais e irrigação. Em função destas condições, a planta produziu uma boa florada em dezembro e as flores foram utilizadas para o experimento. No dia em que foi observada a antese da maior parte das flores de uma mesma florada, foram coletadas flores abertas e botões florais em diversos estádios de desenvolvimento. As flores e anteras foram examinadas sob microscópio estereoscópico para seleção de anteras íntegras e a análise de anteras pós e pré-deiscência. A coleta foi realizada utilizando tesoura para cortar os pedúnculos dos glomérulos se as flores foram acondicionadas em tubos plásticos do tipo Falcon com capacidade para 50 mL, autoclavados e secos, com cuidado necessário para não causar lesões às anteras. O material vegetal foi transportado para o laboratório, utilizado imediatamente para os experimentos, guardado em refrigerador ou deixado à temperatura ambiente, nos mesmos tubos, bem fechados, em que foi coletado. Os meios de cultivo utilizados para induzir a germinação *in vitro* foram designados como SAC18, CAS e CAS/10. SAC18 foi 0,01%  $H_3BO_3$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $Ca(NO_3)_2$ , 1 mM  $MgSO_4$ , 18% sacarose, 0,03% caseína, pH 7 (modificações de Zheng et al., 2013; Song et al., 2014), 1,5 mg/mL de ácido cítrico. O meio CAS tinha a mesma composição e pH, com 0,2% de ágar. O meio CAS/10 recebeu 1/10 da concentração de sais, a sacarose continuou em 18% e ágar a 0,5%. Anteras de quatro ou cinco flores em cada estádio foram excisadas com pinça, sob microscópio estereoscópico. Grupos de três anteras sorteadas ao acaso foram imersas em 300  $\mu$ L de meio até que os grãos de pólen ficassem dispersos. Para anteras fechadas (pré-deiscentes), foi utilizada lâmina de bisturi estéril para realizar cortes transversais nas tecas e liberar os grãos de pólen nos meios de cultivo. Os experimentos foram realizados com no mínimo três repetições para cada condição (para algumas condições, como flores e anteras abertas aos três houve perda de pólen dentro dos tubos Falcon). A germinação se deu em placas de Petri descartáveis, estéreis, fechadas e reunidas em câmara úmida, levada a estufa em temperatura constante de 30 °C, por 10 horas em média. Após este período, quando necessário, os experimentos foram armazenados, ainda na câmara úmida, em refrigerador, até as contagens. Foram contados pelo menos 10 campos de microscópio óptico (oculares e objetivas com aumento de 10X) para cada repetição e anotados como germinados, grãos de pólen com tubos polínicos de comprimento correspondente pelo menos ao seu diâmetro. Como grãos não germinados, foram contados aqueles que se apresentavam com o mesmo aspecto desde as observações iniciais, apenas hidratados. Grãos com tubos anômalos foram anotados separadamente. As análises de variância e testes de média foram realizadas utilizando o aplicativo SigmaPlot, versão 11).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para comparar os três diferentes meios de germinação, foi escolhido pólen coletado de anteras no dia da antese (Figura 1A e B), sob a expectativa de que este seria o estádio em que os grãos apresentariam maior viabilidade, avaliada, neste

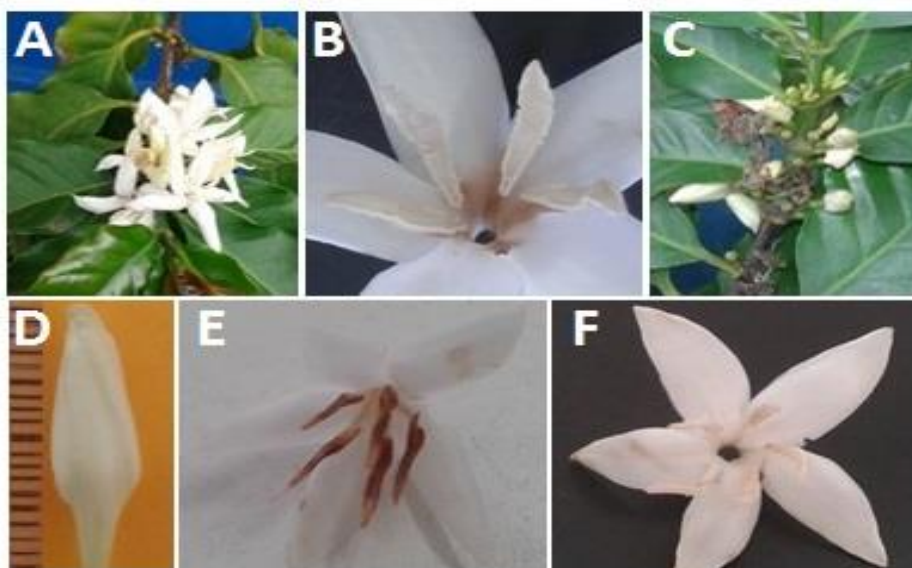


Figura 1. Flores de cafeeiro da variedade Acauã, coletadas para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen em experimentos de germinação *in vitro*. **A e B** – flores no dia da antese. Em B é possível visualizar os micrósporos após a deiscência das anteras. **C e D** – botões florais completamente desenvolvidos. Em D, botões no estágio em que foram utilizados para os experimentos com escala em mm. **E** – flor preservada em laboratório, à temperatura ambiente, por três dias, sem nenhum tipo de conservante. Observar a coloração vermelha das anteras, devida à oxidação. **F** – flor preservada em refrigerador, por três dias, sem nenhum tipo de conservante.

trabalho, pela porcentagem de grãos germinados (apresentando tubo polínico) entre grãos contados por campo. Entre os três meios de germinação testados, o CAS/10 foi aquele em que os grãos germinados foram encontrados em menor proporção ( $H_{(GL=2)} = 9,456$ ;  $P = 0,009$ ). Além disso, devido à concentração relativamente alta de açúcar e sacarose, a dificuldade para encontrar campos com micrósporos bem dispersos, que possibilitassem contagem rápida foi mais difícil. As contagens da porcentagem de grãos germinados em SAC18 e CAS não foram diferentes (Figura 2) e deduziu-se que qualquer um dos dois poderia ser utilizado para avaliar a diferença quanto à viabilidade dos micrósporos nos experimentos subsequentes.

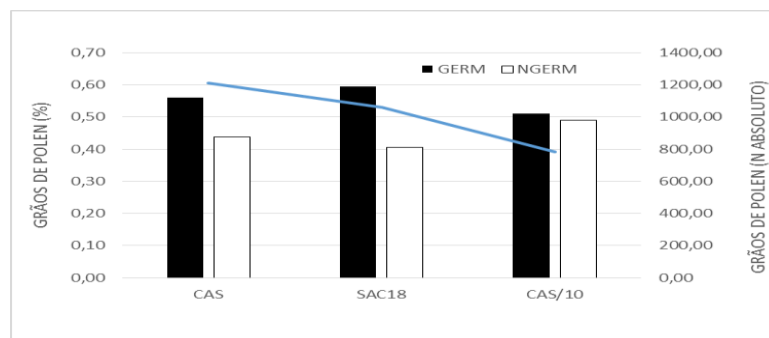


Figura 2. Porcentagem de germinação de grãos de pólen de cafeeiro Acauã nos meios de cultivo **CAS**, **SAC18** e **CAS/10**. O número de grãos de pólen contados em cada experimento está representado pela linha e valores no eixo vertical à direita da figura. **GERM** = grão de pólen germinado. **NGERM** = grão de pólen não germinado.

No entanto, utilizando o meio CAS, verificou-se que o pólen coletado de anteras deiscidas de botões completamente desenvolvidos mas ainda fechados (Figura 1C e D) germinou em porcentagem significativamente ( $F_{(GL=3)} = 58,864$ ;  $P < 0,001$ ) maior (70,7% em média) do que o pólen das flores abertas (58,7%). Pólen coletado de anteras ainda fechadas de botões no mesmo estágio de desenvolvimento germinou em porcentagem ainda menor (48,2%) que o pólen de flores abertas, seguido por pólen de flores abertas mantidas por três dias em refrigerador (18,4%) (Figura 3). O pólen de flores preservadas pelo mesmo tempo à temperatura ambiente perdeu quase que completamente a viabilidade e aproximadamente 5% (um grão de pólen germinando por campo focal do microscópio) foram observados portando tubo polínico. A oxidação das anteras de flores preservadas à temperatura ambiente (Figura 1E) quando comparadas com aquelas de flores preservadas em geladeira (Figura 1F) já prenunciava este resultado. No entanto, a perda de viabilidade do pólen nas flores mantidas em geladeira foi mais rápida do que o esperado. Mendes (1961) coletou botões para os experimentos e nas próximas investigações a longevidade dos micrósporos em flores neste estágio de botão será investigada.

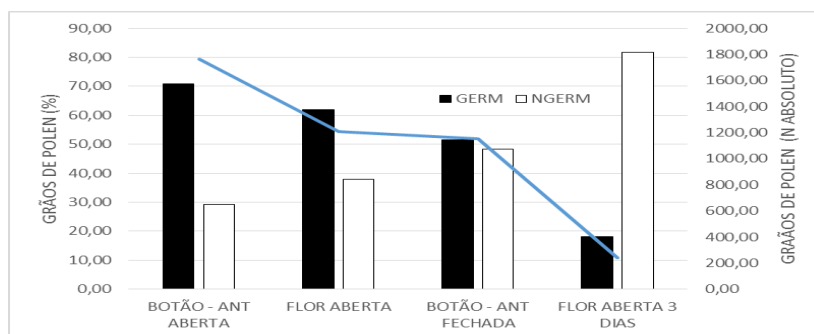


Figura 3. Porcentagem de germinação de grãos de pólen de cafeeiro Acauã coletados de anteras abertas em botões florais completamente desenvolvidos (**botão – ant. aberta**); anteras abertas em flores no dia da antese (**flor aberta**); anteras fechadas em botões florais completamente desenvolvidos (**botão – ant. fechada**) e flor coletada em antese e

mantida em refrigerador por três dias, sem nenhum tipo de conservante (**flor aberta 3 dias**). O número de grãos de pólen contados em cada experimento está representado pela linha e valores no eixo vertical à direita da figura. **GERM** = grão de pólen germinado. **NGERM** = grão de pólen não germinado.

A diferença com relação à viabilidade dos grãos coletados de anteras fechadas ou abertas dos botões florais completamente desenvolvidos foi significativa, como exposto acima. No entanto, verificou-se também diferença significativa entre repetições e interação entre estágio das anteras e as repetições do experimento para anteras fechadas (Figura 4). Esta diferença entre repetições para anteras fechadas deveu-se, em parte, à necessidade de cortar as tecas com lâminas de bisturi para provocar a liberação do pólen. Ainda assim, as comparações de percentagem de grãos germinados no âmbito de qualquer uma das repetições, indicaram todas que pólen de anteras abertas apresentou-se significativamente mais viável que pólen de anteras fechadas. É interessante registrar que neste estágio de botão completamente desenvolvido foram encontradas anteras abertas e fechadas nas mesmas flores, em número variável e por isto o exame prévio das flores ao microscópio estereoscópico foi útil para a seleção dos dois tipos de anteras. Alguns botões coletados para as análises fizeram antese parcial nos tubos Falcon em que estavam coletados, o que, além da superposição muito leve das laterais das pétalas, denunciou que estavam em pré-antese. É também interessante reforçar que os melhoristas, corretamente, realizam emascações em estádios um pouco mais precoces que este que antecipa imediatamente a antese para evitar as autofecundações, quando isto é necessário.

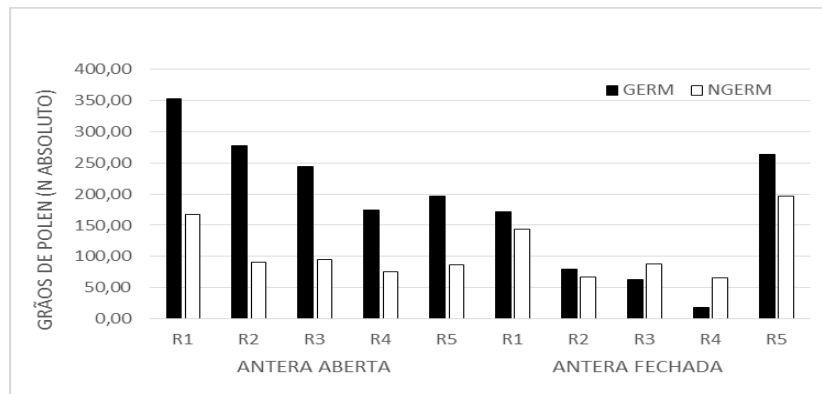


Figura 4. Grãos de pólen de cafeeiro Acauã coletados de anteras abertas em botões florais completamente desenvolvidos (**antera aberta**) e de anteras fechadas em botões florais completamente desenvolvidos (**antera fechada**). **R1 a R5** representam as repetições do mesmo experimento. **GERM** = grão de pólen germinado. **NGERM** = grão de pólen não germinado.

A ocorrência de pólen com maior viabilidade em anteras abertas antes da antese das flores pode estar relacionada com taxas de autopolinizações no período da pré-antese, o que é característica de espécies autógamas, como os cafeeiros arábica. No entanto, para concluir sobre isto será necessário investigar outras variedades e espécies, incluindo espécies alógamas como *C. canephora*.

Os grãos de pólen contados como germinados apresentaram-se como aqueles observados nas Figuras 5E e F portando tubos polínicos com comprimento correspondente a pelo menos o seu próprio diâmetro. Foi contada como anômala a germinação marcada por dois asteriscos na Figura 5E, tipo raro, também reportado no trabalho de Conagin (1961). A porcentagem de germinações anômalas anotadas ficou em 2,5%, com os aspectos dos micrósporos nas Figuras 5A, B e C. Aspecto semelhante ao grão na Figura 5B também foi relatado por Conagin (1961) “expansão disforme de citoplasma”. No entanto, a identificação e a estimativa da porcentagem de anomalias também é um resultado que precisa ser verificado com mais cuidado, porque, ao fim das observações aqui descritas, ficou a impressão de que alguns tipos de anomalias, como aquelas nas Figuras 5A e C, são mais frequentes em alguns meios de germinação do que em outros e podem ter resultado da interação com o ambiente em que se deu a germinação ou ter atingido tubos polínicos que permaneceram por mais tempo expostos ao meio em função de terem iniciado a germinação mais rapidamente. A transferência dos experimentos de germinação para refrigerador depois de terem permanecido em estufa a 30° C foi providência adotada para paralisar o processo de germinação e padronizar os experimentos, mas pode ter causado efeitos colaterais. A anomalia no tubo polínico da Figura 5A, por exemplo, pode, se não for consequência de interação com o meio de germinação, ter sido causada por danos mecânicos resultantes do transporte dos experimentos da estufa para o refrigerador ou durante a homogeneização do meio de cultivo para dispersar os micrósporos e possibilitar as contagens, apesar de muito cuidado ter sido tomado. Torções em tubos polínicos muito longos foram observadas em

consequência do transporte dos experimentos. A pipetagem também provocou alguns problemas e a utilização de lamínulas por vezes impediu o espalhamento dos micrósporos. Germinação de tubos polínicos longos e normais por dois poros simultaneamente foi observada pelo menos quatro vezes ao longo dos experimentos.

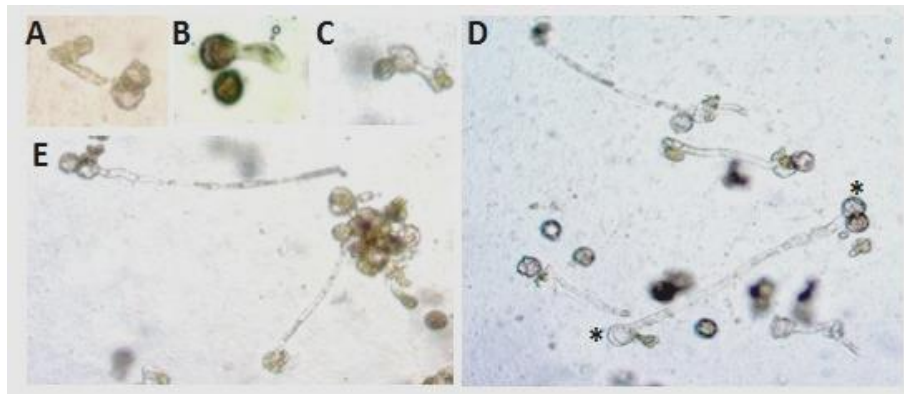


Figura 5. Aspecto geral de grãos de pólen coletados de cafeeiro Acauã e cultivados *in vitro*. **A, B, C** e asteriscos em **D** – germinação anômala (vide texto para detalhes). **D** e **E** – grãos de pólen portando tubos polínicos longos e normais, grãos não germinados e aglomerados de grãos de pólen.

Neste trabalho, os grãos de pólen coletados de anteras abertas em botões florais completamente desenvolvidos e fechados foram aqueles entre os quais verificou-se a maior porcentagem de germinação: 70,7% (1246 em 1762) como média das cinco repetições do experimento no meio CAS. Para *C. arabica*, há citações de germinação em porcentagens maiores que 80% e para *C. canephora* porcentagens em torno de 55% (Mendes apud Conagin, 1961). Acauã foi selecionado entre plantas oriundas do cruzamento entre um Sarchimor e o Mundo Novo (Matiello et al., 2010) e porcentagem de viabilidade do pólen intermediária quando comparada às cultivares que lhe deram origem atende as expectativas. No entanto, é preciso considerar que os resultados citados acima (Mendes apud Conagin, 1961) e os que são aqui relatados foram obtidos em meios de germinação diferentes e melhor seria reproduzir condições para tirar conclusões mais precisas. E ainda, é preciso ter em mente que o tempo dado entre o início dos experimentos e as contagens (cerca de 10 horas) não foi longo se comparado aos relatos de 48 horas e até 68 horas para que os tubos polínicos atinjam os ovários em fecundações cruzadas ou autofecundações de cafés, respectivamente (Mendes, 1961). Então, torna-se necessário considerar que a manutenção dos experimentos em estufa por um tempo mais longo poderia resultar em porcentagens de germinação mais altas.

## CONCLUSÕES

O estágio de desenvolvimento em que a maior porcentagem de micrósporos de cafeeiros da variedade Acauã demonstrou viabilidade germinando em meio CAS foi em anteras abertas de botões florais completamente desenvolvidos mas ainda fechados, ou seja, antes da antese das flores.

## AGRADECIMENTOS

A autora é grata ao IPD - Instituto de Prevenção e Diagnóstico, Av. Princesa do Sul, 1900 (Varginha – MG), na pessoa do Dr. Janini, que cedeu um horário ao microscópio óptico acoplado a um sistema de aquisição de imagens digitais nas instalações daquele Instituto e supervisionou pessoalmente o registro das imagens de pólen (Figura 5).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOAVENTURA, Y. M. S. (1990). Microsporogênese de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner com número duplicado de cromossomos. *Bragantia* **49**, 193-204.
- CONAGIN, C. H. T. M. (1961). Microsporogênese, incompatibilidade e esterilidade masculina em *Coffea congensis* Froehner. *Bragantia* **20**, 669-677.
- MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R. & FERNANDES, D. R. (2010) Variedades de café. In *Cultura de café no Brasil*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - SARC/PROCAFE - SPAE/DECAF Fundação Procafé, pp. 76-77.
- MENDES, A. (1961). Velocidade de penetração do tubo polínico em *Coffea arabica* L., *Bragantia* **20**, 495-502.
- SONG, G.; CHEN, Q. & TANG, C. (2014). The effects of high-temperature stress on the germination of pollen grains of upland cotton during square development. *Euphytica* **200**, 175-186.

- WILLIAMS, J. H. (2012). The evolution of pollen germination timing in fFroehner plants: *Austrobaileya scandens* (Austrobaileyaceae). *AoB PLANTS*, pls010.
- ZHENG, Y.; XIE, Y.; JIANG, Y.; QU, X. & HUANG, S. (2013). Arabidopsis actin-depolymerizing factor7 severs actin filaments and regulates actin cable turnover to promote normal pollen tube growth. *The Plant Cell* **25**, 3405-3423.