

# Comportamento Germinativo E Viabilidade Polínica De *Passifloras* Oriundos De Flores Coletadas Em Diferentes Estádios E Horários

Onildo Nunes de Jesus<sup>1</sup>; Taliane Leila Soares<sup>2</sup>; Eder Jorge de Oliveira<sup>1</sup>; Cássia Adriana Dourado Martins<sup>3</sup>; Janay Almeida dos Santos-Serejo<sup>1</sup>

## Resumo

Esse trabalho tem como objetivo produzir informações sobre a viabilidade dos grãos de pólen de duas espécies de maracujazeiro com potencial agrônomo e ornamental investigando o melhor horário e estágio de coleta da flor para fins de hibridação interespecífica. Foram avaliados cinco horários de coleta de pólen 8h (antese), 12 h, 16 h e 24 h após a coleta da flor e em dois estádios desenvolvimento (flor aberta – antese e botão fechado). Para a germinação de pólen utilizou-se meio de cultura contendo 15% de sacarose, 0,01% H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,01% de KNO<sub>3</sub>, 0,03% de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,02% de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, solidificado com 0,8% de ágar, e pH ajustado para 7,0. A viabilidade do pólen foi avaliada pela coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial dois x quatro x dois (genótipos x horário de coleta) x estágio) com 4 repetições, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Houve diferenças significativas para a germinação *in vitro* e viabilidade polínica entre os acessos de passifloras estudados em relação aos horários de coleta e estádios de desenvolvimento da flor. O melhor horário e estágio de coleta da flor, com relação à melhor germinação e viabilidade do pólen é na antese, às 8h da manhã.

## Introdução

Em qualquer método de polinização, a viabilidade de pólen é considerada satisfatória quando está entre 50% a 70%. Tendo em vista que a maioria das espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) são auto-incompatíveis e apresentam problemas na hibridação interespecífica, a viabilidade dos grãos de pólen torna-se ainda mais importante neste processo.

No campo, o pólen é viável somente por algumas horas e apresenta um curto tempo de vida, pois está sujeito a diferenças de temperatura, umidade e intensidade luminosa. Além disso, está exposto à ação de defensivos agrícolas que também contribuem para reduzir a viabilidade (Scorza e Sherman 1995). Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade.

A hibridação interespecífica é interessante, não só para o melhoramento visando à produção de frutos, como também na obtenção de híbridos ornamentais. Além disso, pode ser uma forma de aumentar o interesse pela conservação da espécie. Portanto, visando à utilização dessas espécies como parentais em hibridações interespecíficas e, conseqüentemente, a maximização da taxa de pegamento destes cruzamentos, iniciou-se uma análise da performance polínica via germinação *in vitro* e pelo método histoquímico (corante).

O objetivo do trabalho foi avaliar o percentual de viabilidade do pólen ao longo do tempo de coleta das flores e em diferente estágio de desenvolvimento fisiológico, de forma a se conhecer o melhor horário e estágio de desenvolvimento da flor para realização de polinizações cruzadas envolvendo as espécies *P. cincinnata* e *P. alata* como doadoras de pólen em futuros cruzamentos controlados.

## Material e Métodos

Grãos de pólen de *P. cincinnata* e *P. alata* oriundos de flores em estágio de botão fechado e flor aberta - antese (Figura 1) foram coletados em diferentes horários de coleta: 8h (antese), 12 h, 16 h e 24 h após a coleta

---

<sup>1</sup>Pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, C.P 007, E-mail: onildo@cnpmf.embrapa.br; eder@cnpmf.embrapa.br; janay@cnpmf.embrapa.br

<sup>2</sup> Pós-doutoranda Embrapa/UFRB, Cruz das Almas, BA, E-mail: talialeila@gmail.com.

<sup>3</sup> Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP: 44380-000, E-mail: cassia\_ef@yahoo.com.br

da flor. Em seguida, avaliou-se o comportamento do gametófito masculino por meio da germinação *in vitro* e análise histoquímica.

#### Germinação *in vitro* de pólen

Os grãos de pólen dos acessos de passifloras BGM 002 (*P. cincinnata*) e BGM 004 (*P. alata*) foram distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 35 mL de meio de cultura 0,03% de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,02% de  $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01% de  $\text{KNO}_3$ , 0,01% de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0.

Com auxílio de um pincel, o pólen foi distribuído sobre o meio de cultura de modo a promover uma distribuição mais homogênea do material. Utilizou-se para cada placa uma amostra composta de pólen oriundos de cinco flores de cada espécie. Para a percentagem de germinação *in vitro* foram contabilizados todos os grãos da placa de Petri com auxílio de um estereomicroscópio binocular.

O delineamento utilizado para o teste *in vitro* e o de coloração foi inteiramente casualizado em esquema fatorial dois x quatro x dois (genótipo x hora de coleta x estágio de desenvolvimento) com quatro repetições cada.



**Figura 1.** Aspecto das flores de maracujazeiro coletadas em dois estádios de desenvolvimento fisiológico (flor aberta (FA) - antese e botão fechado (BF): A) *Passiflora cincinnata* Mast. e B) *Passiflora alata* Curtis.

#### Viabilidade do pólen por meio de análise histoquímica (corante)

Para a viabilidade do pólen por meio da análise histoquímica utilizou-se o corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% que reflete a atividade das enzimas desidrogenase envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos.

Uma amostra de pólen, retirada de três anteras oriundas de flores coletadas nos dois estádios de desenvolvimento fisiológico (fechada e aberta) foi distribuída sobre uma lâmina de vidro e em seguida colocou-se uma gota do corante, fechando-se o conjunto com uma lamínula. As observações das quantidades de pólen viáveis e inviáveis por genótipo foram analisadas duas horas após a preparação das lâminas, pois o corante TTC requer um lapso de tempo para que ocorra a reação enzimática. Foram contabilizados 100 grãos de pólen/lâmina/genótipo com quatro repetições cada, perfazendo um total de 400 grãos de pólen, com auxílio de um microscópio óptico. Considerou-se grãos de pólen viáveis (coloração vermelha) e inviáveis (coloração marrrom).

#### **Resultados e Discussão**

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) para a germinação *in vitro* e viabilidade polínica entre os acessos de passifloras estudados em relação aos horários de coleta e estádios de desenvolvimento da flor. Não houve interação tripla entre os fatores estudados.

#### Germinação de pólen

Dentre os acessos avaliados, destacou-se o acesso BGM 002 (*P. cincinnata*) que apresentou os maiores valores de germinação de 34,48%, seguido do acesso BGM 004 (*P. alata*) com 24,7 % de grãos de pólen germinados. Estes resultados são foram discrepantes aos encontrados por Viana et al. 2006, na qual observaram-se germinação acima de 84% em *P. cincinnata*. De acordo com os autores, não houve variação na germinação *in vitro* de grãos de pólen com o horário de coleta, comprovando que os grãos de pólen permanecem viáveis durante todo o dia. Por outro lado, Costa et al. 2009 observaram variação significativa para percentagem de germinação nos diferentes horários de coleta do pólen oriundos de flores de *P. alata*.

No presente estudo, pode-se observar que a hora de coleta interferiu no percentual de germinação do pólen *in vitro* (Tabela 1). De uma maneira geral, o primeiro horário da coleta do pólen às 8 horas favoreceu as maiores taxas de germinação.

Com relação ao estágio de desenvolvimento da flor, verificou-se que a maior germinação *in vitro* do pólen ocorreu naqueles coletado de flores em estágio de antese - flor completamente aberta (47,47%), em relação ao coletado de flores em estágio de botão fechado (11,71%). A germinação do grão de pólen não ocorre dentro da antera, mas o mesmo deve estar pronto para germinar logo após a deiscência da mesma, no caso de encontrar condições favoráveis. Em programas de melhoramento genético é fundamental coletar o pólen em estágio adequado de maturação, para que o mesmo mantenha a viabilidade e a capacidade de germinar quando for realizada a polinização.

#### Viabilidade do pólen por meio de análise histoquímica

Com relação à viabilidade estimada com o corante TTC, mais uma vez o acesso BGM 002 foi que apresentou os mais altos valores com 71,72% de grãos viáveis, enquanto BGM 004 obteve 64,96% de viabilidade. Alguns 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 e Pirlak 1999, Huang et al. 2004). Além disso, o TTC é muito utilizado por ser um método relativamente rápido e simples. Com relação ao estágio e o horário de coleta das flores também influenciaram no percentual de viabilidade com os mais altos valores registrados quando o pólen oriundo de flores na antese e coletados às 8 horas diminuindo ao longo do período de abertura

**Tabela 1.** Porcentagem de germinação *in vitro* (GIV) e viabilidade polínica (VP) de pólen de passifloras spp. coletados em dois estádios de desenvolvimento da flor e em diferentes horários.

Horário de Coleta	Germinação de pólen (%)				Viabilidade de pólen (%)			
	BGM 002		BGM 004		BGM 002		BGM 004	
	FA	BF	FA	BF	FA	BF	FA	BF
8:00 h	80,92 aA	30,45 aB	65,55 aA	11,13 aB	96,70 aA	86,48 aB	80,23 aA	72,1 aB
10:00 h	61,55 bA	17,88 bB	44,33 bA	5,48 abB	78,90 bA	80,63 aA	65,70 bA	61,70 bA
12:00 h	42,23 cA	13,28 bcB	38,35 bA	6,38 bB	73,83 bcA	57,10 bB	55,55 cA	50,50 bcA
14:00 h	21,35 dA	8,23 cB	25,55 cA	0,90 cB	66,60 cA	56,43 bB	56,30 cA	55,43 cA
CV (%)	8,9				5,14			

Médias seguidas por letras distintas na coluna, dentro de cada fator de variação, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. (FA = flor aberta; BF = botão fechado).

A perda da viabilidade polínica em função do tempo após a abertura da flor foi também observada por Souza et al. (2002), em maracujá amarelo utilizando-se de análise histoquímica (solução de Alexander e lugol), porém o índice ainda se manteve alto, superior a 75%, mesmo 24 horas após a antese. Outros fatores, tais como umidade relativa, temperatura, pressão osmótica do conteúdo celular do pólen e resistência da parede polínica podem afetar a viabilidade polínica (Vara Prasad et al.1999).

Na literatura são registrados alguns trabalhos abordando a influência do horário de coleta das flores e o estágio adequado de coleta do botão floral essenciais no processo de germinação *in vitro* e viabilidade de pólen em outras espécies. Trabalhos conduzidos por Nunes (2004), com grãos de pólen de flores de atemoeira coletados em diferentes horários, entre 7 horas e 10 horas, e inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, indicaram que os grãos de pólen coletados às 7 horas e inoculados em meio de cultura com concentração de sacarose de 10%, apresentaram maior percentagem de germinação, com média de 12,25%. Já Nietzsche et al. (2009) avaliando a viabilidade de grãos de pólen de pinheira (*Annona squamosa*) coletados de flores em diferentes horários entre 0 às 7 horas, em intervalos de 1 h, apresentaram a mesma

porcentagem de germinação, indicando que a coleta das flores de pinheira, para a polinização artificial, pode ser realizada às 7 horas, sem redução da viabilidade dos grãos de pólen.

## Conclusões

A coleta do pólen nas primeiras horas da manhã às 8 horas e na antese proporcionou maior porcentagem de germinação e viabilidade do pólen dos acessos BGM 002 e BGM 004, indicando que a coleta das flores desses acessos para a polinização artificial, pode ser realizada nesse horário.

## Referências Bibliográficas

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.

Costa RS, Moro FV e Oliveira JC (2009) Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura** **31**: 956-961.

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.

Nietsche S, Pereira MCT, Oliveira C, Dias MM e Reis ST (2009) Viabilidade dos grãos de pólen de flores de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes horários. **Ciência e Agrotecnologia** **33**: 527-531.

Nunes CF (2004) **Polinização artificial e natural de atemóia cultivar “Gefner”, viabilidade do grão de pólen e correlação entre comprimento de flor e número de carpelos**. Janaúba, 55p. (Monografia de Conclusão de Curso)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba.

Peixoto M (2005) Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro FG, Junqueira NTV and Braga MF (eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 458-462.

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

Souza MM, Pereira TNS e Martins ER (2002) Microsporogênese 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.

Vara Prasad PV, Craufurd PQ e Summerfield RJ (1999) Fruit number in relation to pollen production and viability in Groundnut exposed to short episodes of heat stress. **Annals of Botany** **84**: 381-386.

Viana JC, Belo GO, Fonseca JWS, Rosa FA e Souza MM (2006) Estudo do sistema reprodutivo de *Passiflora cincinnata* Mast. por meio de testes histoquímicos e germinação *in vitro*. In: **XII Seminário de Iniciação Científica da UESC**. UESC, Ilhéus.