

Morfoanatomia polínica e fertilidade de *Ananas* sp. (BAG 197) com potencial ornamental

Everton Hilo de Souza¹, Fernanda Vidigal Duarte Souza², Davi Silva Costa Junior³, Monica Lanzoni Rossi⁴, Taliane Leila Soares⁵, Adriana Pinheiro Martinelli⁶

Resumo

O abacaxi ornamental vem se destacando nos últimos anos, gerando uma demanda, principalmente no mercado externo, que se deve ao exotismo e ao colorido dos pequenos abacaxis. A obtenção de novos híbridos é estratégica para a expansão desse mercado. Entretanto, barreiras de incompatibilidade podem dificultar hibridações de interesse. O objetivo do trabalho foi estudar a morfoanatomia, germinação e viabilidade dos grãos de pólen, a fim de identificar as barreiras reprodutivas no acesso (BAG 197) de *Ananas* sp. para vivilizar futuros cruzamentos. Os grãos de pólen são de tamanho médio, simetria radial, âmbito ovalado a esferoidal, 2-porados, subprolatos, exina eutectada, reticulada, heterobrocada, lumens variando de arredondados a poligonais, sem granulações. Das 371 flores polinizadas com diferentes variedades botânicas, nenhuma produziu sementes, mesmo quando foi realizada autogamia e xenogamia. Esta infertilidade é uma barreira pré-zigótica, que pode estar relacionada com a baixa porcentagem de polens viáveis, visto que a germinação foi em torno de 29,73 % e a viabilidade com carmim acético de 35,32 %. A média observada para o comprimento do tubo polínico foi de 1052,93 µm, dados estes superiores aos observados para as outras variedades botânicas da espécie.

Introdução

O abacaxi é o representante de maior importância econômica da família Bromeliaceae devido à utilização como alimento, produção de fibras, papel, enzimas de ação proteolítica, metabólitos secundários, cosmética e alimentícia, além do seu grande potencial ornamental (Coppens D'eeckenbrugge e Duval 2009; Sanewski 2009; Souza 2010).

O uso ornamental vem se destacando nos últimos anos, gerando uma demanda, principalmente no mercado externo, que se deve ao exotismo e ao colorido dos pequenos abacaxis (Souza et al. 2009). Diante desta demanda, a obtenção de novos híbridos de bromélias é interessante para esse mercado em expansão e em busca de novidades. Sucessos de hibridações com abacaxi ornamental já foram descritas por Sanewski 2009 e Souza et al. 2009.

Os estudos referentes à morfologia e a ultraestrutura polínica têm oferecido importantes dados para a taxonomia e melhoramento genético de bromeliáceas, auxiliando na melhor definição da delimitação genérica e de espécies muito semelhantes além de verificar algumas causas de anormalidade e barreiras existentes, como inviabilidade dos grãos de pólen, má formação da exina, tamanho e uniformidade dos grãos, dentre outras (Moreira et al. 2005).

A viabilidade do grão de pólen pode ser determinada através de diferentes técnicas tais como a indução da germinação *in vitro* e *in vivo* ou parâmetros citológicos como a coloração através de corantes específicos (Kearns e Inouye 1993, Soares et al. 2008a).

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado para determinar a fertilidade do pólen, permitindo o desenvolvimento do tubo polínico, mas vários fatores podem interferir nesta germinação como estado nutricional das plantas, horário e método de coleta dos grãos de pólen, fotoperíodo, temperatura, período de incubação e presença de micro e macronutrientes no meio de cultura, além de ajustes da composição dos meios de cultura para cada espécie (Brewbaker e Kwach 1963, Soares et al. 2008a). O método mais eficiente e seguro para determinar o desempenho do pólen de uma determinada variedade é a própria fertilização *in vivo* seguida da geração de sementes. No caso das bromeliáceas do gênero *Ananas* algumas hibridações realizadas para a obtenção de híbridos ornamentais, não têm tido êxito, devido à barreiras de incompatibilidade ainda pouco esclarecidas. O acesso BGA 197 (*Ananas* sp.) tem mostrado elevado nível de incompatibilidade com acessos de outras variedades botânicas.

O objetivo deste trabalho foi estudar a morfoanatomia, germinação e viabilidade dos grãos de pólen, a fim de identificar as barreiras reprodutivas no acesso de *Ananas* sp. (BAG 197), para futuros cruzamentos e obtenção de híbridos de abacaxi com potencial ornamental.

¹ Eng. Agrônomo, M.Sc., Doutorando em Ciências, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303, Piracicaba, São Paulo, hilosouza@cena.usp.br

² Bióloga, PhD em Biologia Celular, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Bahia

³ Graduando em Agronomia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia

⁴ Bióloga, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo

⁵ Eng. Agrônoma, Dra. em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia

⁶ Eng. Agrônoma, PhD, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo

Material e Métodos

O objeto do presente estudo foi o acesso BGA 197 (*Ananas* sp.) oriundo do Banco de germoplasma de abacaxi (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram realizados estudos de morfologia, germinação e viabilidade de grãos de pólen deste acesso.

Para os ensaios de fertilização *in vivo* foram usados oito acessos pertencentes às diferentes variedades botânicas do gênero: *A. comosus* var. *comosus* (BAG 28), var. *ananassoides* (BAG 25, BAG 232), var. *bracteatus* (BAG 17, BAG 123), var. *erectifolius* (BAG 739, BAG 804) e a espécie *A. macrodontes* (BAG 81) todos proveniente do BAG abacaxi.

Caracterização dos grãos de pólen

As medidas dos grãos de pólen foram realizadas através de acetólise láctica fraca (ACLAC 40) conforme metodologia descrita por Raynal e Raynal 1979.

Para caracterização morfológica, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) os grãos de pólen foram fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, CaCl_2 0,001M, tampão cacodilato de sódio 0,05M, em pH 7,2) por 48 horas, desidratados em série etílica crescente (35%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%, 20 minutos cada, seguido de 3 trocas de 20 minutos de etanol puro). Em seguida, o material passou por secagem no aparelho de ponto crítico utilizando CO_2 líquido (Blazers CPD/030). As amostras secas foram montadas sobre suportes metálicos (stubs) e metalizadas com ouro durante 180 segundos. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP no NAP/MEPA/ESALQ/USP.

Para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky modificada por 24 horas. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato de sódio 0,1M, seguida de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, 3 lavagens em solução salina 0,9% e pré coloração em acetato de uranila 2,5%, por 12 horas. Em seguida, as amostras passaram por desidratação em série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 1 lavagem de 5 minutos cada; 90%, 2 lavagens de 10 minutos cada; e acetona pura, 3 lavagens de 20 minutos cada). A infiltração foi gradual em resina Spurr: acetona (1:3, 3 horas; 1:2, 3 horas; 2:1, 24 horas; resina pura, 24 horas). O material foi emblocado em resina pura por 48 horas, a 70°C e os blocos seccionados em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT2. As secções ultrafinas obtidas foram depositadas sobre grades de cobre previamente recobertas com formvar, contrastadas com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900 no NAP/MEPA/ESALQ/USP.

Para a caracterização dos grãos de pólen, utilizou-se a nomenclatura empregada por Punt et al. 2007.

Germinação e viabilidade dos grãos de pólen

Com auxílio de um pincel, os grãos de pólen, foram distribuídos em placas de Petri contendo 10 mL de meio de cultura SM (Soares et al. 2008a) mantidas à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro. Após 8 horas, procedeu-se a contagem dos grãos de pólen germinados e a medição do comprimento dos tubos polínicos com auxílio de estereomicroscópio Leica EZ4D com câmara digital acoplada.

Para a porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico foram utilizadas 8 repetições, sendo contabilizados 300 grãos de pólen, enquanto para o comprimento do tubo polínico foram selecionados aleatoriamente e mensurados 20 tubos polínicos. Os grãos de pólen foram considerados germinados quando o comprimento do tubo polínico foi igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

Os testes colorimétricos foram realizados com carmim acético 2%. Após breve aquecimento em bico de bunsen, procedeu-se a observação das lâminas, ao microscópio de luz Zeiss Axiovert 35, a partir do qual foram obtidas imagens digitais. Foram utilizadas três repetições com contagem de 100 grãos cada, o percentual de fertilidade dos grãos de pólen foi estipulado a partir da proporção entre grãos de pólen corados (viáveis) e não corados ou com citoplasma retraído (não viáveis).

Fertilização *in vivo*

Uma vez estabelecida a floração nas plantas receptoras, foram retiradas as anteras anteriormente à antese, garantindo dessa forma que ainda não sejam auto-fecundadas e ensacadas evitando contaminação por grãos de pólen de outras espécies. Com estame removido, foi depositada certa quantidade de grãos de pólen no estigma das flores. Após este processo as flores foram novamente protegidas com sacos de plano para evitar contaminação por outras espécies. As flores polinizadas foram etiquetadas, contendo o nome das espécies envolvidas. Uma vez os frutos amadurecidos, os mesmos foram coletados e observadas quanto à formação de sementes.

Resultados e Discussão

Os dados morfométricos empregados na determinação do formato e tamanho dos grãos de pólen estão disponíveis na Tabela 1. Os grãos de pólen são de tamanho médio, simetria radial, âmbito ovalado a esferoidal, 2-porados, subprolatos, exina eutectada, reticulada, heterobrocada, lumens variando de arredondados a poligonais, sem granulações (Figura 1e-g) conforme a nomenclatura empregada por Punt et al. 2007.

Das 371 flores polinizadas com quatro variedades botânicas e uma espécie, nenhuma produziu sementes, mesmo quando foi realizada autogamia e xenogamia (Tabela 2). Esta infertilidade pode ser resultado de uma barreira pré-zigótica, que pode estar relacionada com a baixa viabilidade do pólen, visto que a taxa de germinação *in vitro* foi em torno de $29,73 \% \pm 4,59 \%$ e (Figura 1d) e com carmim acético de $35,32 \% \pm 2,74 \%$ (Figura 1c). Vale destacar que podem haver causas adicionais relacionadas com outras barreiras.

Vervaeke et al. 2001, 2002a, 2002b trabalhando com diferentes espécies de bromélias observaram barreiras pré e pós-zigóticas como algumas anomalias no estilete principalmente na região basal; comprimento desigual do estilete e tudo polínico; morfologia e tamanho do grão de pólen; não germinação do grão de pólen sobre o estigma devido a hidratação insuficiente ou descontrolada ou a falta de nutrientes (principalmente cálcio e boro); ausência de fatores quimiotrópicos na região da micrópila; degeneração imatura do embrião e endosperma, além de outros fatores referentes a polinização como horário de maior receptividade do estigma e polinizadores.

Falhas na obtenção de híbridos F1 pode ser resultado da não fertilização ou aborto do embrião em diferentes estádios de desenvolvimento, desde as primeiras divisões embrionárias até a maturidade, devido à incompatibilidade de genes presentes no núcleo ou mesmo no citoplasma (Vervaeke et al. 2001). Estas falhas costumam ser classificadas como barreiras pré-zigóticas, as quais ocorrem pela incapacidade de germinação do grão de pólen no estigma, ou pela inibição do crescimento do tubo polínico no estilete (Vervaeke et al. 2002b).

Para o comprimento do tubo polínico foi verificado que a média observada foi de $1052,93 \mu\text{m} \pm 259,65 \mu\text{m}$, dados estes superiores aos observados para outras variedades botânicas de abacaxi (Soares et al. 2008b).

Tabela 1. Caracteres morfométricos dos grãos de pólen de *Ananas* sp. (BAG 197)

Dados da Acetólise Láctica		Medidas (μm)
Vista Equatorial	Diâmetro Polar	$34,13 \pm 2,12$
	Diâmetro Equatorial	$29,28 \pm 2,50$
Dados da exina através da MET		
Escultura		$1,00 \pm 0,10$
Sexina		$2,05 \pm 0,14$
Nexina		$0,52 \pm 0,10$
Exina		$3,52 \pm 0,13$

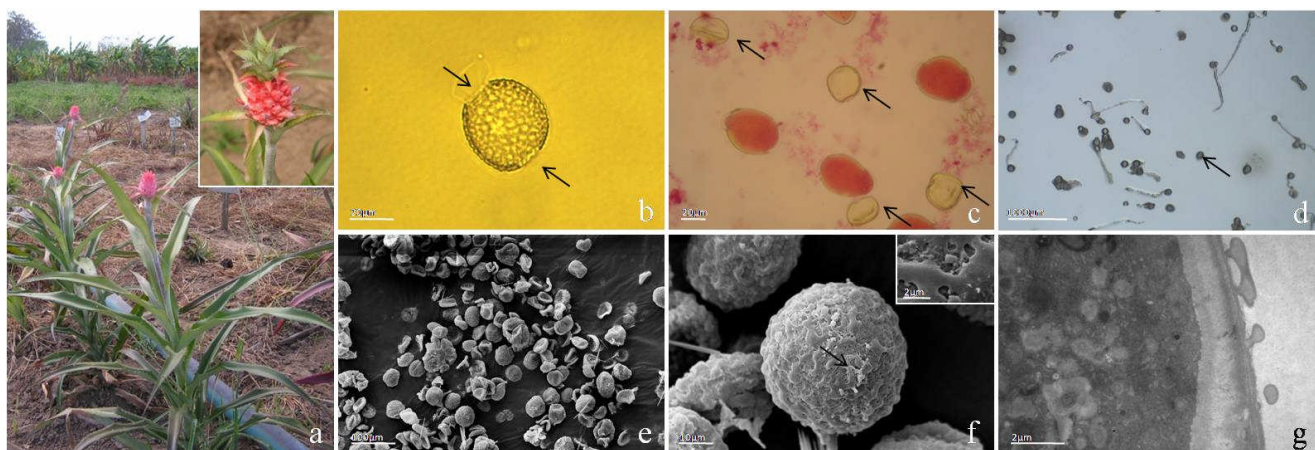


Figura 1. a) Acesso de *Ananas* sp. (BAG 197) com detalhe do fruto. b) grão de pólen acetolizado, mostrando os dois poros (setas). c) grãos de pólen corados com carmim acético, grãos inviáveis (seta). d) germinação dos grãos de pólen em meio SM, grãos inviáveis (seta). e) vista dos grãos de pólen em MEV. f) grão de pólen evidenciando o poro, detalhe da ornamentação. g) camadas da exina através da MET.

Tabela 2. Cruzamentos realizados no acesso *Ananas* sp. (BAG 197) com diferentes parentais.

Parental •	Parental •	Número de flores polinizadas	Número de sementes
Autogamia (autopolinização artificial)		37	0
Xenogamia (polinização entre flores de plantas diferentes)		41	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 25 - var. <i>ananassoides</i>	20	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 17 - var. <i>bracteatus</i>	16	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 739 - var. <i>erectifolius</i>	30	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 81 - <i>A. macrodontes</i>	24	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 232 - var. <i>ananassoides</i>	21	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 804 - var. <i>erectifolius</i>	35	0
BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	BAG 28 - var. <i>comosus</i>	17	0
BAG 123 - var. <i>bracteatus</i>	BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	38	0
BAG 25 - var. <i>ananassoides</i>	BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	18	0
BAG 28 - var. <i>comosus</i>	BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	29	0
BAG 804 - var. <i>erectifolius</i>	BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	22	0
BAG 81 - <i>A. macrodontes</i>	BAG 197 - <i>Ananas</i> sp.	23	0
Total de flores polinizadas		371	0

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsas de estudo e ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura, NAP/MEPA/Esalq/USP.

Referências

- Brewbaker JL e Kwack BH (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany** **50**: 859-865.
- Coppens D'eeckenbrugge G e Duval MF (2009) The domestications of pineapple: context and hypotheses. **Pineapple News** **16**: 15-26.
- Kearns CA and Inouye DW(1993) **Techniques for pollination biologist**. Niwot: University of Colorado 583p.
- Moreira BA, Cruz-Barro MAV e Wanderley MGL (2005) Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* l.b. sm. e *Nidularium* Lem. (Bromeliaceae) do Estado de São Paulo. **Acta Botânica Brasilica** **19**: 61-70.
- Punt W, Hoen PP, Blackmore S, Nilsson S e LE THOMAS A (2007) Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology** **143**:1-81.
- Raynal A e Raynal J (1979) Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia** **2**: 77-79.
- Sanewski GM (2009) Breeding *Ananas* for the cut-flower and garden markets. **Acta Horticulturae** **822**: 71-78.
- Soares TL, Silva SO, Costa MAPC, Serejo JAS, Souza AS, Souza EH e Jesus ON (2008a) *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** **8**: 111-118.
- Soares TL, Souza EH, Souza FVD, Souza AS, Costa MAPC (2008b) Germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de pólen em diferentes acessos de abacaxi ornamental. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 20. 2008. Vitória: INCAPER: Sociedade Brasileira de Fruticultura.
- Souza EH (2010) Pré-melhoramento e avaliação de híbridos de abacaxi e banana para fins ornamentais. 2010. **Dissertação de Mestrado** (Ciências Agrárias) Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 158p.
- Souza FVD, Cabral JRS, Souza EH, Ferreira FR e Silva MJ (2009) Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. *ananassoides* and *Ananas comosus* var. *erectifolius*. **Acta Horticulturae** **822**: 79-84.
- Vervaeke I, Parton E, Deroose R e De Proft MP (2001) Prefertilization barriers between different Bromeliaceae. **Euphytica** **118**:91-97.
- Vervaeke I, Parton E, Deroose R e De Proft MP (2002a) Pollen tube growth and fertilization after different *in vitro* pollination techniques of *Aechmea fasciata*. **Euphytica** **124**:75-83.
- Vervaeke I, Parton E, Deroose R e De Proft MP (2002b) Controlling prefertilization barriers by *in vitro* pollination and fertilization of Bromeliaceae. **Acta Horticulturae** **572**:21-28.