

# GERMINAÇÃO *IN VITRO* E ARMAZENAMENTO DO PÓLEN DE *Eugenia involucrata* DC (MYRTACEAE)<sup>1</sup>

RODRIGO CEZAR FRANZON<sup>2</sup> & MARIA DO CARMO BASSOLS RASEIRA<sup>3</sup>

**RESUMO** - O objetivo do presente trabalho foi o de estabelecer condições adequadas para testes de germinação *in vitro* do pólen de cerejeira-do-rio-grande (*Eugenia involucrata* DC), bem como verificar a possibilidade de armazená-lo em freezer (-16,5°C). O pólen foi coletado de flores em estágio de balão e logo após a antese. Os meios de cultura testados foram o meio padrão (10% de açúcar e 1% de ágar em água destilada) e este acrescido de duas concentrações de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,65mM e 1,3mM). Foram testadas as temperaturas de incubação de 25 e 30°C. O período de incubação foi de três horas, para todos os tratamentos. A incubação a 25°C, em meio de cultura-padrão, proporcionou boas médias (61,4%) de germinação *in vitro*. Pólen coletado de flores após a antese apresentou maiores porcentagens de germinação. O boro não influenciou na germinação média do pólen. O pólen de cerejeira-do-rio-grande manteve sua viabilidade (60,0%) após 90 dias de armazenamento a -16,5°C. Entretanto, após 220 e 280 dias, esta foi reduzida para 40,6% e 24,2% e, após 530 dias, houve perda total de viabilidade.

**Termos para Indexação:** Myrtaceae, viabilidade de pólen, armazenamento, boro.

## *IN VITRO* POLLEN GERMINATION OF RIO-GRANDE-CHERRY (*Eugenia involucrata* DC)

**ABSTRACT** - The objective of the present work was to determine a suitable medium and conditions for *in vitro* germination of Rio-Grande-Cherry (*Eugenia involucrata* DC) pollen. Possibility of storage in freezer (-16,5°C) was also studied. The pollen was collected from flowers at balloon stage and right after anthesis. The tested media were: the standard (10% sucrose, plus 1% agar dissolved in distilled water), and the addition of two H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.65mM and 1.3mM) to this medium. Temperatures of incubation of 25 and 30°C were tested. Independent of the treatment the incubation period was three hours. Incubation at 25°C in the standard medium provided good germination (61.4%). Boron did not influence the pollen germination. Pollen collected from flowers right after anthesis showed high germination percentage. The Rio-Grande-Cherry pollen conserved the viability (60.0%) after 90 days of storage at -16,5°C. However, after 220 and 280 days it was reduced to 40.6% and 24.2% and, after 530 days, there was total loss of viability.

**Index Terms:** Myrtaceae, pollen viability, storage, boron.

## INTRODUÇÃO

A cerejeira-do-rio-grande (*E. involucrata* DC.), da família Myrtaceae, é nativa do Sul do Brasil, ocorrendo desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (Donadio et al., 2002). Esta espécie tem potencial para aproveitamento comercial, e seu fruto pode ser consumido *in natura*, ou ser utilizado para o processamento na forma de doces, geléias e sucos. Além disso, pode ser utilizada como planta ornamental, tendo em vista sua bonita forma e aparência.

A Embrapa Clima Temperado (CPACT), em Pelotas-RS, mantém um Banco Ativo de Germoplasma de espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil. Futuramente, o objetivo é iniciar o melhoramento genético destas espécies. Neste sentido, um dos pontos importantes a ser estudado refere-se ao pólen. Até o momento, para a maioria delas, não são conhecidas as condições adequadas para testes de viabilidade.

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado em testes de viabilidade do pólen em programas de melhoramento genético (Marcellán & Camadro, 1996). Entretanto, este método é influenciado por diferentes fatores. Existem diferenças entre espécies quanto às condições exigidas para a germinação do pólen, envolvendo, principalmente, os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação. Além disso, a viabilidade do pólen também é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da flor, quando da coleta do pólen, e pelas condições de armazenamento (Stanley & Linskens, 1974).

O meio básico usado nestes testes é constituído de açúcar e de ácido bórico (Miranda & Clement, 1990), podendo variar ainda a combinação de outros nutrientes (Galletta, 1983). O açúcar promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, e fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974). Já o boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade de estes se romperem.

Em pesquisa de literatura, para espécies nativas do Sul do Brasil, apenas alguns estudos com pólen de araçazeiro (*Psidium cattleyanum*) foram encontrados (Hirano & Nakasone, 1969; Raseira &

Raseira, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi o de estabelecer condições adequadas para testes de viabilidade do pólen de cerejeira-do-rio-grande, 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, de plantas do Banco Ativo de Germoplasma de frutíferas nativas da Embrapa Clima Temperado – CPACT, no município de Pelotas-RS, na floração de 2003.

As anteras foram destacadas e colocadas para secar em bandejas de papel, à temperatura ambiente (20 a 25°C), por três dias, até que o pólen estivesse seco. Parte do pólen foi utilizado nos testes iniciais, e o restante foi armazenado em freezer, à temperatura de -16,5°C (±1,5°C) e baixa umidade relativa do ar, mantidas em dessecador com sílica como substância higroscópica.

Foram testados os seguintes meios de cultura para germinação *in vitro* do pólen de cerejeira-do-rio-grande, coletado nas fases de balão e após antese:

1. 10% de açúcar + 1% de ágar (testemunha – meio de cultura padrão utilizado em testes de rotina no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal do CPACT);
2. 10% de açúcar + 1% de ágar + 0,65mM de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>);
3. 10% de açúcar + 1% de ágar + 1,3mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

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.

<sup>1</sup> (Trabalho 120/2005). Recebido: 16/08/2005. Aceito para publicação: 23/02/2006.

<sup>2</sup> Engº Agrº, M.Sc., Aluno do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. Bolsista CAPES. E-mail: rcfrazon@hotmail.com

<sup>3</sup> Engº Agrº, Ph.D., Pesquisador Embrapa Clima Temperado – CPACT, Cx.P. 403, CEP: 96001-970, Pelotas, RS. E-mail: bassols@cpact.embrapa.br

O pólen foi aspergido sobre o meio de cultura, e as lâminas foram colocadas em câmara úmida simulada (placas de Petri com papel absorvente umedecido) e levadas para incubação em estufa tipo BOD, nas temperaturas constantes de 25 ou 30°C. Decorridas três horas de incubação, na ausência de luz, foi realizada a contagem da porcentagem de grãos de pólen germinados, sob microscópio óptico binocular, 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 o completamente casualizado, em arranjo fatorial 2x3x2, sendo dois estágios de desenvolvimento das flores (balão e após antese) no momento da coleta do pólen, três meios de cultura e duas temperaturas de incubação (25 e 30°C), com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $p=0,05$ ). Para a análise, os dados de porcentagem foram transformados para  $arc-sen(\sqrt{x/100})$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes iniciais, a porcentagem de germinação *in vitro* de pólen de cerejeira-do-rio-grande coletado de flores após a antese foi maior em relação àquele coletado de flores em estágio de balão (Tabela 1). A germinação média do pólen não diferiu nos diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação testados. Não houve interação significativa entre os diferentes fatores estudados.

Após três horas de incubação, o comprimento dos tubos polínicos apresentou mais de 30 vezes o diâmetro do grão de pólen, e a porcentagem média de germinação foi alta (58,3%), indicando que esse período é suficiente para testar a viabilidade de pólen desta espécie através da germinação *in vitro*, uma vez que se considera germinado aquele que apresentar tubo polínico igual ou superior ao seu próprio diâmetro.

**TABELA 1** - Porcentagem de germinação *in vitro* de pólen de cerejeira-do-rio-grande, coletado em dois estágios de desenvolvimento da flor.

Origem do pólen	Médias de germinação* (%)
Flor em estágio de balão	46,7 b <sup>1</sup>
Flor após antese	69,5 a
<b>Meio de cultura</b>	ns
10g açúcar	61,4
10g açúcar + 0,65mM H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	57,7
10g açúcar + 1,3mM H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	55,9
<b>Temperatura de incubação</b>	ns
25°C	59,7
30°C	57,0
<b>Média geral</b>	58,3%
<b>Coefficiente de variação</b>	8,47%

<sup>1</sup> médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Duncan ( $p=0,05$ ); ns = não significativo pelo teste de Duncan ( $p=0,05$ ); \* avaliado após três horas de incubação, na ausência de luz.

**TABELA 2** - Porcentagem de germinação *in vitro* de pólen de cerejeira-do-rio-grande, coletado em dois estágios de desenvolvimento da flor, em diferentes períodos após o armazenamento em freezer (-16,5°C).

Períodos de armazenamento (dias)	Médias de germinação (%) <sup>1*</sup>		
	Origem do pólen		Média
	Flor após antese	Flor em estágio de balão	
00	70,9 a A	48,0 a B	59,5 a
90	68,6 a A	51,3 a B	60,0 a
220	43,0 b A	38,2 b B	40,6 b
280	28,7 c A	19,7 c B	24,2 c
530	0,0 d A	0,0 d A	0,0 d
<b>Média</b>	42,2 A	31,4 B	
<b>Coefficiente de variação</b>	10,14%		

<sup>1</sup> médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si, pelo teste de Duncan ( $p=0,05$ ); \* avaliado após três horas de incubação, na ausência de luz.

Entretanto, períodos de incubação maiores, desde quatro até 13 horas de incubação, foram observados para o pólen de araçazeiro (Hirano & Nakasone, 1969; Teatota et al., 1970; Raseira & Raseira, 1996). Avaliando o pólen de duas cultivares de macieira, Nunes et al. (2001) observaram que duas horas de incubação não foram suficientes para germinação *in vitro*, sendo necessário um período de cinco horas. Estas referências confirmam 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.

Não houve diferenças entre as porcentagens de germinação nas temperaturas de incubação de 25 e 30°C, indicando que ambas podem ser utilizadas para testes de germinação *in vitro* de pólen de cerejeira-do-rio-grande.

Temperaturas de incubação em torno de 25°C são citadas em literatura para diversas espécies. Thompson & Batjer (1950) usaram 24°C para pólen de ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira. Loupassaki et al. (1997) afirmam que 25°C é a ideal para germinação de pólen de abacateiro, e Nunes et al. (2001) utilizaram esta mesma temperatura para macieira.

O pólen de cerejeira-do-rio-grande manteve a viabilidade (60% de germinação média) após 90 dias de armazenamento a -16,5°C (Tabela 2). Entretanto, após 220 e 280 dias, a porcentagem de germinação reduziu-se para 40,6% e 24,2%, respectivamente, e, após 530 dias, houve perda total da viabilidade. Novamente a adição de H<sub>3</sub>Bo<sub>3</sub> ao meio de cultura não influenciou na porcentagem de germinação do pólen.

A germinação média de pólen coletado de flores após antese foi maior em relação à de pólen coletado de flores em estágio de balão, em todos os períodos de avaliação, exceto aos 530 dias de armazenamento, onde não houve germinação do pólen (Tabela 2).

A maturação do pólen é um dos estágios 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 deiscência da mesma (Lin & Dickinson, 1984), desde que encontre 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 capacidade de germinar quando for realizada a hibridação.

Diferenças ainda maiores do que as aqui encontradas foram obtidas por Luza & Polito (1985), em noz inglesa. Pólen coletado de flores um a dois dias antes da antese apresentou 0,6% de germinação, contra 45,2% de pólen originário de flores após a antese.

Embora o pólen coletado de flores logo após a antese tenha apresentado maiores porcentagens de germinação, deve-se tomar alguns cuidados durante a coleta do mesmo, para ter a garantia de que o pólen a ser utilizado em hibridações, em programas de melhoramento genético, seja puro, sem contaminação por outras fontes de pólen. 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 um lugar abrigado, mantendo-os em frascos com água para evitar a desidratação e permitir que as flores abram

normalmente, procedendo-se então a coleta do pólen.

O pólen de cerejeira-do-rio-grande manteve sua viabilidade até os 90 dias de armazenamento em freezer ( $-16,5^{\circ}\text{C}$ ). Entretanto, a partir dos 220 dias, houve perda significativa de viabilidade. 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.

Lee et al. (1981) relatam que a germinação de pólen de diversas cultivares de ameixeira manteve-se por mais de três anos quando armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; entretanto, a  $-1^{\circ}\text{C}$ , a viabilidade reduziu-se drasticamente antes dos 11 meses de armazenamento. Para o pólen de araçazeiro, Raseira & Raseira (1996) observaram considerável perda de viabilidade após 21 dias de armazenamento, nas mesmas condições testadas no presente trabalho para cerejeira-do-rio-grande.

### CONCLUSÕES

1. O pólen de cerejeira-do-rio-grande apresentou boa viabilidade, com germinação inicial média de 58,3%.
2. A viabilidade do pólen de *Eugenia involucrata* pode ser avaliada adequadamente através da germinação *in vitro*, em meio de cultura constituído por 10% de açúcar e 1% de ágar, dissolvidos em água destilada, três horas após a inoculação, e incubação à temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C}$ .
3. O período ideal para coleta de pólen de *E. involucrata* é logo após a antese.
4. O armazenamento de pólen de *E. involucrata* pode ser realizado satisfatoriamente por até 220 dias quando mantido em freezer ( $-16,5^{\circ}\text{C}$ ). Houve redução significativa depois deste período.

### REFERÊNCIAS

- DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 2002. 288p.
- GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. cap.3, p.23-47.
- HIRANO, R.T.; NAKASONE, H.Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount-Vernon, v.94, n.2, p.83-86, 1969.
- LEE, C.L.; BÜNEMANN, G.; HERMANN, S. Long-term storage of plum pollen. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.46, p.69-72, 1981.
- LIN, J.J.; DICKINSON, D.B. Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination. **Plant Physiology**, Bathesda, v.74, p.746-748, 1984.
- LOUPASSAKI, M.; VASILAKAKIS, M.; ANDROULAKIS, I. Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains. **Euphytica**, Wageningen, v.94, p.247-251, 1997.
- LUZA, J.G.; POLITO, V.S. *In vitro* germination and storage of english walnut pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.27, p.303-316, 1985.
- MARCELLÁN, O.N.; CAMADRO, E.L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 67, p.101-104, 1996.
- MIRANDA, P.A.; CLEMENT, C.R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v.38, n.01, p.29-33, 1990.
- NUNES, J.C.O.; DANTAS, A.C.M.; PEDROTTI, E.L.; ORTH, A.I.; GUERRA, M.P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.
- RASEIRA, M. do C.B. e RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum***. Pelotas-RS: EMBRAPA/CPACT, 1996. 95p.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen biochemistry management**. Berlin: Springer Verlag, 1974. 307p.
- TEAOTIA, S.S.; PHOGOT, K.P.S.; SRISVATAVA, V.S. Blossom biology studies in *Psidium* species. **Progressive Horticulture**, Uttar Pradesh, v.2, n.3, p.101-112, 1970.
- THOMPSON, A.H.; BATJER, L.P. 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**, Mount Vernon, v.56, p.227-230, 1950.