

Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

Rodrigo Cezar Franzon^{1*}, Maria do Carmo Bassols Raseira² e Américo Wagner Júnior³

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia, Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Cx. Postal 354, 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Embrapa Clima Temperado, Centro Agropecuário de Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. ³Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: rcfrazon@hotmail.com

RESUMO. O objetivo do presente trabalho foi verificar qual o meio de cultura e quais as condições que deveriam ser utilizadas em testes de germinação *in vitro* do pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora*), bem como verificar a possibilidade de armazenamento em freezer (-18°C). O pólen foi coletado de flores em estágio de balão e logo após a antese, em duas populações desta espécie, na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, Rio Grande do Sul. Os meios de cultura testados foram o padrão (testemunha) (10% de açúcar e 1% de ágar em água destilada) e este acrescido de duas concentrações de H₃BO₃ (0,65 mM e 1,3 mM). Foram testadas as temperaturas de incubação de 20, 25 e 30°C. Cinco horas a 25°C, em meio de cultura básico, proporcionou as melhores médias de germinação *in vitro*. O boro não influenciou a germinação média de pólen de pitangueira. O pólen apresentou grande perda de viabilidade após 105 dias de armazenamento em freezer.

Palavras-chave: Myrtaceae, viabilidade de pólen, armazenamento, meio de cultura, boro.

ABSTRACT. *In vitro* germination and storage of Surinam cherry pollen (*Eugenia uniflora* L.). The objective of the present work was to check the best medium and conditions for *in vitro* germination of pollen of Surinam cherry (*Eugenia uniflora*). Possibility of storage in freezer was also studied. The pollen was collected from flowers at balloon stage and immediately after anthesis in two populations of this species at Embrapa Clima Temperado Research Center, Pelotas, of state Rio Grande do Sul, Brazil. The tested media were the standard (10% sugar, plus 1% agar dissolved in distilled water), and the addition of two H₃BO₃ concentrations (0.65 mM and 1.3 mM) to this medium. Incubation temperatures of 20, 25 and 30°C were tested. The best germination percentage was achieved after five hours incubating at 25°C. Boron did not influence the pollen germination of Surinam cherry. The pollen lost viability after 105 days of storage in freezer.

Key words: Myrtaceae, pollen viability, storage, culture media, boron.

Introdução

A pitangueira (*E. uniflora* L.), mirtácea nativa do sul do Brasil, é uma frutífera com potencial para exploração econômica. O nome indígena é do tupi *pi'tág*, que significa vermelho, em alusão à cor dos frutos (Donadio *et al.*, 2002), os quais podem ser consumidos *in natura* ou na forma de geléias, doces, sucos, licor e sorvete, além de poderem ser misturados com outros sucos e bebidas lácteas.

A Embrapa Clima Temperado - CPACT, em Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, iniciou há alguns anos estudos com algumas espécies frutíferas nativas do sul do país, com a finalidade de, futuramente, introduzi-las em cultivos comerciais. Em pitangueira, o trabalho de seleção de genótipos, principalmente em relação às características de frutos, está em estágio avançado. Porém, para

maiores avanços faz-se necessário o início de um programa de melhoramento genético, em que um dos fatores importantes é o conhecimento da viabilidade do pólen a ser utilizado em hibridações. No entanto, não são conhecidas informações sobre as condições ideais para se testar esta viabilidade através da germinação *in vitro*.

Segundo Galletta (1983), existem quatro métodos para se estimar a viabilidade de pólen, que são: 1. testes de germinação *in vitro*; 2. avaliação com o uso de corantes; 3. testes de germinação *in vivo*, avaliando o crescimento do tubo polínico no estigma e/ou no pistilo e 4. a formação de sementes após polinização normal de um genitor feminino selecionado.

O uso de corantes é o método mais rápido e geralmente usado para verificar a viabilidade de pólen. Porém, este método pode superestimar

viabilidade, pois, muitas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ainda corar, por possuírem quantidade suficiente de enzimas, amido ou, ainda, outras substâncias. Já os dois últimos métodos são bastante trabalhosos, necessitando de maior tempo para se obter os resultados (Galletta, 1983). A germinação *in vitro* é o mais conveniente e seguro método usado para se testar a viabilidade de grãos de pólen e, segundo Marcellán e Camadro (1996), revela o verdadeiro estado das reservas, a condição das membranas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar. Este é, também, o método mais utilizado nos programas de melhoramento genético.

Entretanto, a germinação de pólen *in vitro* é influenciada por diferentes fatores, dentre eles o meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, o estágio de desenvolvimento da flor quando da coleta do pólen, as condições de armazenamento (Stanley e Linskens, 1974), além de existirem diferenças entre espécies e também entre cultivares da mesma espécie no que diz respeito às condições requeridas (Rosell *et al.*, 1999).

O meio básico usado nos testes de germinação *in vitro* é constituído de açúcar e de ácido bórico (Miranda e Clement, 1990), podendo variar ainda a combinação de outros nutrientes (Galletta, 1983). A adição de açúcar ao meio de cultura tem por objetivo o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, bem como fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley e Linskens, 1974). Já a presença de boro no meio estimula o crescimento do tubo polínico, sendo a resposta variável de acordo com a espécie. O boro interage com o açúcar formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (Pfähler, 1967). Segundo Luza e Polito (1985), pequenas quantidades de boro adicionado ao meio melhoram a germinação e o crescimento do tubo polínico e diminuem a probabilidade destes se romperem.

Para espécies frutíferas da família Myrtaceae nativas do sul do Brasil, como a pitangueira, existem poucos trabalhos sobre as condições ideais para testes de germinação de pólen *in vitro*. Em pesquisa de literatura, apenas alguns estudos com algumas espécies do gênero *Psidium*, incluindo o araçazeiro (*P. cattleianum*) foram encontrados (Hirano e Nakasone, 1969; Raseira e Raseira, 1996).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar qual o meio de cultura e quais as condições que deveriam ser utilizadas em testes de viabilidade do pólen de pitangueira, bem como verificar a possibilidade de armazenamento em freezer.

Material e métodos

Foram realizados testes de germinação *in vitro* de pólen de duas populações de pitangueira, existentes no Banco Ativo de Germoplasma de fruteiras nativas do sul do Brasil, na Embrapa Clima Temperado (CPACT), em Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. Essas populações têm origens diferentes: uma coletada em mata nativa (doravante identificadas como “população A”) e outra coletada na área urbana, em plantas de origem desconhecida e existentes há décadas em pátios residenciais ou de escolas (doravante identificadas como “população B”).

Para a “população B”, o pólen foi coletado de flores em estágio de balão e de flores logo após a antese, em setembro de 2003. Para a “população A”, o pólen foi coletado somente de flores em estágio de balão, em outubro de 2003. Em ambos os casos, as anteras foram destacadas e colocadas para secar em bandejas de papel, à temperatura ambiente (20 a 25°C), por três dias, quando então o pólen apresentou-se seco.

Em cada população, parte do pólen foi utilizado para teste de germinação e o restante foi mantido em dessecador com sílica como substância higroscópica e armazenado em congelador, à temperatura de -18 a -15°C e baixa umidade do ar. Aos 105 dias de armazenamento foi realizado novo teste de germinação *in vitro*.

Foram testados os seguintes meios de cultura para germinação *in vitro* de pólen:

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 + 0,65 mM de ácido bórico (H_3Bo_3);
3. 10% de açúcar + 1% de ágar + 1,3 mM de H_3Bo_3 .

Os constituintes do meio foram dissolvidos em água destilada. 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 21 mm de diâmetro e 3 mm de altura), em substituição às lâminas escavadas. Na avaliação dos resultados, cada anel de PVC, em cada uma das lâminas, representou uma repetição.

As lâminas, já com o pólen polvilhado sobre o meio de cultura, foram colocadas em câmara úmida simulada (placas de Petri com papel absorvente umedecido) e levadas para incubação em estufa tipo BOD com temperatura controlada. Para o pólen da “população B” foram testadas as temperaturas de incubação de 20, 25 ou 30°C ($\pm 1^\circ C$), enquanto que

para a “população A” foram testadas as temperaturas de 25 e 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Nos testes iniciais, foram realizadas contagens três horas e cinco horas após a aspersão no meio e, nos testes após o armazenamento, somente após cinco horas, baseado nos resultados obtidos previamente.

O delineamento estatístico foi o completamente casualizado, em arranjo fatorial, com quatro repetições. Para análise, os dados foram transformados para *arco seno* ($\sqrt{x/100}$), submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p = 0,05$).

Foi contado um total de 100 grãos de pólen por parcela, considerando-se germinados aqueles que apresentavam o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

Resultados e discussão

Para o pólen de pitangueira da “população B”, a germinação média à temperatura de 25°C e 30°C na incubação foi superior à de 20°C, e foi maior para o pólen coletado de flores logo após a antese. A germinação média aumentou após cinco horas de incubação (Tabela 1). Entretanto, o meio de cultura não influenciou na germinação média do pólen e não houve interação significativa entre os fatores estudados.

Tabela 1. Percentagem média de germinação *in vitro* de pólen de pitangueira (“população B”), coletado em dois estádios de desenvolvimento da flor, em diferentes meios de cultura, e temperaturas e tempos de incubação, antes do armazenamento.

Meio de cultura	Médias de germinação (%) ¹
10 g açúcar	19,2 ^{ns}
10 g açúcar + 0,65 mM H ₃ Bo ₃	18,5
10 g açúcar + 1,3 mM H ₃ Bo ₃	21,0
Temperatura de incubação (°C)	
20	13,9 b
25	22,6 a
30	22,8 a
Origem do pólen	
Flor em estádio de balão	16,5 b
Flor após antese	22,9 a
Tempo de incubação (horas)	
3	17,2 b
5	22,1 a
Coeficiente de variação	17,59%

¹ médias seguidas por letras distintas nas colunas, dentro de cada fator de variação, diferem entre si pelo teste de Duncan ($p = 0,05$). ns = não significativo pelo teste de Duncan ($p = 0,05$).

Para o pólen da “população A”, os diferentes meios de cultura e temperaturas testadas (25 e 30°C) também não influenciaram na germinação média e não houve interação significativa entre os fatores estudados. Novamente a germinação média aumentou após cinco horas de incubação (Tabela 2).

O tempo de incubação necessário para iniciar a germinação *in vitro* varia de acordo com a espécie, ou

até mesmo entre cultivares da mesma espécie. No presente trabalho, além da percentagem de germinação do pólen das duas populações estudadas ter sido relativamente baixa, os tubos polínicos apresentavam comprimento reduzido, aproximadamente quatro a cinco vezes o tamanho do grão de pólen, após três horas de incubação. Após cinco horas, o tamanho dos tubos polínicos aumentou consideravelmente e estes apresentavam em torno de 20 vezes o comprimento do grão de pólen. Considera-se germinado aquele que apresentar tubo polínico igual ou superior ao seu próprio diâmetro. A percentagem de germinação também aumentou, entretanto, em pequena escala.

Tabela 2. Percentagem média de germinação *in vitro* de pólen de pitangueira (“população A”), coletado de flores em estádio de balão, após 3 e 5 horas de incubação, antes do armazenamento.

Meio de cultura	Médias de germinação (%) ¹
10 g açúcar	30,7 ^{ns}
10 g açúcar + 0,65 mM H ₃ Bo ₃	29,1
10 g açúcar + 1,3 mM H ₃ Bo ₃	27,8
Temperatura de incubação (°C)	
25	29,9 ^{ns}
30	28,5
Tempo de incubação (horas)	
3	27,7 b
5	30,7 a
Coeficiente de variação	8,02%

¹ médias seguidas por letras distintas nas colunas, dentro de cada fator de variação, diferem entre si pelo teste de Duncan ($p = 0,05$). ns = não significativo pelo teste de Duncan ($p = 0,05$).

Raseira e Raseira (1996), avaliando a germinação de pólen de araçazeiro (*P. cattleyanum* Sabine), determinaram como condição ideal um período de incubação de quatro a seis horas a 25°C. Já Teatota *et al.* (1970) citam que o tubo polínico desta mesma espécie aparece 13 horas após inoculação no meio de cultura. Um período mais prolongado também foi utilizado por Hirano e Nakasone (1969). Estes avaliaram a germinação de pólen de diferentes espécies do gênero *Psidium* aproximadamente 12 horas após inoculação no meio.

Neves *et al.* (1997), testando a viabilidade do pólen *in vitro* de duas frutíferas nativas da Amazônia, verificaram que a germinação, em meio líquido, do pólen de cubiuzeiro iniciou-se após cinco horas de incubação, enquanto que para o cupuaçuzeiro, somente após 20 horas.

No presente trabalho, não houve diferenças entre as médias de germinação nas temperaturas de incubação de 25 e 30°C, para o pólen das duas populações estudadas. Entretanto, a 20°C, o pólen da “população B” apresentou menores médias de germinação em relação às temperaturas citadas anteriormente (Tabela 1).

Temperaturas de incubação em torno de 25°C são citadas em literatura para uma grande quantidade

de espécies. Thompson e Batjer (1950) usaram 24°C para pólen de ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira. Hall e Farmer Jr. (1971) usaram 27°C para noz inglesa. Loupassaki *et al.* (1997) afirmam que 25°C é a ideal para germinação de pólen de abacateiro. Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que a temperatura de 25°C é apropriada para testes de germinação *in vitro* de pólen de pitangueira.

Em relação ao meio de cultura, o boro, adicionado na forma de ácido bórico (H_3BO_3), nas condições estudadas, não se mostrou fator limitante para a germinação *in vitro* de pólen das duas populações de pitangueira, não ocorrendo diferenças significativas na percentagem de germinação nos diferentes meios de cultura testados (Tabelas 1 e 2).

Da mesma forma, Neves *et al.* (1997) não encontraram diferenças na germinação *in vitro* de pólen de duas espécies frutíferas da Amazônia, na presença de 1,63 mM H_3BO_3 ou na ausência deste no meio. Entretanto, segundo Luza e Polito (1985), pequenas quantidades de boro adicionadas ao meio melhoram a germinação e o crescimento do tubo polínico e diminuem a probabilidade destes estourarem. Além disso, um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos (Galletta, 1983). Baseados nesses fatores, Silva *et al.* (1999) supõem que este equilíbrio seja determinado pela relação entre a concentração de sacarose e de outras substâncias, dentre elas o ácido bórico. Estes autores, em testes de germinação de pólen de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), encontraram as melhores médias nas concentrações de 1,63 e 3,25 mM de H_3BO_3 adicionado ao meio de cultura.

Em relação ao estágio de desenvolvimento da flor, verificou-se que a germinação média *in vitro* do pólen da “população B” foi maior para aquele coletado de flores após a antese (22,9%), em relação ao coletado de flores em estádios de balão (16,5%) (Tabela 1).

Diferenças ainda maiores do que as aqui encontradas foram obtidas por Luza e 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.

De acordo com Lin e Dickinson (1984), a maturação do pólen é um dos estádios de desenvolvimento no ciclo de vida das plantas. A germinação deste não ocorre dentro da antera, mas deve estar pronto para germinar logo após a deiscência da mesma, 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.

Embora o pólen coletado de flores logo após a antese tenha apresentado maiores médias de germinação, devem ser tomados alguns cuidados durante a coleta do mesmo. 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 uma sala ou laboratório, ou ainda qualquer 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 das duas populações de pitangueira se comportou de maneira diferente depois de armazenado em freezer. Aos 105 dias de armazenamento, o pólen da “população A” apresentou perda quase total de viabilidade (Tabela 3), enquanto que o pólen da “população B” apresentou perda parcial (Tabela 4). Entretanto, aos 180 dias de armazenamento este último também apresentou perda quase total, tanto para aquele coletado de flores após a antese quanto para aquele de flores em estádios de balão. Novamente, o meio de cultura não influenciou na germinação do pólen das duas populações (dados não apresentados).

Tabela 3. Percentagem média, geral, de germinação *in vitro* de pólen de pitangueira (“população A”), coletado de flores em estágio de balão, aos 0 e 105 dias de armazenamento.

Período de armazenamento (dias)	Médias de germinação (%) ¹
0	31,1 a ²
105	3,2 b
Coeficiente de variação	
	9,40%

¹ médias de germinação obtidas após 05 horas de incubação a 25°C. ² médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si pelo teste F (p = 0,05).

Tabela 4. Percentagem média, geral, de germinação *in vitro* de pólen de pitangueira (“população B”), ao zero, 105 e 180 dias de armazenamento em freezer, e coletado em dois estádios de desenvolvimento da flor

Período de armazenamento ² (dias)	Médias de germinação (%) ¹	
	Origem do pólen ²	
	Flor em estágio de balão	Flor após antese
0	20,6 a B	28,4 a A
105	16,1 b A	16,3 b A
180	2,0 c B	6,0 c A
Coeficiente de variação		
	17,56%	

¹ médias de germinação obtidas após cinco horas de incubação a 25°C. ² médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Duncan (p = 0,05).

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.

Raseira e Raseira (1996), trabalhando com pólen de duas populações de araçazeiro (*Psidium cattleianum*), pertencente à mesma família da pitangueira, observaram considerável perda de viabilidade do pólen após somente 21 dias de armazenamento, nas mesmas condições aqui testadas.

Os testes de germinação de pólen para a pitangueira devem continuar, principalmente no que diz respeito às condições de armazenamento, pois é necessário que o pólen se mantenha viável por períodos maiores do que aqueles aqui testados.

Conclusão

A viabilidade do pólen de pitangueira pode ser avaliada por germinação *in vitro* em meio de cultura padrão (10% de sacarose + 1% de ágar, dissolvidos em água destilada), cinco horas após a inoculação e incubação à 25 ou 30°C.

Não é possível a conservação do pólen de pitangueira em freezer (-18 a -15°C), nas condições testadas, por longos períodos.

Novas condições de armazenamento de pólen devem ser testadas para esta espécie.

Referências

- DONADIO, L.C. *et al.* *Frutas brasileiras*. Jaboticabal: Ed. Novos Talentos, 2002.
- GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Ed.). *Methods in fruit breeding*. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.
- HALL, G.C.; FARMER JR., R.E. *In vitro* germination of black walnut pollen. *Can. J. Bot.*, Ottawa, v. 49, p. 799-802, 1971.
- HIRANO, R.T.; NAKASONE, H.Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus. *Psidium*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, Mount-Vernon, v. 94, n. 2, p. 83-86, 1969.
- LIN, J.J.; DICKINSON, D.B. Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination.

Plant Physiol., Bethesda, v. 74, p. 746-748, 1984.

LOUPASSAKI, M. *et al.* 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. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 27, p. 303-316, 1985.

MARCELLÁN, O.N.; CAMADRO, E.L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 67, p. 101-104, 1996.

MIRANDA, P.A.; CLEMENT, C.R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. *Rev. Biol. Trop.*, San Jose, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.

NEVES, T.S. *et al.* Efeito de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. *Rev. Bras. Fruticult.*, Cruz das Almas, v. 19, n. 2, p. 207-211, 1997.

PFAHLER, P.L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium e boron effects. *Can. J. Bot.*, Toronto, v. 45, p. 839-845, 1967.

RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. *Contribuição ao estudo do araçazeiro, Psidium cattleianum*. Pelotas: Embrapa/CPACT, 1996.

ROSELL, P. *et al.* Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *In vivo* characterization and optimization of *in vitro* germination. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 81, p. 251-265, 1999.

SILVA, M.M. da *et al.* Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. *Pesq. Agropecu. Bras.*, Brasília, v. 34, n. 3, p. 347-352, 1999.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. *Pollen - biology, biochemistry and management*. New York: Springer-Verlag, 1974.

TEAOTIA, S.S. *et al.* 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. *Proceed. Am. Soc. Hortic. Sci.*, Mount Vernon, v. 56, p. 227-230, 1950.

Received on August 17, 2005.

Accepted on August 21, 2006.