

Germinação *in vitro* de pólen de *Portulaca* sp – testes preliminares.

Lattuada, Daiane S.¹; Fior, Claudimar S.²; Rodrigues, Lia Rosane³

¹Graduanda em Agronomia, Estagiária no Banco de Sementes do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (JB/FZB-RS). daiane.lattuada@via-rs.net. ²Eng. agrônomo, coordenador do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do JB/FZB-RS. culturadetecidos@fzb.rs.gov.br. ³Pesquisadora da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária. Caixa postal 44, Veranópolis, RS, CEP 93550-000. liarr@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A família Portulacaceae possui inúmeras espécies com centro de origem na América do Sul. Entre as mais conhecidas encontra-se *Portulaca oleraceae*, com propriedades medicinais, e *P. grandiflora*, com emprego ornamental (Lorenzi & Matos, 2002).

Em março de 2006, exemplares de uma espécie ou variedade botânica do gênero *Portulaca* foram encontrados vegetando sob sol pleno em solo arenoso no município de São Francisco de Assis por profissionais do JB/FZB-RS. Devido à rara ocorrência e ao excelente aspecto ornamental (Figura 1A), uma planta foi coletada e submetida à propagação vegetativa, uma vez que a produção de sementes foi baixíssima nas condições ambientais do JB/FZB-RS. Atualmente, exemplares estão sendo estudados quanto a aspectos taxonômicos (identificação da espécie ou variedade), fitotécnicos (adubação e condução em vasos) e embriológicos (viabilidade do pólen, germinação de sementes e identificação do sistema de reprodução).

A produção de pólen viável é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas e fornece informações básicas para a conservação das espécies e o planejamento de um programa de melhoramento genético. A determinação da viabilidade do pólen pode ser feita por métodos diretos, tal como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro*, e métodos indiretos, baseados na reação a corantes e fluorocromos (Shivanna & Johri, 1985; Dafni, 1992; Shivanna & Rangaswamy, 1992; Kearns & Inouye, 1993).

Assim, foram executados estudos envolvendo a germinação do pólen *in vitro*, com o objetivo de contribuir ao conhecimento da biologia reprodutiva de *Portulaca* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

No Banco de Sementes do JB/FZB-RS, oitenta plantas obtidas por propagação clonal a partir de um exemplar coletado em São Francisco de Assis, foram estabelecidas individualmente em vasos e dispostas ao ar livre. O florescimento teve início logo após o estabelecimento em vasos (fevereiro de 2007) e continuou até meados de maio de 2007.

Material herborizado foi encaminhado para identificação pela Dra Alexa Paes Coelho da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Germinação de pólen *In vitro*:

Teste I.

Em final de abril de 2007, flores recém-abertas foram colhidas e os grãos de pólen foram estabelecidos em meio básico {0,1g L⁻¹ H₃BO₃, 0,25g L⁻¹ Ca(NO₃), 6g L⁻¹ de ágar, pH 6,0} com variação na concentração de sacarose: 50, 100 e 150g L⁻¹. Cada tratamento teve três repetições com avaliação de cinco campos por repetição, ao estereomicroscópio.

Teste II.

Em início de maio de 2007, grãos de pólen de flores recém-abertas e de botões florais com comprimento 14 mm foram estabelecidos em meio básico idêntico ao teste I com variação na concentração de sacarose: 150, 175 e 200 g L⁻¹. Cada combinação de tratamentos (tamanho de flor e concentração de sacarose) teve três repetições.

Em ambos os testes utilizou-se temperatura constante de 25°C com avaliações sob estereomicroscópio (64x), após 3 e 6h *in vitro*. Foram contabilizados os grãos de pólen germinados (com comprimento de tubo polínico duas vezes superior ao diâmetro do pólen),

colapsados e inalterados. A contagem foi feita em campos tomados ao acaso, totalizando uma média de 170 observações por tratamento.

Testes de Coloração:

Teste III.

Ao estereomicroscópio, anteras foram excisadas de dez botões florais frescos com 11 e 14 mm de comprimento, e maceradas em azul de algodão (AA) (Vizintin & Bohanec, 2004) sobre lâmina para microscopia, de acordo com a técnica modificada por Hauser e Morrison (1964). Grãos de pólen com reação positiva e negativa ao AA foram contabilizados ao estereomicroscópio no aumento 64x.

Teste IV.

Botões florais com 9, 11 e 14 mm de comprimento foram selecionados e imersos em fixador Farmer e armazenados em congelador. Para preparação de lâminas, anteras dos botões foram excisadas e divididas em dois grupos sobre a mesma lâmina. Uma parte das anteras de cada botão foi corada com carmim propiônico 0,6% e a outra parte com reagente de Alexander (Alexander, 1980). As anteras foram cobertas com lamínulas e seladas com tinta esmalte transparente. Grãos de pólen com reação positiva e negativa foram contabilizados ao microscópio óptico em campo claro, totalizando uma média de 250 observações por lâmina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado para estudo da viabilidade do pólen em programas de melhoramento genético. Entretanto, a germinação é influenciada por diferentes fatores, como os constituintes do meio, a temperatura, o tempo de incubação e o estágio de desenvolvimento do pólen (Shivanna & Johri, 1985; Dafni, 1992; Shivanna & Rangaswamy, 1992; Kearns & Inouye, 1993).

No primeiro teste de germinação *in vitro*, foi registrada grande proporção de grãos colapsados (Figura 1B), significativamente mais elevada em menores concentrações de sacarose, provavelmente pela ocorrência de choque osmótico (Tabela 1). Com o aumento da concentração de sacarose, foi possível obter menor proporção de colapsados e maior proporção de germinados. Na análise de regressão, foram obtidas linhas de tendência significativas ($P < 0,001$), tanto para colapsados [$y = 124,205 - (6,607 * \text{concentração de sacarose})$], reta descendente com $R^2 = 0,93$], quanto para germinados [$y = -8,168 + (1,508 * \text{concentração de sacarose})$], reta ascendente com $R^2 = 0,88$]. Porém, a germinação ocorreu em número bem inferior às médias observadas na maioria das espécies de plantas que produzem uma geração gametofítica regular (Dafni, 1992; Vizintin & Bohanec, 2004).

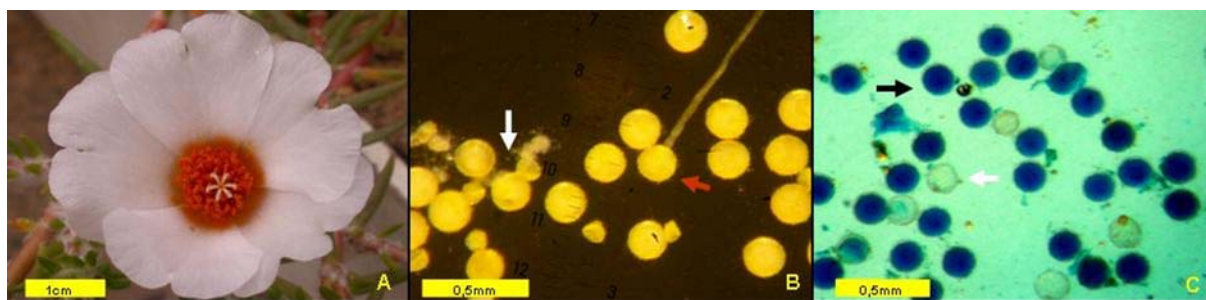


Figura 1: *Portulaca* sp: A) Flor aberta; B) Pólen de flor recém aberta emitindo tubo polínico (seta vermelha) e pólen colapsado (seta branca) após 6 horas *in vitro*; C) Reação positiva (seta preta) e negativa (seta branca) ao azul de algodão.

Os tratamentos que apresentaram maior percentual de germinação foram 150 g L^{-1} (Teste I) e 200 g L^{-1} (Teste II) com 15,1 e 12,5% de germinação respectivamente.

A grande proporção de pólen colapsado indicou que as condições físicas e químicas oferecidas para a germinação *in vitro* do pólen de *Portulaca* sp. não foram as ideais. Porém, o baixo índice de germinação *in vitro* pode estar relacionado, em grande parte, a

mecanismos de esterilidade dessa espécie ou variedade botânica, uma vez que as plantas produziram sementes em pequeno número (dados não publicados). Assim, na procura de explicações para a baixa germinação, foram feitas análises para determinação de viabilidade e estudo morfológico do pólen, com auxílio de corantes.

Tabela 1. Germinação *in vitro* de pólen de *Portulaca* sp. em dois testes com variações na concentração de sacarose no meio.

Teste	Sacarose (g L ⁻¹)	Tempo <i>in vitro</i> (h)	Germinados (%)	Colapsados (%)
1	50	4	0,5 c	67,8 d
		6	0,0 c	87,9 e
	100	4	3,6 b	45,6 b
		6	5,7 b	64,6 c
	150	4	12,2 a	14,4 a
		6	15,1 a	21 a
Pr P>F				
(A) Sacarose (g L ⁻¹)			<0,001	<0,001
(B) Tempo <i>in vitro</i>			0,276	<0,001
A x B			0,145	0,182
CV%			25,8	16,15
Transformação			Raiz de x	-
2	150	3	4,02 c	21,80 a
		6	8,30 b	42,65 b
	175	3	8,18 b	24,61 a
		6	7,72 b	41,49 b
	200	3	10,34 ab	18,20 a
		6	12,50 a	30,67 b
Pr P>F				
(A) Sacarose (g L ⁻¹)			<0,001	0,117
(B) Tempo <i>in vitro</i>			0,011	<0,001
A x B			0,033	0,780
CV%			16,74	22,96
Transformação			Raiz de x	Raiz de x

Grãos de pólen de botões de 11 e 14 mm (**Teste III**) apresentaram reação ao AA morfológicamente similar à registrada em outras espécies (Vizintin & Bohanec, 2004). A média de pólen corado (Figura 1C) foi de 56% para pólen de ambos tamanhos de botão (Tabela 2).

Na coloração de material fixado (**Teste IV**) foi registrado alto índice de plasmólise no pólen de botões de 9 mm (inviabilizando a contabilização), provavelmente por terem sido imersos no fixador Farmer em um estágio de desenvolvimento de maior suscetibilidade a choques osmóticos. Grãos de pólen de botões de 11 e 14 mm reagiram aos três corantes em proporções que não diferiram significativamente entre si (ANOVA paramétrica, 5%).

Na coloração com Alexander, não foi registrada impregnação da parede com o verde de malaquita que constitui o corante. É possível que a parede do pólen de *Portulaca* sp. possua uma constituição química especial que dificulte a apreensão do corante, além da escultura complexa que foi registrada nas observações em campo claro. Ainda que a parede não tenha corado em verde, foi possível quantificar a presença de protoplastos pela coloração com o outro constituinte de Alexander, a fucsina ácida.

Na coloração com carmim, houve completa impregnação dos protoplastos após alguns minutos de contato com o corante, impedindo a visualização dos núcleos. Essa resposta permitiu apenas a identificação de reação positiva ou negativa ao carmim.

Devido a essas limitações, a reação ao AA foi considerada a mais prática e conveniente para a verificação da presença de protoplastos no pólen de *Portulaca* sp.,

dispensando a fixação. Porém, os resultados não permitem afirmar que todos os grãos de pólen corados com AA estejam aptos à germinação. Estudos mais detalhados são necessários para oferecer informações quanto à capacidade de fecundação desses gametófitos.

Tabela 2. Percentagem de pólen de *Portulaca* sp. corados com três técnicas: reação de pólen fresco ao azul de algodão, reação de pólen fixado em Farmer a Alexander e a carmim propiônico 0,6%.

Comprimento do botão (mm)	Corante	Corados (%)
11	Alexander	51,73
	Azul de algodão	56,04
	Carmim propiônico	54,59
14	Alexander	58,17
	Azul de algodão	55,88
	Carmim propiônico	54,28
Pr P>F	(A) Corante	0,101
	(B) Comprimento do botão	0,734
	A x B	0,762
CV(%)		13,8

CONCLUSÕES

Nas condições testadas, as percentagens de sacarose mais elevadas promoveram menor colapso e maior germinação dos grãos de pólen, possivelmente pela diminuição do potencial osmótico do meio. Foi possível registrar a presença de protoplastos com os três corantes, mas estudos adicionais serão necessários para inferir sobre a funcionalidade dos gametófitos.

Esse trabalho servirá de base para estudos da biologia reprodutiva dessa nova variedade ou espécie botânica. Esse é o primeiro de uma série de trabalhos descritivos, uma vez que o mecanismo de fecundação não é conhecido.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, Baltimore, v.1, n.5, p.13-8, 1980.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: University Press, 1992. 250 p.
- HAUSER, E.J.P.; MORRISON, J.H. The cytochemical reduction of nitroblue tetrazolium as an index of pollen viability. **American Journal of Botany, New York**, v.51, p.748–752, 1964.
- KEARNS, C.A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot. Colorado: University Press of Colorado, 1993. 579p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil, Nativas e Exóticas**; Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.
- SHIVANNA, K.R.; JOHRI, B.M. **The angiosperm pollen: structure and function**. New York: John Wiley, 1985. 374p.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology: a laboratory manual**; New York: Springer-Verlag, 1992. 119p.
- VIZINTIN, L.; BOHANEK, B. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botânica**, Cracow, v.46, p.177-183, 2004.

PALAVRAS-CHAVES

Espécie nativa; plantas ornamentais; tubo polínico.