

AJUSTE NA CONCENTRAÇÃO DE AGAR E SACAROSE PARA GERMINAÇÃO *in vitro* DE GRÃOS DE PÓLEN DE AMEIXA

ANGELA SAITO^{1*}; EDVAN A. CHAGAS²; RAFAEL PIO³; WILSON BARBOSA²; FERNANDO
A. CAMPO DALL'ORTO²; POLLYANA C. CHAGAS⁴; LEANDRO H.G. TIZATO^{1**};
EMERSON F. TOMAZI¹

Nº 0700032

RESUMO

Objetivo-se no presente trabalho estudar o efeito de diferentes concentrações de agar e sacarose no meio de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de ameixeira. Os polens foram obtidos de anteras no estágio “balão” das variedades Centenária e Reubennel. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de agar (8, 12, 16 e 20 g.L⁻¹) e sacarose (0, 60, 120 e 180 g.L⁻¹). Os grãos de pólen foram distribuído uniformemente em placas de Petri contendo 20 mL de meio com auxílio de pincel nº.2. Maior porcentagem de germinação de grãos de pólen de ameixeira ‘Centenária’ e ‘Reubennel’ é obtida utilizando-se concentrações entre 16 e 20 g.L⁻¹ de agar combinado com 115, 93 e 123,25 g.L⁻¹ de sacarose. A variedade Reubennel apresentou maior taxa de germinação de grãos de pólen quando comparada com ‘Centenária’.

Palavras-chave: *Prunus salicina*, palinologia, cultura de tecidos, carboidrato

ADJUST CONCENTRATION OF AGAR AND SUCROSE TO *in vitro* GERMINATION OF PLUM POLLEN GRAINS

ABSTRACT

The objective in this word is study the effect of different concentration of agar and sucrose in the environment to germination *in vitro* of plum pollen grains. The pollens were obtained of

¹ Estagiário do Centro APTA Frutas, *Bolsista PIBIC/CNPq, **Bolsista I.C. FAPESP.

² Pesquisador Científico do Instituto Agrônômico. Autor correspondente: Email: echagas@iac.sp.gov.br.

³ Professor da Universidade do Oeste do Paraná.

⁴ Mestranda em Fitotecnia da Esalq/USP, Bolsista CAPES.

anthers in “balloon” stage of variety Centenária and Reubennel. The treatment was of different concentration of agar (8, 12, 16 and 20 g.L⁻¹) and sucrose (0, 60, 120 and 180 g.L⁻¹). The pollen was distributed uniformly in Petri plates contained 20 mL of culture medium with aid brush number 2. The biggest germination pollen percentage of Plum ‘Centenária’ and ‘Reubennel’ is obtained using concentration between 16 and 20 g.L⁻¹ of agar to mix with 115.93 and 123.25 g.L⁻¹ of sucrose. The specie ‘Reubennel’ present biggest germination of pollen ratio than ‘Centenária’.

Key words: *Prunus salicina*, palinology, tissue culture, carbohydrate

INTRODUÇÃO

As ameixeiras são frutíferas de clima temperado com ampla adaptação. Dentre essas se destacam aquelas variedades denominadas de “japonesas”. A espécie *Prunus salicina* e seus híbridos com espécies européias e norte americanas, são as mais cultivadas no Brasil, onde encontraram condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento, pelo fato de suportarem pouco frio e tolerarem as elevadas temperaturas no verão. As ameixeiras pertencem ao gênero *Prunus* incluindo uma série de espécies, as quais se acham classificadas em dois grandes grupos: 1) ameixeiras européias (*Prunus domestica*) que são hexaplóides ($2n = 48$, $x = 8$), assim como *P. insititia*; 2) ameixeiras japonesas (*Prunus salicina*) que são diplóides ($2n = 16$) da mesma forma que *P. cerasifera*, *P. americana* e outras (Weinberger, 1975).

Dentro de uma mesma espécie as cultivares nem sempre são compatíveis entre si. Esterilidade do pólen ocorre ocasionalmente e é comum a observação de cultivares autoincompatíveis. A maioria das cultivares de *P. salicina* são auto-infrutíferas (Griggs, 1953). Algumas, como ‘Nubiana’, são parcialmente auto-frutíferas e ocasionalmente algumas, como ‘Santa Rosa’, fornecem boas produções com seu próprio pólen. Há um alto grau de intercompatibilidade com muitas combinações. A espécie *Prunus salicina* é considerada de autopolinização irregular segundo Barbosa et. al. (1991), e melhora consideravelmente sua frutificação quando interplantadas com cultivares polinizantes, as quais devem apresentar concomitância de florada com a cultivar principal e, prioritariamente, abundância de pólen fértil e compatível. Carvalho e Raseira (1990) relatam que a floração da ameixeira *Prunus salicina* Lindl. apresenta alta densidade de floração podendo atingir mais de 40 flores por 25 cm de ramo, enquanto outros autores admitem que 5% de frutificação efetiva é suficiente para assegurar uma boa produção comercial. É comum

encontrar ameixeiras que pouco ou nada frutificam, embora floresçam abundantemente. Isto justifica pela falta de polinização cruzada, visto que a espécie, em sua maioria mostra-se acentuadamente autoestéril, de modo que pouco ou nada produzem quando plantadas isoladamente. No que se referem às variedades Centenária e Reubennel, estas possuem elevada taxa de autocompatibilidade.

A polinização e fertilização é um dos elos mais importantes na cadeia reprodutiva de uma planta, pois deste depende toda a produção frutífera (Barbosa et al., 1990). Assim, dados sobre a viabilidade e o desenvolvimento biológico de grãos de pólen são fundamentais para os trabalhos melhoramento genético, pois permitem obter maiores sucessos nos cruzamentos, que são realizados com a finalidade de gerar novos híbridos e/ou aumentar a viabilidade. Outra grande importância do conhecimento da germinação e viabilidade dos grãos de pólen é a sua utilização na polinização artificial de espécies autoincompatíveis, como o caso das ameixeiras.

Para a realização dos testes de germinação *in vitro* e viabilidade dos polens existem várias técnicas que podem ser utilizados (Galleta, 1983), entretanto os métodos mais utilizados são aqueles *in vitro* (Scorza e Sherman, 1995) e os meios com agar (Chagas et al., 2006).

Neste contexto objetivou-se avaliar o efeito das diferentes concentrações de agar e sacarose na germinação *in vitro* de grãos de pólen de ameixeira 'Centenária' e 'Reubennel'.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do experimento, grãos de pólen foram obtidos retirados de anteras provenientes de flores em estágio de balão das variedades Centenária e Reubennel. Em seguida, as anteras foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e colocadas em sala de secagem a uma temperatura de 25°C, durante 12 horas, para a completa deiscência e liberação dos grãos de pólen.

O meio de cultura foi elaborado de acordo com as diferentes concentrações de agar (8, 12, 16 e 20 g.L⁻¹) e sacarose (0, 60, 120 e 180 g.L⁻¹), sendo que em cada tratamento, o pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Após preparo, o meio de cultura foi vertido na quantidade de 20ml em placas de Petri. Em seguida, com o auxílio de um pincel nº.2., os grãos de pólen de cada variedade foram distribuídos uniformemente sobre a

superfície do meio. Após a inoculação, os tratamentos foram incubados em sala de crescimento a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 24 horas e intensidade luminosa de $35\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A contagem de grãos de pólen germinados foi realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 10 X. Considerou-se germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico tivesse ultrapassado o diâmetro do próprio grão de pólen, após 12 horas de incubação. Em seguida, fez-se a conversão do número de grãos de pólen analisados e germinados em porcentagem.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×4 , com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as concentrações de agar e sacarose a regressão (Gomes, 2000). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação de grãos de pólen de ambas as variedades estudadas foram significativamente influenciadas pela interação entre os fatores testados. Para a variedade Centenária, quando utilizaram-se 8 e $20\ \text{g.L}^{-1}$ de agar, observou-se um aumento linear da porcentagem de grãos de pólen germinados com a elevação da concentração de sacarose. Entretanto, quando utilizam-se doses intermediárias (12 e $16\ \text{g.L}^{-1}$ de agar) a taxa de germinação foi incrementada até a concentração de 97,82 e $123,25\ \text{g.L}^{-1}$ de sacarose, respectivamente, decrescendo quando combinada com concentrações maiores (Figura 1A). Para variedade Reubennel, melhores taxas de germinação de grãos de pólen (57,48%) foram obtidas utilizando-se a dose de $20\ \text{g.L}^{-1}$ de agar combinado com $115,93\ \text{g.L}^{-1}$ de sacarose. Para as demais doses de agar, 8, 12 e $16\ \text{g.L}^{-1}$, observou um efeito quadrático no qual a taxa de germinação foi incrementada até as concentrações de 116,48; 92,63 e $102,04\ \text{g.L}^{-1}$ de sacarose, respectivamente (Figura 1B).

Constata-se no presente trabalho que o requerimento de agar e sacarose para a germinação de grãos de pólen de variedades de ameixeira é bastante elevado quando comparado com outras fruteiras a exemplo da nectarineira, pereira e citros (Chagas et al., 2006; Chagas et al., 2007; Pio et al., 2004).

Comparando-se as duas variedades estudadas, constatou-se que a variedade Reubennel apresentou uma melhor performance na taxa de germinação de grãos de pólen. Enquanto a porcentagem máxima de germinação da variedade Centenária foi em torno de 20%, a variedade Reubennel apresentou 57,48%. Esses dados sugerem que em termos de polinização-fertilização, de acordo com as condições em que o trabalho foi realizado, a 'Reubennel' possui maior potencial de ser utilizada em práticas de manejo visando a interpolinização de ameixeiras.

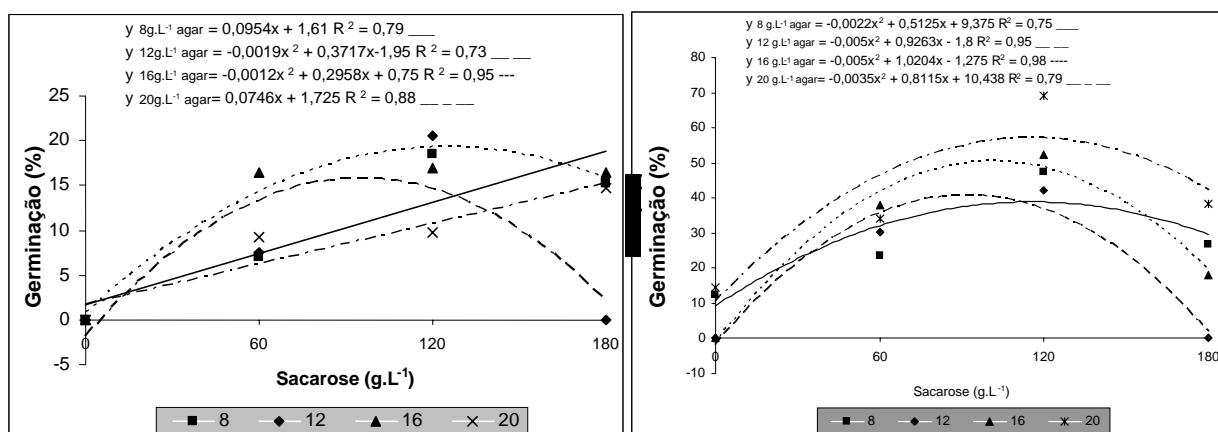


FIGURA 1. Porcentagem de grãos de pólen germinados *in vitro* de ameixeira 'Centenária' (1A) e 'Reubennel' (1B) quando submetidas a diferentes concentrações de agar e sacarose. Centro APTA Frutas/IAC, Jundiaí, SP, 2007.

CONCLUSÕES

Maior porcentagem de germinação de grãos de pólen de ameixeira 'Centenária' e 'Reubennel' é obtida utilizando-se concentrações entre 16 e 20 g.L⁻¹ de agar combinado com 115, 93 e 123,25 g.L⁻¹ de sacarose;

A variedade Reubennel apresentou maior taxa de germinação de grãos de pólen quando comparada a 'Centenária'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, W. et. al. Polinização das fruteiras de caroço: ameixeira, nectarineira e pessegueiro. **O Agrônomo**, Campinas, v.43, n.1, p.3-13, 1991.

- CARVALHO, T.C.P. de; RASEIRA, M.C.B. Aspectos relacionados a polinização e autocompatibilidade em ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.). **HortiSul**, Pelotas, v.1, n.2, p. 29-32, 1990.
- CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; CHAGAS, P.C.; MENDONCA, V.; SIGNORINI, G.; Schiavinato, Y.O. Ajuste da concentração de agar e sacarose para germinação in vitro de grãos de pólen de nectarina In: XV congresso de Pós-Graduandos da Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, 2006. 5p. CD Rom.
- CHAGAS, E.A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; SAITO, A.; CHAGAS, P.C. In vitro germination of *Pyrus calleryana* Decne. pollen: adjusting a protocol. In: Internacional Pear Symposium, 10., 2007. Peniche. **Anais...** Peniche: ISHS, 2007. p.48.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GALLETA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. **Methods in fruits breeding**, Indiana: Purdue University press. p.23-47, 1983.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: USP/ESALQ, 2000. 477 p.
- GRIGGS, W.H. Pollination requirements of fruits and nuts. **California Agric. Expt. Sta. Cir.**, 424, 1953.
- PIO, L.A.S.; JUNQUEIRA, K.P.; RAMOS, J.D.; RUFINI, J.C.M. Composição do meio de cultura para germinação de pólen de variedades de laranja-doce. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.25, n.1, p.87-97, 2004
- SCORZA, R.; SHERMAN, W.B. Peaches. In: JANIK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John & Sons, 1995. p.325-440.
- WEINBERGER, J.H. Plums. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in fruit breeding**. p. 336-47, Purdue University Press, 1975, West Lafayette. Indiana.