

Germinação *in vitro* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham)*In vitro* pollen germination of Jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham)Valderês Aparecida de Sousa¹, Eduardo Antonio Schemberg² e Ananda Virgínia Aguiar¹**Resumo**

O jerivá é uma palmeira nativa do Brasil, com potencial ornamental, apícola e para a manutenção da fauna silvestre, devido aos seus frutos carnosos, nutritivos e abundantes. Face à exploração indiscriminada das florestas nativas e à importância ecológica da espécie no seu ambiente natural, medidas relacionadas à sua conservação são necessárias. O armazenamento do pólen pode ser utilizado como uma importante ferramenta na conservação *ex situ* e no melhoramento genético florestal, sendo essencial para isso a avaliação correta da sua viabilidade. O presente trabalho visou definir o meio de cultura adequado para a germinação do pólen de jerivá, por meio da aplicação de diferentes doses de nutrientes estimulantes da germinação (Ca, B, Mg e K), empregando-se o meio de Brewbaker e Kwack modificado para Ca e B, além de sacarose (100 g.L⁻¹) e de ágar (3 g.L⁻¹). Os valores obtidos para a porcentagem de germinação foram submetidos à análise de variância e, as médias comparadas por meio do teste de Tukey, ao nível de 1 % de probabilidade. Conclui-se que a adição de nutrientes não influenciou positivamente a germinação *in vitro*, de forma que o meio contendo apenas ágar e sacarose é indicado para avaliar a germinação do pólen de *Syagrus romanzoffiana*.

Palavras-Chave: Conservação *ex situ*, Teste de viabilidade de pólen, Meios de cultura, Armazenamento de pólen

Abstract

Syagrus romanzoffiana (jerivá) is a native palm species from Brazil with potential as ornamental, for apicultural and for the maintenance of the wild fauna, because it produces nutritious and abundant fruits. As a consequence of the indiscriminate native forests exploitation and due to its ecological importance in the natural environment, measures related to its conservation are needed. Pollen storage can play an important tool not only for *ex situ* conservation but also for tree breeding programs. The knowledge to evaluate its pollen viability is lacking. The present work aimed at identifying adequate culture media for jerivá pollen germination, taking into consideration different nutrient concentration (B, Ca, Mg and K) within the Brewbaker and Kwack medium modified for Ca, B, sucrose (100 g.L⁻¹) and agar (3 g.L⁻¹). Germination percentages (%) were submitted to variance analysis and the average compared by the Tukey test at 1 % level. According to this study, nutrient addition did not increase significantly *in vitro* germination. Therefore the medium composed only by sucrose and agar is indicated to evaluate *Syagrus romanzoffiana* pollen viability.

Keywords: *Ex situ* conservation, Pollen viability test, Culture media, Pollen storage

INTRODUÇÃO

O Jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham) é espécie nativa do Brasil, pertencente à família Arecaceae. Ocorre naturalmente nas latitudes de 14° S, na Bahia, a 33° 50' S, no Rio Grande do Sul e em todas as formações florestais no Estado do Paraná (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual). Apresenta grande importância apícola, na alimentação animal e humana, como planta

medicinal e ornamental em ecossistemas da Floresta Ombrófila Mista (CARVALHO, 2006).

A espécie pode atingir entre 10 a 15 metros de altura e estipe único de 30 a 50 cm de diâmetro (LORENZI, 2002). De acordo com Reis (2006), é uma espécie hermafrodita, que apresenta inflorescência em cacho pendente, ramificado, de 80 a 120 cm de comprimento, com centenas de ráquias (LORENZI, 2002). A floração ocorre quase o ano inteiro, com maior intensidade entre os meses de setembro a março, enquanto a

¹Pesquisadora da Embrapa Florestas - Estrada da Ribeira - km 111 - Colombo, PR - E-mail: valderes@cnpf.embrapa.br; ananda@cnpf.embrapa.br

²Biólogo - Rua Francisco Caetano Coradin, 34 - Colombo, PR - E-mail: eduardoschemberg@gmail.com

maturação dos frutos é registrada principalmente entre os meses de novembro a janeiro. Apresenta frutos lisos globosos, com polpa fibrosa e carnosa de cor amarela (VILAMADA, 2009).

Com a redução das florestas nativas, devido à expansão das lavouras, exploração indiscriminada da madeira e ocupação humana, as populações naturais desta espécie vêm sendo gradativamente reduzidas juntamente com as demais espécies desse bioma. Portanto, práticas para resguardar os remanescentes florestais tornam-se cada vez mais necessárias. A conservação *in situ* é a forma de manter as populações remanescentes, bem como propiciar o potencial evolucionário das espécies. No entanto, os remanescentes florestais existentes são insuficientes para a conservação do germoplasma atual, devido à pressão antrópica. Nesse sentido, a conservação *ex situ* é uma ferramenta complementar ao propósito da conservação, podendo ser implementada a partir de plantios ou a conservação de propágulos *in vitro*, em condições de laboratório.

O armazenamento de pólen é um tipo de conservação *in vitro* útil aos programas de melhoramento genético, em cruzamentos controlados de plantas com defasagem de floração (ASSIS *et al.*, 1993), podendo ser adotado também na conservação *ex situ* de recursos genéticos. A vantagem deste tipo de conservação é demandar um pequeno espaço físico para a manutenção de coleções (SOUSA-LANG e PINTO JÚNIOR, 1997). Todavia, para o sucesso do armazenamento a médio e longo prazos, é necessário o domínio de técnicas de coleta, secagem, armazenamento e testes de viabilidade do pólen. Para isso, metodologias referentes a estas técnicas devem ser desenvolvidas, visto que cada espécie se porta diferentemente frente aos referidos processos, o que pode comprometer a viabilidade do pólen.

Dentre as várias metodologias empregadas de avaliação de viabilidade de pólen, destaca-se a germinação *in vitro*, capaz de distinguir os grãos viáveis dos inviáveis. Esse tipo de teste busca reproduzir as condições naturais do estilete e estigma, onde o pólen germina e se desenvolve. Em condições naturais, água, açúcares e aminoácidos são supridos pelo estilete, para nutrir o crescimento do tubo polínico (KEARNS e INOUE, 1993). Além disso, outros elementos químicos (STANLEY e LINSKENS, 1974) são reconhecidamente importantes nesse processo, destacando-se como o boro (B), cálcio (Ca), além de magnésio (Mg) e potássio (K) em

menor grau. A germinação *in vitro* é estimulada pela adição desses elementos ao meio de cultura, submetendo o pólen a uma condição semelhante à encontrada no estigma.

A composição do meio de cultura favorável à germinação *in vitro* é diferente para cada espécie, mas geralmente contempla um agente solidificante (ágar ou gelatina, dentre outros), açúcar e, em certos casos, nutrientes em concentrações específicas, devendo ser investigada para cada espécie. Desta maneira, Kordan (1981) observou a habilidade do ágar em promover o crescimento do tubo polínico de *Impatiens holstii*, na concentração de 20 g.L⁻¹, mesmo sem a adição de açúcares ou nutrientes. Para *Araucaria angustifolia*, as maiores taxas de germinação ocorreram entre as concentrações de 5 e 10 g.L⁻¹, especialmente na concentração de 8 g.L⁻¹ (SOUSA-LANG e PINTO JÚNIOR, 1997).

Os açúcares desempenham papel fundamental no meio de cultura e vários trabalhos apontam a sacarose, como agente estimulante da germinação do pólen, sendo empregada por vários pesquisadores. Dafni (1992) ressalta que as concentrações ideais de sacarose, em testes de germinação para os diferentes tipos de pólen, devem ser testadas no intervalo de 0 e 500 g.L⁻¹. Embora a concentração ideal para se promover a germinação *in vitro* varie entre as espécies, a sua amplitude encontra-se nesse intervalo indicado por Dafni (1992).

O presente trabalho visou determinar a viabilidade do pólen de jerivá em diferentes meios de culturas, empregando-se diferentes doses de nutrientes, através da modificação do meio de Brewbaker e kwack para boro e cálcio, visando fornecer subsídios para os trabalhos de conservação, melhoramento e biologia de reprodução desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletou-se pólen de seis árvores de Jerivá em uma população natural do município de Colombo, PR. Diversas ráquias das inflorescências, contendo botões florais e flores recém abertas foram retiradas, permanecendo em laboratório, com suas extremidades imersas em água até sua antese. As flores foram então retiradas, secas em estufa a 30 °C por 24 horas e armazenadas no congelador (-18 °C) até o procedimento do teste de germinação, período esse inferior a um mês.

Ao ser retirado do congelador, o pólen foi reidratado por 24 horas, em ambiente satura-

do de água, em germinador, sob temperatura constante de 25 °C. O teste de germinação *in vitro* seguiu a metodologia de Stanley e Linskens (1974), onde o pólen foi depositado no meio de cultura sobre lâminas de microscopia ótica. A concentração de 3 g.L⁻¹ de ágar foi adotada como ideal a partir de ensaios prévios com concentrações de 2 g .L⁻¹, 3 g.L⁻¹, 6 g .L⁻¹, 8 g.L⁻¹, e 10 g.L⁻¹, pelos presentes autores. A concentração de sacarose de 100 g.L⁻¹ também foi definida a partir de testes preliminares com concentrações entre 0 e 500 g .L⁻¹.

No presente trabalho foram empregados cinco meios de cultura, considerando variações na concentração de boro e cálcio: 1- Testemunha – com 3 g.L⁻¹ de ágar e 100 g.L⁻¹ de sacarose (meio padrão); 2- meio padrão com Brewbaker e Kwack completo (100 mg.L⁻¹ de H₃B₃O₃, 300 mg.L⁻¹ de Ca (NO₃)₂.4H₂O, 200 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 100 mg.L⁻¹ de KNO₃); 3- meio padrão com Brewbaker e Kwack (1963) modificado para B (200 mg.L⁻¹ de H₃B₃O₃); 4- meio padrão com Brewbaker modificado para B (300 mg.L⁻¹ de H₃B₃O₃) e Ca (400 mg.L⁻¹ de Ca (NO₃)₂.4H₂O); e 5- meio padrão com Brewbaker e Kwack modificado para B (200 mg.L⁻¹ de H₃B₃O₃) e Ca (400 mg.L⁻¹ de Ca (NO₃)₂.4H₂O).

Os ensaios de germinação foram conduzidos em blocos ao acaso, com quatro repetições, durante 24 horas, no germinador com umidade relativa de 99 % e temperatura constante de 25 °C. Após esse período, utilizou-se a safranina para a melhor visualização dos grãos de pólen e a interrupção do crescimento do tubo polínico. A avaliação consistiu da contagem de 200 grãos de pólen total, germinados e não germinados por repetição, seguindo critério de Goddard e Matthews (1981). O grão foi considerado germinado quando o seu tubo polínico atingiu comprimento maior que seu diâmetro, conforme a metodologia sugerida por Cook e Stanley (1960), citados por Sprague (1977).

Os dados de germinação (%) obtidos para cada repetição foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio da aplicação do teste de Tukey ao nível de 1 % de probabilidade. Por apresentarem natureza binomial, os dados foram transformados em $arc\ sen\ \sqrt{\%/100}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância houve diferença significativa ao nível de 1 % de probabilidade entre os tratamentos. Com base no teste de Tukey (Tabela 1), verificou-se que o meio padrão (testemunha) e o meio com a adição de boro (200 mg.L⁻¹ de H₃B₃O₃ ppm) destacaram-se dentre os demais tratamentos, proporcionando as maiores porcentagens de germinação, 86,00 % e 81,75 %, respectivamente. Para os tratamentos onde o Ca foi incrementado de 300 para 400 mg.L⁻¹ de Ca (NO₃)₂.4H₂O, houve um decréscimo na germinação, embora não tenha sido detectada estatisticamente a diferença. O acréscimo do Ca é importante especialmente para o crescimento do tubo polínico, todavia Pio *et al.* (2004) observaram que elevadas concentrações deste elemento proporcionaram maior porcentagem de grãos de pólen rompidos, ao examinar a viabilidade de pólen de variedades de citros. Pode ter ocorrido que, no presente ensaio, a concentração 400 mg.L⁻¹ tenha sido excessiva para germinar a totalidade do pólen dessa espécie.

O meio de cultura básico completo desenvolvido por Brewbaker e Kwack (1963), para germinação de pólen é composto por 100 mg .L⁻¹ de H₃BO₃, 300 mg .L⁻¹ de Ca (NO₃)₂.4H₂O, 200 mg .L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 100 mg .L⁻¹ de KNO₃. Apesar do meio de cultura de Brewbaker e Kwack ser básico para várias espécies, pequenas modificações na concentração de sacarose, nutrientes e ágar devem ser testadas para viabilizar a germinação do pólen. Tais modificações

Tabela 1. Germinação do pólen de Jerivá em diferentes meios de cultura.

Table 1. Jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham) pollen germination on different culture media.

N.	Composição	Germinação (%)
1	3 g . L ⁻¹ de ágar e 100 g . L ⁻¹ de sacarose (meio padrão)	86,00 a
3	meio padrão com Brewbaker e Kwack (1963) modificado para B (200 mg. L ⁻¹ de H ₃ B ₃ O ₃)	81,75 a
4	meio padrão com Brewbaker modificado para B (300 mg. L ⁻¹ de H ₃ B ₃ O ₃) e Ca (400 mg. L ⁻¹ de Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O)	73,25 b
5	meio padrão com Brewbaker e Kwack modificado para B (200 mg. L ⁻¹ de H ₃ B ₃ O ₃) e Ca (400 mg. L ⁻¹ de Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O)	73,00 b
2	meio padrão com Brewbaker e Kwack completo (100 mg. L ⁻¹ de H ₃ B ₃ O ₃ , 300 mg. L ⁻¹ de Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O, 200 mg. L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O e 100 mg. L ⁻¹ de KNO ₃)	67,25 b

Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente no teste de Tukey a 1 % de probabilidade.

são importantes para incrementar a germinação do pólen viável, mas foram determinadas para poucas espécies, como: *Eucalyptus* spp (SOUSALANG e PINTO JÚNIOR, 1997); LOGUERCIO (2002) para *Nicotiana tabacum* (tabaco) L.; PLIENE *et al.* (2002) para *Gossypium hirsutum* L. (algodão); DAHER (2009) para *Arabidopsis thaliana*; KAHAN e PERVEEN (2008) para *Morus alba*.

A importância da adição de nutrientes para a máxima germinação do pólen em meio de cultura é reportada na literatura. Dentre esses, o cálcio e o boro desempenham papel fundamental na germinação e crescimento do tubo polínico. Vários pesquisadores têm empregado esses elementos individualmente (FAN *et al.* (2001) para *Arabidopsis*; DANTAS *et al.* (2005) para *Malus* spp.; GEETHA *et al.* (2004) para *Zea mays*; FRANZON e RASERA (2006) para *Eugenia involucrata*; FRANZON *et al.* (2006) para *Campomanesia xanthocarpa*; BREWBAKER e KWACK (1963) para *Ornithogalum virens*; PIO *et al.* (2004) para diferentes espécies de citros) como estimulantes da germinação de pólen.

A literatura não traz registro do comportamento do pólen de jerivá em meio de cultura. Porém, de uma forma geral, a literatura mostra que, para diferentes espécies de palmeiras, a viabilidade polínica é geralmente alta. Oliveira *et al.* (2003), utilizando corantes específicos, registraram uma viabilidade de 89,5 % para o pólen da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.), onde foram observados tecidos vivos para identificar polens viáveis e não viáveis. Para o jerivá, Moro *et al.* (1999) obtiveram índices de até 87,27 % de grãos de pólen viáveis, utilizando o corante de Alexander, para avaliar a viabilidade polínica. Deve-se ressaltar que o uso de corantes específicos tende a superestimar a viabilidade do pólen (STANLEY e LINSKENS, 1974) já que pode ocorrer a coloração de pólenes imaturos e abortados incapazes de germinar. Sendo assim, o meio de cultura utilizado no presente ensaio propiciou uma elevada germinação do pólen *in vitro*, podendo ser utilizado com segurança para avaliar a viabilidade do pólen de jerivá.

CONCLUSÃO

O meio de cultura ideal para germinação *in vitro* do pólen de jerivá deve ser composto por 3 g.L⁻¹ de ágar e 100 g.L⁻¹ de sacarose, não sendo necessária a adição de micronutrientes a esse meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T.F.; BAUER, J.F.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.3, n.1, p.161-170, 1993.
- BREWBAKER, J.L.; KWACK, B.H. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Columbus, v.50, n.9, p.859-865, 1963.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. v.2 p.627.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. p.250.
- DAHER, F.B.; CHEBLI, Y.; GEITMANN, A. Optimization of conditions for germination of cold stored *Arabidopsis thaliana* pollen. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.28, n.3, p.347-357, 2009.
- DANTAS, C.M.; PEIXOTO, M.L.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.356-359, 2005.
- FAN, L.M.; WANG, Y.F.; WANG, H.; WU, W.H. *In vitro* Arabidopsis pollen germination and characterization of the inward potassium currents in Arabidopsis pollen grain protoplasts. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.361, p.1603-1614, 2001.
- FRANZON, R.C.; RASERA, M.C.B. Germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.18-20, 2006.
- FRANZON, R.C.; RASERA, M.C.B.; WAGNER JÚNIOR, A. Germinação *in vitro* de pólen de guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* BERG). **Revista Ceres**, Viçosa, v.5, n. 305, p.129-134, 2006.
- GEETHA, K.; VIJAYABASKARAN, S.; JAYARAMAN, N. *In vitro* studies on pollen germination and pollen tube growth in maize. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v.2, n.1, p.205-207, 2004.
- GODDARD, R.E.; MATTHEWS, F.R. Pollen testing. In: FRANKLIN, C. (Ed.) **Pollen management handbook**. Washington: USDA Forest Service, 1981. 98p. (Agriculture Handbook, 587).

- KEARNS, C.A.; INOUIYE, D.W. **Techniques for pollination biologists**. Colorado: Colorado University Press, 1993. 583p.
- KHAN, S.A.; PERVEEN, A. Germination capacity of stored pollen of *Morus alba* (Moraceae) and their maintenance. **Pakistan Journal of Botany**, v.5, n.5, p.1823-1826, 2008.
- KORDAN, H.A. Impatiens holstii pollen germination on non-nutrient agars. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.23, p.157-160, 1981.
- LOGUERCIO, L.L. Pollen treatment in high osmotic potential: a simple tool for *in vitro* preservation and manipulation of viability in gametophytic populations L. Braz. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.14, n.1, p. 65-70, 2002.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.1 p.368.
- MORO, F.V.; SILVA, M.A.S.; MORO, J.R. Pollen viability in *Syagrus romanzoffiana* and *S. coronata* (Arecaceae). **Acta Horticulturae**, The Hague, v.486, p.215-217, 1999.
- OLIVEIRA, M.S.P.; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira Tucumã (*Astrocarium vulgare* Mart) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.17, n.3, p.343-353, 2003.
- PIO, L.A.S.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M.; RAMOS, J.D.; ARAÚJO, A.G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de Cálcio e Boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p.293-296, 2004.
- PLINE, W.A.; EDMISTEN, K.L.; OLIVER, T.; WILCUT, J.W.; WELLS, R.; LLEN, N. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Madison, v.42, p.2193-2200, 2002.
- REIS, R.C.C. Palmeiras (Arecaceae) das restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v.20, n.3, p.501-512, 2006.
- SOUSA-LANG, V.A.; PINTO JUNIOR, J.E. Efeito da concentração de ágar na germinação *in vitro* de pólen de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.34, p.55-63, 1997.
- SPRAGUE, J.R. **Seed and pollen handling**. In: TREE IMPROVEMENT SHORT COURSE, 1977, Raleigh. Raleigh: Carolina State University, 1977. p. 90 -102.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307p.
- VILAMADA. Jerivá. Disponível em: <http://vilamada.com.br/conteudo/vila-viva/girassol>. Acesso em: 09/04/2009

Recebido em 22/09/2009

Aceito para publicação em 08/03/2010

