

VIABILIDADE E GERMINABILIDADE POLÍNICA DE POPULAÇÕES DE JURUBEBA (*SOLANUM PANICULATUM* L.)¹

OTÁVIO DIAS SANTOS NETO¹; ISANE VERA KARSBURG² E MICHAELLI YURI YOSHITOME³

¹ Biólogo, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT/Alta Floresta. Trabalho de Conclusão de Curso do primeiro autor apresentado a UNEMAT/Alta Floresta.

² Bióloga, Dra. Professora Assistente UNEMAT/Alta Floresta, Caixa Postal 547, 78580-000, Alta Floresta, MT, e-mail: isane9@yahoo.com.br

³ Bióloga, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT/Alta Floresta - MT.

RESUMO: No presente trabalho, estudaram-se dois métodos para avaliação da viabilidade polínica da Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) utilizando-se de corantes e pelo crescimento do tubo polínico. Para avaliação da viabilidade do pólen de *Solanum paniculatum* L. foram utilizados botões florais de 6 populações diferentes que foram fixados em metanol: ácido acético PA (3:1). Na estimativa da viabilidade polínica foram realizadas lâminas pela técnica do esmagamento utilizando-se os seguintes corantes: Lugol 1%, Fucsina 1%, Safranina 1%, Azul de Astra + Fucsina 1% e Vermelho de Metila 0,05%, foram avaliadas 5 lâminas por planta e analisados em média 150 grãos de pólen por lâmina. Na viabilidade pela coloração foram considerados grãos de pólen viáveis aqueles que apresentassem coloração intensa ou coloração diferencial da exine e da intine. Para verificar a germinação do tubo polínico, foram distribuídos os grãos de pólen em placas de Petri contendo (10 g/l sacarose: 0,01 g/l ácido bórico) com três repetições das quais foram avaliados 250 grãos de pólen em média por placa, estas foram expostas a 28 °C em câmara de germinação. As observações foram realizadas no microscópio óptico aumento de 40 X, nisso foi considerado como grão de pólen germinado aquele cujo comprimento do tubo polínico tivesse ultrapassado o seu próprio diâmetro. Os testes de germinação demonstraram um baixo índice de grãos de pólen germinados, por isso, a viabilidade parecer expressar o potencial de germinação, mas não a sua ocorrência.
Termos para indexação: *Solanaceae*, grãos de pólen, fertilidade masculina.

POLLEN VIABILITY AND GERMINATION RATE OF POPULATIONS FROM JURUBEBA (*SOLANUM PANICULATUM* L.)

ABSTRACT: In the present work, they were studied two methods for evaluation of the pollen viability of Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) being used of colors and for the growth of the tube pollen. For evaluation of the viability of the pollen of *Solanum paniculatum* L. was used floral buttons of 6 different populations that were fastened in methanol: acid acetic SHOVEL (3:1). In the estimate of the pollen viability sheets were accomplished by the technique of the crush being used the following staining: Lugol 1%, Fucsina 1%, Safranina 1%, Blue of Astra + Fucsina 1% and Red of Methyl 0,05%, they were appraised 5 sheets for plant and analyzed 150 pollen grains on average by sheet. In the viability for the coloration grains of viable pollens were considered those to present intense coloration or differential coloration of the exin and of the intin. To verify the germination of the tube pollen, the pollen grains were distributed in plates of Petri containing (10 g/l sucrose: 0,01 boric acid g/l) with three repetitions of the which were appraised 250 pollen grains on average for plate, these were exposed to 28 °C in germination camera. The observations were accomplished in the microscope optical increase of 40 X, in that was considered as grain of germinated pollen that whose length of the pollen tube had crossed own diameter. The germination tests demonstrated a low index of pollen grains germinated, for that, the viability to seem to express potential the germination, but doesn't sweat occurrence.
Index terms: *Solanaceae*, pollen grains, masculine fertility

INTRODUÇÃO

O gênero *Solanum* produz uma grande variedade de saponinas esteroidais e glicoalcalóides de importância na resistência natural destas plantas contra muitas pragas. Este gênero é um dos mais amplos do reino vegetal com cerca de 1700 espécies (Willis, 1973).

Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) ocorre em toda a América tropical. Apresenta uma ampla distribuição no Brasil ocorrendo do Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte. Floresce e frutifica praticamente o ano todo. Grant (1975) atribuiu às plantas invasoras algumas características típicas, como a capacidade de colonização rápida de ambientes abertos, inclusive por ação antrópica, e a reprodução predominantemente autogâmica, o que lhes confere alta uniformidade genética em nível populacional, não descartando, entretanto, surtos esporádicos de recombinação.

As folhas, frutos e especialmente as raízes da jurubeba são utilizadas popularmente sob a forma de chá contra as doenças do fígado, diabetes e icterícia. Também é utilizada na preparação de tinturas e extratos pela indústria farmacêutica. Dos frutos é fabricado vinho. O extrato mole da raiz faz parte da composição de medicamentos fitoterápicos de uso empírico (Leitão-Filho et al., 1975).

Segundo Souza et al. (2002), a viabilidade e a germinabilidade polínica constituem-se em fatores importantes para o melhoramento de plantas, pois em algumas espécies cada grão de pólen leva consigo os materiais genéticos resultante da recombinação, fazendo com que estas plantas transmitam à próxima geração genótipos amplamente diversificados, tamanha a probabilidade de diferentes combinações entre os alelos que ocorre na meiose.

Considerando-se que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas na formação do zigoto, quanto maior a taxa de viabilidade e germinabilidade polínica, maior a possibilidade da produção de combinações distintas entre alelos e, em última análise, de variabilidade genética (Akoroda, 1983).

Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas, é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade. Em geral, o pólen colhido de flores em adequado estágio de desenvolvimento e corretamente preparado não necessita de testes de viabilidade. Entretanto, não são raras as situações em que o pólen a ser usado tenha sido colhido em outra região, ou mesmo, fornecido por intercâmbio com outros países. Por outro lado, pela não coincidência de floração, é preciso, muitas vezes, armazenar o pólen colhido em um ano, para ser utilizado no ano seguinte. Neste caso, é recomendável testar a viabilidade do mesmo, antes de sua utilização (Dantas et al., 2005; Einhardt et al., 2006).

A viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo. Segundo Shivanna & Rangaswamy (1992), o período de florescimento, as alterações ambientais e as diferenças genotípicas podem contribuir para tal variabilidade. A perda da viabilidade do pólen em diferentes espécies tem sido correlacionada com a perda de água e a manutenção do estado de desidratação em condições naturais e de laboratório (Linskens & Cresti, 1988; Nepi & Pacini, 1993).

O objetivo deste trabalho foi estimar a viabilidade e a germinação polínica em seis populações de *Solanum paniculatum* L.

MATERIAL E MÉTODOS

A viabilidade e a germinação do tubo polínico foram realizados no Laboratório de Biologia na UNEMAT no Campus de Alta Floresta – MT entre fevereiro a abril de 2007, a partir de botões florais em estágio de pré antese coletadas em seis diferentes locais em Alta Floresta – MT (Tabela 1).

Para avaliação da viabilidade do pólen de *Solanum paniculatum* foram utilizados botões florais fixados em metanol: ácido acético PA (3:1). A técnica de esmagamento foi utilizada na estimativa da viabilidade polínica com o uso dos seguintes corantes: Lugol 1%, Fucsina 1%, Safranina 1%, Azul de Astra + Fucsina 1% e Vermelho de Metila 0,5%. Para esses corantes, a viabilidade foi determinada pela diferenciação de tamanho e pela capacidade de coloração dos grãos de pólen, onde foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram tonalidades mais escuras e com tamanho maior e inviáveis aqueles que apresentaram tonalidades mais claras e tamanho inferior aos demais. Foram avaliadas 5 lâminas por planta sendo contabilizados 150 grãos de pólen por lâmina.

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de grãos de pólen corados}}{\text{N}^\circ \text{ de grãos pólen total}} \times 100$$

Na germinação do tubo polínico, foram distribuídos os grãos de pólen em placas de Petri com três repetições, seguindo as recomendações de Trabelsi (1985), as placas foram expostas a 28 °C em câmara de germinação durante 1 hora. Em média foram analisados 250 grãos de pólen por placa durante a germinação. As observações foram realizadas no microscópio óptico aumento de 40 X, contabilizando os grãos de pólen germinados e o não germinados. Foram considerados como grãos de pólen germinados aqueles cujo comprimento do tubo polínico tivessem ultrapassado o seu próprio diâmetro.

As médias de pólenes viáveis e inviáveis obtidos com pelos diferentes corante e a germinabilidade foram comparados pelo teste Tukey de X² com probabilidade ≥ 5% pelo programa Genes (Cruz, 2007).

TABELA 1. Localização por GPS (Sistema de Posição Global) de seis populações de *Solanum paniculatum* ocorrentes em Alta Floresta – MT em 2007.

| População | Localização |
|-----------|-------------------------------------|
| Pop.1 | S -09 °52'15.299" W -57 °55'09.345" |
| Pop.2 | S -09 °53'13.342" W -57 °54'35.524" |
| Pop.3 | S -09 °52'15.299" W -57 °54'22.707" |
| Pop.4 | S -09 °53'54.804" W -57 °55'16.943" |
| Pop.5 | S -09 °53'00.078" W -57 °54'28.363" |
| Pop.6 | S -09 °53'08.581" W -57 °54'26.351" |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina, determinada pela utilização de várias técnicas, na citogenética, é bastante empregada no monitoramento de pólen em armazenamento, de maneira a garantir a fertilidade e com isso, tornar possível o cruzamento entre genótipos de importância econômica (Souza et al., 2002).

Na avaliação da viabilidade do pólen com uso dos diferentes corantes foi constatado que entre as populações o percentual médio foi acima de 70%, porém na população 1 com o uso do lugol 1% o percentual de polens viáveis foi de 67,5% (Tabela 2) e com a fucsina 1%, foi 69,8% estes percentuais estão relacionados com possíveis irregularidades meióticas desta planta. Segundo Souza et al. (2002) a viabilidade polínica é considerada alta para valores acima de 70%, esses percentuais não causariam danos em trabalhos de melhoramento da espécie.

Quando comparadas as médias entre as plantas dentro de cada corante, foram encontradas diferenças significativas entre as populações (Tabela 2). A presença de diferenças significativas em diferentes populações dentro de uma mesma espécie são indicativos de que existe variabilidade genética entre as mesmas, resultante dos fatores abióticos. As diferenças entre os corantes dentro de cada população também foi observado, possivelmente estejam associadas com a afinidade do corante com a exine e intine do pólen, diferenciando apenas os grãos de pólen pela intensidade de coloração sem distinção da parede celular do protoplasma. Outros corantes como carmim propiônico eorceína acética em diferentes concentrações apresentam similaridade quanto ao comportamento de coloração dos grãos de pólen de diferentes plantas (Biondo & Battistin 2001; Battistin & Mattos, 2002; Karsburg & Battistin, 2005).

TABELA 2. Média da viabilidade do pólen de *Solanum paniculatum* pela coloração de cinco diferentes corantes.

| Populações | Lugol 1% | Fucsina 1% | Safranina1% | Azul de Astra + Fucsina1% | Vermelho de Metila 0,5% | CV% |
|------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|-------|
| Pop. 1 | 67,5 ^{cA} | 69,8 ^{cA} | 73,8 ^{cA} | 86,9 ^{bB} | 83,5 ^{abB} | 11,90 |
| Pop. 2 | 94,9 ^{abA} | 97,4 ^{aA} | 98,1 ^{aA} | 95,5 ^{aA} | 87,8 ^{bcA} | 5,58 |
| Pop. 3 | 95,7 ^{aA} | 92,1 ^{bA} | 94,3 ^{abA} | 96,8 ^{aA} | 95,5 ^{abA} | 3,68 |
| Pop. 4 | 94,08 ^{bA} | 94,94 ^{abA} | 92,99 ^{bA} | 94,12 ^{abA} | 91,82 ^{bA} | 1,84 |
| Pop. 5 | 96,13 ^{abA} | 94,74 ^{abA} | 97,35 ^{bA} | 93,38 ^{bA} | 94,4 ^{aA} | 2,98 |
| Pop. 6 | 94,08 ^{bA} | 96,18 ^{aA} | 93,42 ^{bA} | 92,95 ^{abA} | 94,81 ^{bA} | 2,41 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com o uso do lugol 1%, o pólen viável foi diferenciado do inviável pela coloração intensa do protoplasma (Figura 1E) e o inviável pela ausência de coloração e pelo tamanho do pólen em relação ao viável (Figura 1F). A diferenciação ao pólen viável (Figura 1A), pela fucsina 1% e safranina 1% (Figura 1G) foi realizada pela intensa coloração e maior tamanho em relação ao inviável (Figura 1B e 1H). A coloração de azul de astra 1% + fucsina 1% proporcionou uma coloração diferencial no pólen com a exine de coloração roxa e a intine azul escuro (Figura 1C e 1D).

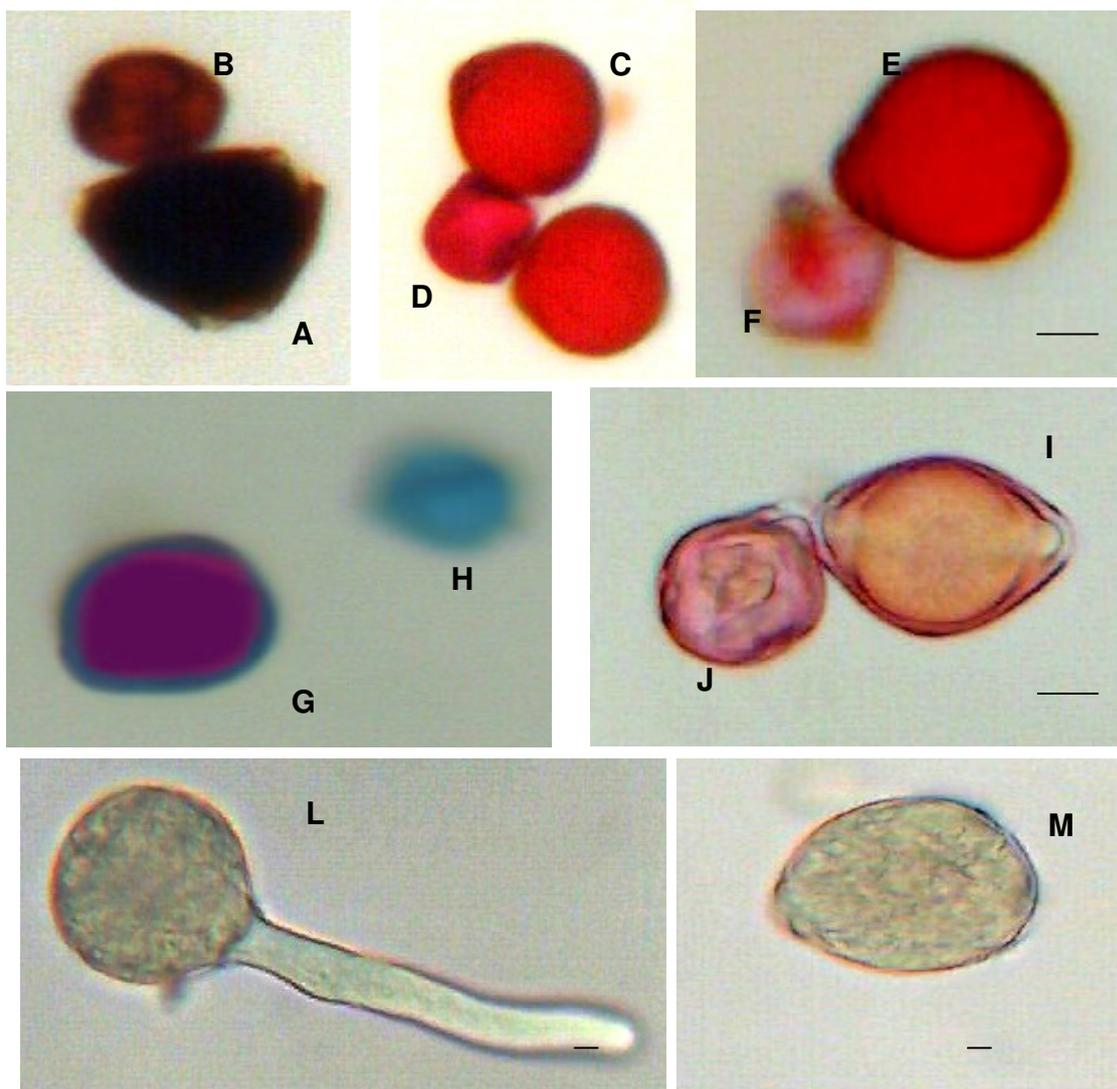


FIGURA 1. Grãos de pólen diferenciados por corantes e germinação do tubo polínico de *Solanum paniculatum* L. Observar a morfologia dos grãos de pólen viáveis e inviáveis com diferentes métodos de avaliação. Grãos de pólen corados com Lugol 1%, A) Grão de pólen normal B) Grão de pólen anormal. Grãos de pólen corados com Fucsina 1% C) Grão de pólen normal, D) Grão de pólen anormal., Grãos de pólen corados com Safranina 1%.E) Grão de pólen normal, F) Grão de pólen anormal. Grãos de pólen corados com Azul de Astra + Fucsina 1%, G) Grão de pólen normal, H) Grão de pólen anormal. Grãos de pólen corados com Vermelho Metila 0,5%, I) Grão de pólen normal, J) Grão de pólen anormal. Germinação do tubo polínico no grão de pólen, L) Tubo germinado, M) Grão de pólen sem formação de tubo polínico. Barra = 5µm.

Techio (2006) avaliando a viabilidade do pólen em acessos de capim-elefante, constatou que corantes comoorceína acética 1% e carmim propiônico 2% distinguiram os poléns viáveis e os inviáveis, porém o Reativo de Alexander (verde malaquita + fucsina ácida) apresentou dados mais acurados pela diferenciação de coloração. Em que o verde malaquita tem afinidade com a celulose presente na parede celular corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida de rosa. Desta forma, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander, 1980). Da mesma forma que foi observado com a coloração de azul de astra 1% + fucsina ácida1%.

A germinação do tubo polínico foi observada após 40 minutos em todas as populações. Na avaliação da germinação do tubo polínico dos grãos de pólen (Figura 1L) na população 6 foi observado o maior percentual de germinabilidade, 34,84%, (Tabela 3) entre as populações avaliadas. De acordo com Scorza & Sherman (1995) um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubo bem desenvolvido. Neste caso, a espécie não apresenta germinabilidade de qualidade para que possa ser utilizada para programas de melhoramento ou conservação em bancos de germoplasma. Porém este fator pode estar relacionado à solução nutritiva e também ao amadurecimento irregular dos grãos de pólen.

O carboidrato utilizado na preparação da solução nutritiva proporciona o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de cultura e fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974). A adição de boro ao meio de cultura mostra respostas variáveis conforme a espécie, e seu mecanismo de ação consistem em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (Pfahler, 1967; Askin et al., 1990).

Sendo que a terceira população teve percentuais mais baixos comparando-a com as demais. Estes percentuais podem estar relacionados com fatores abióticos e níveis de desenvolvimento dos grãos de pólen. De acordo com Souza et al. (2002) à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fertilização, após a abertura do botão floral. Nesta espécie no entanto não teve-se como objetivo avaliar a viabilidade em diferentes estágios de desenvolvimento floral e sim em pré antese.

TABELA 3. Avaliação da viabilidade polínica pela germinação do tubo polínico do grão de pólen de *Solanum paniculatum*.

| Germinação | Total de Poléns | Pólen viáveis% |
|------------|-----------------|---------------------|
| Pop. 1 | 768 | 29,50 ^{ab} |
| Pop. 2 | 783 | 32,30 ^a |
| Pop. 3 | 753 | 16,70 ^{bc} |
| Pop. 4 | 762 | 20,78 ^b |
| Pop. 5 | 789 | 28,83 ^{ab} |
| Pop. 6 | 765 | 34,84 ^a |
| CV (%) | | 26,35 |

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Contudo, a eficiência na fertilização está relacionada tanto à viabilidade quanto à germinação polínica e é crucial para o sucesso no melhoramento genético, Souza et al. (2002). Os testes de germinação demonstraram um baixo índice de grãos de pólen germinados (Tabela 3) estes resultados podem estar relacionados a dados falso positivos quando relacionados os dados da viabilidade polínica obtida pela coloração de diferentes corantes que podem apresentar coloração intensa dos grãos de pólen pela afinidade do corante e da intine e ainda pelo depósito de amido. Mas quando testada a germinabilidade polínica é possível acompanhar de forma realista o estado dos gametas masculinos quanto ao tempo de crescimento e quantidade de grãos de pólen potencialmente viáveis.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização da germinação para testes de viabilidade de pólen de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), usando o meio e condições descritas na metodologia, fornece resultados mais concretos que os testes realizados com corantes. Já observação baseada na coloração dos grãos de pólen em corante superestima a porcentagem de pólen viáveis, dando impressão que o método de coloração é mais viável. Porém este trabalho mostra ainda que é possível utilizar corantes como o lugol na avaliação da viabilidade polínica obtendo-se resultados satisfatórios quando do uso de outros corantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKORODA, M. D. Floral biology in relation to hand pollination of white yam. **Euphytica** v.32, n.3, p.831-838, 1983.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, p. 13-18, 1980.
- ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. **Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens**. Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise, Dergise, v. 27, n. 03, p.105-116, 1990.
- BATTISTIN, A.; MATTOS, A.C. F. Número de cromossomos, comportamento meiótico e viabilidade do pólen em três espécies de *Stylosanthes* Sw. (Leguminosae-Papilionoideae) nativas do Sul do Brasil. **Bioikos**, v.16, n.1-2, p.13-7, 2002.
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae-Faboideae), nativas na região Sul do Brasil. **Bioikos**, v.15, n.1, p. 39-44, 2001.
- CRUZ, C. D. Programa Genes. V.G. UFV. 2007.
- GRANT, V. **Genetics of flowering plants**. Columbia University Press, New York, 1975.
- KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Estimativa da viabilidade do pólen com diferentes corantes, em cinco espécies de Urticaceae do Rio Grande do Sul. **Revista Científica Rural**. V. 10, n 2p. 23-29, 2005.

- LEITÃO FILHO, H.F., ARANHA, C. & BACCHI, O.. **Plantas invasoras de culturas no estado de São Paulo**. Vol. 2. HUCITEC e AGIPLAN, São Paulo, 1975.
- LINSKENS, H.F.; CRESTI, M. The effect of temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers. **Proc. K. Ned. Akad. Wet.**, Amsterdam, v. 91, p. 369-375, 1988.
- PFÄHLER, P.L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen; calcium and boron effects. **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v. 45, p.839-845, 1967.
- SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). Fruit breeding. New York: John & Sons, p.325-440, 1995.
- SHIVANNA, K.R.; JOHRI, B.M. **The angiosperm pollen**: structure and function. New Dehli: Wiley Eastern Ltd., 1992.
- SOUZA M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa degener*). **Ciência Agrotécnica**., Lavras. V.26, n.6, p.1209-1217, nov./dez., 2002.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen biology biochemistry management**. Heidelberg Berlin, 1974.
- TECHIO, V.H. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*P. Glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.
- TRABELSI, M. A. A reliable method for testing fruit setting ability in tomato using "in vitro pollen germination. **Meded. Fac. Lanbouwwet. Rijksuniv.**, v.50, n.4, p.1343-1356, 1985.
- WILLIS, J.C. **A dictionary of flowering plants and ferns**. University Press, Cambridge,1973.
- DANTAS, A. C.; 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**. v.27, n. 3, p. 356-359, 2005.
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 28, n.1, p.5-7, 2006.
- NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**. n.72, p. 527-536, 1993.

★★★★★