

SELEÇÃO *IN VITRO* DE MAMONA PARA RESISTÊNCIA A ESTRESSE SALINO: FOCO NAS PLANTAS ESPONTÂNEAS

Lucas Aragão da Hora Almeida

Luana Santos Sampaio; Mateus Ribeiro Sant'ana e Claudio Lucio Fernandes Amaral

1 RESUMO

A seleção de gametófitos que respondem a determinados tratamentos de forma diferenciada é de grande importância em programas de melhoramento vegetal. Portanto, foi objetivo deste trabalho avaliar o efeito do estresse salino sob a taxa de viabilidade polínica em mamona (*R. comunnis* L.). Foram coletadas 300 flores de 60 plantas espontâneas, previamente selecionadas com base em seu aspecto fitossanitário, a partir de duas populações obtidas no município de Jequié - BA. Para seleção *in vitro* foram testados 5 meios de cultura com diferentes concentrações de NaCl, quais sejam: M1 = 0; M2 = 25; M3 = 50; M4 = 75 e M5 = 100 (mM). Foram observadas variações na taxa de germinação dos grãos de pólen, tanto para uma, quanto para outra população. Para todas as plantas de cada uma das populações estudadas, a taxa de germinação de pólen foi maior no meio de cultura contendo 0mM de NaCl, o que significa que o sal influencia esta característica.

UNITERMOS - Polén, Germinação, Fator Estressante, NaCl.

IN VITRO SELECTION OF CASTOR BEAN TO SALT STRESS RESISTANCE: FOCUS ON SPONTANEOUS PLANTS

2 ABSTRACT

The gametophytic selection that reacts to certain treatments in a differentiated manner is of great importance in plant breeding programs. The objective of this work was to evaluate the saline stress effect under the viability pollinic rate in castor oil plant (*R. comunnis* L.). Three hundred flowers of 60 spontaneous plants were collected, previously selected based on their phytosanitary aspect, from two populations obtained in the city of Jequié - BA. For *in vitro* selection 5 culture medium were tested with different NaCl concentrations, which were M1 = 0; M2 = 25; M3 = 50; 75 M4 = and M5 = 100 (mM). Variations were observed in the pollen grains germination rate, for both populations. All plants of each studied populations had pollen germination rate higher in the culture medium containing 0mM of NaCl, which means that the salt influences this characteristic.

KEY WORDS - Pollen, Germination, Stress Factor, NaCl

3 INTRODUÇÃO

Em programas de melhoramento vegetal, o conhecimento da capacidade germinativa do pólen da espécie-alvo assume importância primordial, quando se objetiva maior eficiência nos cruzamentos artificiais em diferentes fases de seleção (Campo - Dall'orto et al., 1985). A viabilidade polínica é um fator de grande importância para a biodiversidade das plantas por evidenciar a capacidade reprodutora masculina e permitir a formação de diferentes combinações entre os alelos. Assim, quanto maior a taxa de germinação do pólen, tanto maior tende a ser a variabilidade genética das espécies, sendo um aspecto relevante quando se pretende conservar, manejar e utilizar o germoplasma disponível (Gomes et al., 2003).

O estudo do comportamento germinativo dos grãos de pólen de uma espécie pode revelar diferenças genéticas entre genótipos (Pfahler et al., 1997). Por outro lado, pode haver variação da viabilidade polínica entre genótipos iguais, porém ela é, geralmente, bem maior entre os diferentes (Loguercio & Battistin, 2004). A característica de interesse agrônomo pode estar correlacionada com o tempo de germinação e a velocidade de formação dos tubos polínicos (Hormaza & Herrero, 1992). Esta informação deve ser utilizada pelo melhorista em programas de fitomelhoramento via seleção *in vitro*, como exemplo cita-se a resistência à salinidade, pois o pólen pode ser empregado para testes de polinização controlada, de procedência e de progênes, gerando materiais superiores (Souza – Lang & Pinto, 1997).

A seleção gametofítica para alterar a constituição genética da geração esporofítica subsequente foi sugerida como uma ferramenta para os programas de melhoramento vegetal (Tanksley, 1981), devido à probabilidade que ela tem de influenciar ativamente a evolução das culturas agrônomicas e a significativa similaridade da expressão gênica encontrada nas fases haplóide e diplóide (Pedersen et al., 1987). A transmissão dos genes desejáveis, portanto poderá ser favorecida em consecutivas polinizações *in vivo* (Hormaza & Herrero, 1992), caracterizando um método de seleção.

A germinação *in vitro* do pólen foi amplamente estudada em diversas espécies (Shivanna & Johri, 1985; Shivanna & Rangaswamy, 1992), destacando-se entre elas, além da mamona, as seguintes oleaginosas, quais sejam: Algodão, Soja, Canola, Dendê, Girassol, Babaçu, Amendoim, etc. Devido à não coincidência de floração, o que ocorre na mamona, é preciso, muitas vezes, armazenar o pólen colhido em um ano, para ser utilizado em outro. Neste caso, é recomendável testar a viabilidade do mesmo, antes de sua utilização (Sousa et al., 2004).

A viabilidade refletindo germinabilidade é considerada uma medida de fertilidade masculina bastante empregada no monitoramento de pólen armazenado, de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos superiores que apresentam floração em épocas distintas (Dafni, 1992; Kearns & Inouye, 1993).

Alta salinidade do solo pode resultar, em nível quantitativo, na redução drástica do número de pólenes, bem como, em nível qualitativo, na diminuição da porcentagem de germinação e na taxa de crescimento do tubo polínico, refletindo em baixa fertilidade do gametófito masculino, o que ocasionaria direta ou indiretamente em menor produção de frutos e sementes devido à produção de plantas anormais (Heslop - Harrison, 1987; Esteves & Suzuki, 2008).

Na mamona, são estas partes que apresentam importância comercial. Portanto, foi objetivo deste trabalho avaliar a mamoneira quanto à tolerância ao estresse salino

por meio da viabilidade do pólen, a fim de que se possa utilizar o teste de germinação *in vitro* na seleção de plantas para melhor performance em ambiente desfavorável devido à salinidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Estudo:

As investigações foram conduzidas, nos meses de fevereiro a março de 2009, no Laboratório de Genética Experimental (LABGENEX) do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizada no Campus de Jequié - BA, Brasil.

4.2 Obtenção das Plantas:

Foram marcadas 60 plantas espontâneas, previamente, selecionadas com base em seu aspecto fitossanitário, a partir de 2 populações encontradas no centro (População "A" - 30 indivíduos) e nos bairros periféricos (População "B" - 30 indivíduos) da cidade de Jequié-BA, uma região de transição entre Caatinga e Mata Atlântica (Latitude: -13°51'27"S, Longitude: 40°05'01"W e Altitude 216m).

4.3 Seleção *In Vitro*:

Para realizar o teste de germinação *in vitro* do pólen, foram coletadas, ao acaso, 300 flores obtidas das 30 plantas previamente selecionadas em cada uma das populações supracitadas. Estas foram retiradas dos indivíduos, no início da manhã, sendo posteriormente levadas para o Laboratório de Genética Experimental, onde foram realizados os experimentos.

Para a seleção *in vitro*, foi feito um meio de cultivo contendo 10% de sacarose, 1g de ágar e 100 mL de água destilada. Foram testados 5 meios de cultura com diferentes concentrações de NaCl, quais sejam: M1 = 0; M2 = 25; M3 = 50; M4 = 75 e M5 = 100 mM. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições. O pH destes meios foi ajustado para 6,5, aferido por meio de pHmetro digital. A germinação *in vitro* do pólen foi testada na temperatura de 28°C, por um período de incubação 4h.

Os meios foram vertidos em lâminas de vidro escavadas, cerca de 1mL em cada uma delas, e os grãos de pólen foram polvilhados sobre eles. As lâminas foram colocadas em câmara úmida simulada (placas de Petri com papel absorvente umedecido) e incubadas em B.O.D. com temperatura controlada. Após 4 horas, as lâminas foram retiradas e, imediatamente, observadas com auxílio de um microscópio óptico.

Foram analisados aleatoriamente 500 gametófitos masculinos por lâmina e contabilizados os que germinaram. Para fins de análise, foram contabilizados os viáveis e inviáveis, sendo considerado germinado, o pólen cujo tubo polínico atingiu comprimento igual ou maior que seu próprio diâmetro. Para melhor visualização, foi utilizado o corante Azul de Amã, o qual é específico para esta finalidade, permitindo uma maior eficácia na identificação dos tubos polínicos.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de média de Tukey, a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas variações significativas na taxa de germinação dos grãos de pólen da mamona entre os tratamentos extremos (0 e 100mM de NaCl), tanto para a população A, quanto para a população B (Tabela 1), significando que o sal influenciou esta característica, o que é concordante com Silva (2004).

Tabela 1. Médias das taxas de germinação in vitro dos grãos de pólen da população A (Centro) e população B (Bairros Periféricos) da mamona; Jequié – BA, 2009

Tratamentos Concentrações de NaCl	Médias	
	População A	População B
0 mm	40,50 a	36,02 a
25 mm	36,38 a b	34,22 a b
50 mm	34,66 a b	33,46 a b
75 mm	21,38 a b	15,94 a b
100 mm	7,46 b	6,60 b

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

Conforme Marcellán Camadro (1996), a sacarose presente no meio, promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, fornecendo, ainda, energia para o desenvolvimento do tubo polínico.

De acordo com Heslop - Harrison (1987), quando este carboidrato encontra-se associado à outra substância, como por exemplo o NaCl, pode ocorrer um comprometimento da germinação polínica, o que foi verificado neste experimento, o que, segundo Esteves & Suzuki (2008), pode ser devido a alta susceptibilidade a ação de injúria provocada pelo sal em meio de cultura.

Para todas as plantas de cada uma das populações, a taxa de germinação de pólen foi maior no meio de cultura contendo 0mM de NaCl. Já que, mesmo em pequenas concentrações, a salinidade pode ser considerada fator limitante ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Rhoades et al. 1997) por afetar vários processos fisiológicos, dentre os quais a fotossíntese, reduzindo assim a produção e alocação de biomassa (Shannon et al. 1994).

De acordo com Silva et al. (2000), o crescimento do tubo polínico é considerado fundamental para o pegamento de frutos, por conseguinte, para o desenvolvimento das sementes que, na mamona, é a parte de interesse comercial. Em função do aumento da salinidade, foi verificado a diminuição da taxa de germinação do pólen da mamona tanto para a população A, (Figura 1) quanto para população B (Figura 2).

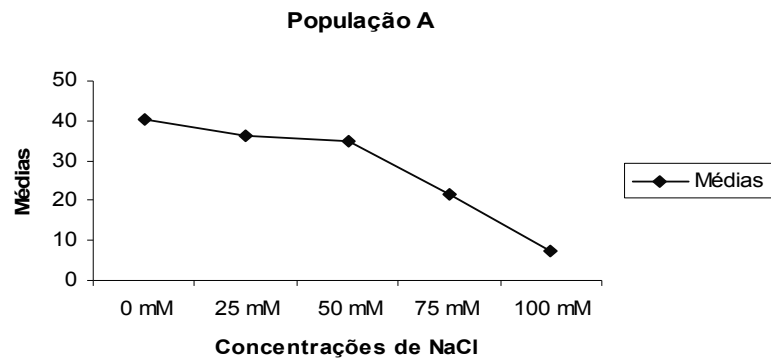


Figura 1. Médias de germinação de pólen em *Ricinus communis L.* em função do aumento das concentrações de NaCl na população A.

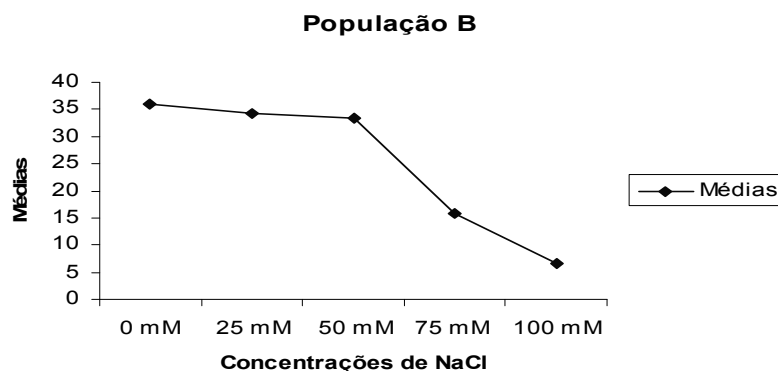


Figura 2. Médias de germinação de pólen em *Ricinus communis L.* em função do aumento das concentrações de NaCl na população B.

Segundo Almeida *et al.*, (2002), a germinação *in vitro* de pólen apresenta alta correlação com a fertilização no campo. Porém, de acordo com Ferreira *et al.*, (2007), a fertilização tende a ser menor que a germinação *in vitro*, devido à influência de vários fatores, como receptividade do estigma, barreiras genéticas e influências ambientais como temperatura, umidade relativa, etc.

Conforme Souza *et al.* (2002), a germinação do pólen é um fator importante para o melhoramento de plantas, uma vez que o material genético presente em cada grão de pólen, conseqüente das recombinações, possibilita a transmissão de genótipos diversificados. Entretanto, por ser um método artificial, na germinação *in vitro* pode ocorrer uma diminuição no tamanho do tubo polínico, quando comparado ao crescimento em condições naturais (Azevedo & Pio, 2002).

6 CONCLUSÃO

Todas as plantas apresentaram pólen resistente à salinidade, apesar de se ter verificado taxas variáveis de germinação polínica entre as concentrações extremas. O aumento da concentração de NaCl nos meios de cultura testados influenciou na taxa de germinação do pólen da mamona causando uma diminuição da formação de tubos polínicos.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. C. S.; AMORIM, E. P.; SERE-NO, M. J. C. M.; BARBOSA NETO, J. F.; VOLTZ, A.H. Efeito de desidratante e temperatura na estocagem de pólen de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2002. Florianópolis. **Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo**. Sete Lagoas: ABMS/ Embrapa Milho e Sorgo/EPAGRI, 2002. p. 480.

AZEVEDO, F. A.; PIO, R. M. Pollination influence on seeds of murcott tangor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 468-471, ago. 2002.

CAMPO - DALL'ORTO, F. A. et al. Análise do pólen em dezoito cultivares de macieira. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 421-427, 1985.

DAFNI, A. Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series). New York: University Press, 1992. 250 p.

ESTEVES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 662-679, 2008.

FERREIRA, C.A; PINHO, E.V.R.V.; ALVIM, P.O.; ANDRADE, V.; SILVA, T.T.A.; CARDOSO; D.L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

GOMES, P. R. et al. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n 1, p 14-17, 2003.

HESLOP – HARRISON, J. Pollen germination and pollen-tube growth. **International Review of Cytology**, Knoxville - USA, v. 107, p. 01-78, 1987.

HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Pollen selection. **Theoretical and Applied Genetics**, New Brunswick, v. 83, p. 663-67, 1992.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993, 583 p.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul- Brasil. **Revista da Faculdade de Zootecnia: Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana - RS, v. 11, n. 1, p. 192-205, 2004.

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

PEDERSEN, S.; SIMONSEN, V.; LOESCHCKE, V. Overlap of gametophytic and sporophytic gene expression in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, New Brunswick, v. 75, p. 200-206, 1987.

PFAHLER, P. L.; PEREIRA, M. J.; BARNETT, R. D. Genetic variation for *in vitro* sesame pollen germination and tube growth. **Theoretical and Applied Genetics**, New Brunswick, v. 95, p. 1218-1222, 1997.

RHOADES, J. D.; KANDIAH, A.; MASHALI, A. M. The use of saline waters for crop production. Rome: FAO, 1997, 133 p. (FAO Irrigation and Drainage paper, v. 48).

SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M.; FRANCOIS, L. E. Whole-plant response to salinity. In: WI-LKINSON, R. E.(Ed.) **Plant environment interactions**. New York : Marcel Dekker, p. 199-244, 1994.

SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. **The angiosperm pollen: structure and function**. New Dehli: Wiley Eastern, 1985. 374 p.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. Pollen biology : a laboratory manual. Berlin; New York: Springer -Verlag, 1992. 119 p.

SILVA, S. M. S. **Germinação, crescimento e desenvolvimento de genótipos de mamoneira irrigados com águas salinas**. 2004. 74p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2004.

SILVA, A. C. **Épocas de poda e métodos de polinização na produção da pinheira (*Annona squamosa* L.)**. 2000. 101 f. Tese (Mestrado em Fruticultura - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2000.

SOUSA, R. F.; MOTTA, J. D.; GONZAGA, E. N.; FERNANDES, M. F.; SANTOS, M. J. Aptidão agrícola do assentamento Venâncio Tomé de Araújo para a cultura da mamona (*Ricinus communis*). **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, 1º semestre, v. 4, n. 001, 2004.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microesporogênese 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, 2002.

SOUSA-LANG, V. A. de; PINTO, J. E. J. Efeito da concentração de ágar na germinação *in vitro* do pólen de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. KTZE. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 34, p. 55-63, 1997.

TANKSLEY, S. D.; ZAMIR, D.; RICK, C. M. Evidence for extensive overlap of sporophytic and gametophytic gene expression in *Lycopersicon esculentum*. **Science**, New York, v. 213, p. 453-455, 1981.