



U E S B

**SISTEMA REPRODUTIVO DE *Portulaca grandiflora* HOOK COM VISTAS AO MELHORAMENTO VEGETAL**

**JOSEFA WILMA DOS SANTOS FONSECA**

**2010**

JOSEFA WILMA DOS SANTOS FONSECA

**SISTEMA REPRODUTIVO DE *Portulaca grandiflora* HOOK COM  
VISTAS AO MELHORAMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Prof. *D.Sc.* Cláudio Lúcio Fernandes Amaral

VITÓRIA DA CONQUISTA  
BAHIA-BRASIL  
2010

Aos meus amados pais, Maria Francisca dos Santos e José Hígino da Fonseca, e ao meu digníssimo esposo, André Alves da Silva

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu adorável Deus, Autor da minha fé, Fonte de luz, inspiração e sabedoria em todos os momentos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelo apoio institucional e pela oportunidade de mais uma formação acadêmica;

Ao Professor Dr. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, pela orientação e incentivo constante;

Aos professores José Emílio e Tiyoko Rebouças, por terem aceitado o convite de fazer parte da banca avaliadora;

Ao Professor Dr. Anselmo Eloy Silveira Viana, pela colaboração, sugestão e dedicação;

Ao colega Danilo, pela ajuda e atenção;

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Agronomia, por terem contribuído na minha formação;

Aos meus amados pais, Maria Francisca e José Higino, pelos incentivos constantes e realização deste sonho;

Ao meu esposo André, que sempre esteve comigo em todos os momentos, durante toda esta minha caminhada;

Aos meus queridos colegas e amigos do mestrado, que juntos estiveram comigo buscando sempre o crescimento intelectual, pelo carinho, amizade e presteza; em especial à amiga, Ana Paula Porto, pela atenção e ajuda na escrita desta dissertação;

Ao Sr. Maurício, Sr. Roberto e demais funcionários e estagiários da UESB, cujas colaborações permitiram o sucesso deste trabalho;

A todos aqueles que, embora não tiveram seus nomes citados, contribuíram de alguma forma na elaboração deste projeto;

Os meus mais sinceros agradecimentos.

“Com a força que Cristo me dá, posso enfrentar qualquer situação”.  
(Filipenses 4:13).

## RESUMO

FONSECA, J.W.S. **Sistema reprodutivo de *Portulaca grandiflora* Hook com vistas ao melhoramento vegetal**. Vitória da Conquista - BA: UESB, 2010. 72 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia)\*

*Portulaca grandiflora* Hook, conhecida popularmente como onze horas, é uma espécie da família Portulacaceae, que é constituída por plantas de hábito herbáceo e arbustivo, muitas vezes, suculentas e, frequentemente, contendo mucilagem nas células parenquimáticas do caule e das folhas. Seu uso ornamental é devido suas flores serem vistosas, com colorido atraente. O néctar causa forte atração aos polinizadores. Tal fato favorece a polinização cruzada, principalmente, por insetos. O objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos da biologia floral, como: descrição da morfologia floral; determinação da antese; disponibilidade, viabilidade, germinação *in vitro* e *in vivo* e conservabilidade dos grãos de pólen; receptividade dos estigmas; mecanismos reprodutivos e seus visitantes florais. Foi verificado que a *P. grandiflora* apresenta antese assincrônica, com maior frequência de abertura da flor às 8h. Quanto ao estudo do pólen, foi detectado que houve um declínio ao longo do dia em relação à disponibilidade. Já a viabilidade se mostrou elevada ao longo do dia, com valores superiores a 80%. Na germinação *in vitro*, houve diferença estatística entre os meios utilizados, sendo que o tratamento com 2,5g de sacarose foi superior aos demais com 5,0g sacarose + ácido bórico, 15g de sacarose, 5g de sacarose, 10g sacarose e 10g sacarose + ácido bórico. Quanto à germinação *in vivo*, foi verificado que a formação do tubo polínico ocorreu somente na pós-antese. Sua conservação com 90 dias demonstrou níveis de viabilidade de 62,10%. O estigma apresentou receptividade, desde a pré-antese até a pós-antese. O sistema reprodutivo preferencial da espécie é a polinização cruzada (alogramia). Dentre os visitantes florais coletados, a *Apis mellifera* foi o inseto mais comum. Estas informações são relevantes aos melhoristas que desejam fazer seleção de genótipos ou hibridações em programas de melhoramento, contribuindo, assim, para o potencial da espécie estudada.

**Palavras-chave:** Biologia floral, cruzamento controlado, polinizadores, estigma.

\* Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, D.Sc., UESB.

## ABSTRACT

FONSECA, J.W.S. **Reproductive system of *Portulaca grandiflora* Hook with a view to breeding.** Vitória da Conquista - BA: UESB, 2010. 72 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) \*

*Portulaca grandiflora* Hook, popularly known as eleven hours, is a species of the family Portulacaceae, which consists of habit herbaceous plants and shrubs, often succulent and, frequently, containing mucilage cells in the parenchyma of the stem and leaves. Its use is due to its ornamental flowers are showy, with attractive color. Nectar cause strong attraction to pollinators. This fact favors cross-pollination, especially by insects. The objective was to study aspects of floral biology, as description of the floral morphology, determination of anthesis; availability, viability, germination *in vitro* and *in vivo* and storability of grains of pollen; receptivity of the stigmas; reproductive mechanisms and their floral visitors. It was found that *P. grandiflora* has asynchronous anthesis, with a higher frequency of flower opening between 7:30 and 8am. The study of pollen was found that there was a decline throughout the day regarding the availability. Viability proved high throughout the day, with values above 80%. *In vitro* germination was no statistical difference between the means employed, and the treatment with 2.5 g of sucrose was higher than others with sucrose + 5.0 g boric acid, 15g sucrose, 5 g sucrose, 10g sucrose and 10g sucrose + acid Boric. The Germination *in vivo* was found that the formation of the pollen tube occurred only in post-anthesis. Preservative for up to 90 days showed levels of viability up to 62.10%. Stigma receptivity made from pre-anthesis to post-anthesis. The reproductive system of the preferred species is the cross-pollination (allogamy). Among the flower visitors collected, the *Apis mellifera* was the most common. This information is relevant for breeders who wish to make the selection of genotypes or hybridizations in breeding programs, contributing to the potential of this specie.

**Keywords:** Floral biology, controlled hybridization, pollinators, stigma.

\* Adviser: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D. Sc.*, UESB.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Portulaca grandiflora</i> Hook. Vitória da Conquista - BA, 2009.....	19
Figura 2	Muda de <i>P. grandiflora</i> Hook em casa de vegetação. Vitória da Conquista - BA, 2009.....	31
Figura 3	Muda de <i>P. grandiflora</i> Hook transplantada em vaso. Vitória da Conquista - BA, 2009.....	31
Figura 4	Plantas de <i>P. grandiflora</i> Hook conduzidas em vasos mantidos em ambiente aberto. Vitória da Conquista - BA, 2009.....	32
Figura 5	Tubos <i>eppendorf</i> contendo anteras de <i>P. grandiflora</i> para serem armazenados em geladeira e em <i>freezer</i> . Vitória da Conquista - BA, 2009.....	36
Figura 6	Placas de Petri com meios de cultura para germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen de <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista - BA, 2009.....	37
Figura 7	Etiquetas de identificação. Vitória da Conquista - BA, 2009.....	39
Figura 8	Botões florais de <i>P. grandiflora</i> protegidos por sacos de papel. Vitória da Conquista - BA, 2009.....	40
Figura 9	Estigma bifido de cor amarela de <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista - BA, 2009.....	43
Figura 10	Grãos de pólen normais/viáveis (A) e anormais/inviáveis (B) de <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista - BA, 2009.....	46
Figura 11	Conservabilidade do pólen de <i>P. grandiflora</i> em carmim acético a 1%. Vitória da Conquista - BA, 2009. (400X).....	49
Figura 12	Germinação <i>in vitro</i> do grão de pólen de <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista - BA, 2009.....	51
Figura 13	Germinabilidade do grão de pólen de <i>P. grandiflora</i> em presença de Azul-de-Amã, segundo a técnica de Johansen (1940). Vitória da Conquista - BA, 2009...	55

Figura 14	Receptividade do estigma de <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista – BA, 2009.....	56
Figura 15	Visitante floral: <i>Apis mellifera</i> de <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista - BA, 2009.....	59

### LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis de <i>P. grandiflora</i> ao longo do dia, observados em 5, 6 e 7 de maio de 2009. Vitória da Conquista –	45
-----------	---	----

	BA.....	
Gráfico 2	Estimativa do percentual de grãos de pólen viáveis de <i>P.grandiflora</i> , nos dias 5, 6 e 7 de maio de 2009. Vitória da Conquista – BA.....	47
Gráfico 3	Percentual da germinabilidade <i>in vivo</i> dos grãos de pólen de <i>P.grandiflora</i> , observados em 5, 6 e 7 de maio de 2009. Vitória da Conquista – BA.....	54

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxa da conservabilidade (%) dos grãos de pólen de <i>P. grandiflora</i> , armazenados aos 30, 60 e 90 dias em dois ambientes. Vitória da Conquista – BA, 2009.....	48
----------	---	----

Tabela 2	Médias da porcentagem de germinação dos grãos de pólen de <i>P. grandiflora</i> em diferentes meios de cultura. Vitória da Conquista – BA, 2009.....	51
Tabela 3	Taxa de Pegamento (%) dos cruzamentos naturais e artificiais em <i>P. grandiflora</i> . Vitória da Conquista – BA, 2009.....	57

#### **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

Cm	- Centímetros
CV	- Coeficiente de Variação
GP	- Grão de Pólen

IAC - Instituto Agrônomo de Campinas  
JB/FZB-RS - Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande  
do Sul  
m - Metros  
mm - Milímetros  
n° - Número  
SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas  
SISVAR - Software de Análises Estatísticas e Planejamento de  
Experimentos  
Tx - taxa  
UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
Var - Variedade  
°C - Graus centígrados

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Melhoramento Genético de Plantas Ornamentais.....	17

2.2 Classificação Botânica.....	19
2.3 Aspectos da Biologia Floral e o Estudo dos Sistemas	
Reprodutivos.....	20
2.3.1 Aspectos da Biologia Floral.....	20
2.3.2 Disponibilidade dos Grãos de Pólen.....	21
2.3.3 Viabilidade dos Grãos de Pólen.....	21
2.3.4 Conservabilidade dos Grãos de Pólen.....	24
2.3.5 Germinabilidade <i>in vitro</i> dos Grãos de Pólen.....	25
2.3.6 Germinabilidade <i>in vivo</i> dos Grãos de pólen.....	26
2.3.7 Receptividade dos Estigmas.....	27
2.3.8 Estudo dos Sistemas Reprodutivos.....	27
2.4 Visitantes florais.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Área Experimental.....	30
3.2 Material Vegetal.....	30
3.3 Descrição da Morfologia Floral.....	33
3.4 Determinação dos Estágios de Desenvolvimento Floral.....	33
3.5 Estudo dos Grãos de Pólen e do Estigma.....	33
3.5.1 Disponibilidade dos Grãos de Pólen.....	33
3.5.2 Viabilidade dos Grãos de Pólen.....	34
3.5.3 Conservabilidade dos grãos de pólen.....	35
3.5.4 Germinabilidade <i>in vitro</i> dos Grãos de Pólen.....	36
3.5.5 Germinabilidade <i>in vivo</i> dos Grãos de pólen.....	38
3.5.6 Receptividade dos Estigmas.....	38
3.6 Estudos dos Sistemas Reprodutivos.....	39
3.7 Visitantes Florais.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Descrição da Morfologia Floral.....	42
4.2 Determinação dos Estádios de Desenvolvimento Floral.....	44
4.3 Disponibilidade dos Grãos de Pólen.....	45
4.4 Viabilidade dos Grãos de Pólen.....	46
4.5 Conservabilidade dos Grãos de Pólen.....	48
4.6 Germinabilidade <i>in vitro</i> dos Grãos de Pólen.....	50
4.7 Germinabilidade <i>in vivo</i> dos Grãos de Pólen.....	53
4.8 Receptividade dos Estigmas.....	55
4.9 Estudos dos Sistemas Reprodutivos.....	57
4.10 Visitantes Florais.....	58
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

## 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 *Portulaca grandiflora* com emprego ornamental (LORENZI e MATOS, 2002).

Devido à importância ornamental de *Portulaca grandiflora*, veio o interesse de estudar essa espécie vegetal.

Em março de 2006, foram encontrados exemplares de uma espécie ou variedade botânica do gênero *Portulaca* vegetando sob sol pleno em solo arenoso, no município de São Francisco de Assis, por profissionais do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (JB/FZB-RS). Observados a rara ocorrência e o excelente aspecto ornamental, 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 aos aspectos taxonômicos na identificação da espécie ou variedade, fitotécnicos na adubação e condução, em vasos e embriológicos, na viabilidade do pólen, germinação de sementes e identificação do sistema reprodutivo (LATTUADA e outros, 2007).

É notória a necessidade da indústria nacional e instituições de fomento investir em pesquisa e desenvolvimento para que sejam alcançados os padrões de qualidade exigidos pelo mercado. Apesar de ter sido encontrado na literatura estudos, ainda são poucas as informações acerca das espécies, principalmente, com a *P. grandiflora*, mostrando a relevante necessidade de aprimoramento dos conhecimentos sobre os aspectos da biologia floral.

O estudo da biologia floral é de fundamental importância, tanto para subsidiar a condução de programas de melhoramento genético de plantas, por auxiliar na definição de métodos mais apropriados a ser usados, quanto para o correto manejo de determinada cultura.

Anderson (1995) concorda que, além de definir estratégias adequadas de melhoramento, o conhecimento acerca da biologia floral das espécies vegetais permite compreender melhor sua história evolutiva e os mecanismos envolvidos, e pode ser uma importante ferramenta no estabelecimento de programas de conservação da espécie.

O pólen é o material básico utilizado nas técnicas de hibridação. A avaliação do desenvolvimento biológico de grãos de pólen é fundamental para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permite obter maior sucesso nos cruzamentos realizados com a finalidade de obter novos híbridos e aumentar a variabilidade.

Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas, é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade. 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 via intercâmbio com outros países. Por outro lado, devido a 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 (EINHARDT e outros, 2006).

A receptividade dos estigmas é um fator fundamental na determinação do melhor período de deposição do pólen na flor. Normalmente, produz substâncias viscosas que facilitam a aderência do mesmo, garantindo, provavelmente, a fertilização com formação de frutos e sementes (SOUZA e outros, 2002).

As técnicas de manipulação genética devem ser escolhidas de acordo com as formas de reprodução, ou seja, se é sexual ou assexual, ou a combinação das duas; a natureza das estruturas florais; a proporção de natureza do pólen; o grau e o tipo de auto-incompatibilidade e o efeito da segregação sobre o vigor.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar o sistema reprodutivo e os visitantes florais de *Portulaca grandiflora* Hook, visando fornecer subsídios aos programas de melhoramento genético e no desenvolvimento de estratégias de uso e conservação de germoplasma.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Melhoramento Genético de Plantas Ornamentais**

Segundo Borém (1999), o melhoramento de plantas nasceu com o início da agricultura. Na verdade, é difícil precisar se foi a agricultura que incentivou a prática do melhoramento de plantas pelos primeiros agricultores ou vice-versa. Provavelmente, ambos evoluíram paralelamente na direção de aumentos na qualidade e na produtividade das culturas domesticadas pelo homem. Assim, dos primórdios da agricultura até hoje, o melhoramento passou por muitas modificações no exercício de sua prática.

O melhoramento genético de plantas ornamentais tem como objetivo a obtenção de plantas que tenham valor comercial e que sejam competitivas com os híbridos já disponíveis no mercado, ou seja, que os novos lançamentos sejam vistos como novidades ao mercado e que sejam mais vantajosos por algum motivo em relação aos híbridos em comercialização. O valor comercial de uma nova cultivar inclui a beleza da planta como um todo (representada por boa coloração das flores e folhas, tamanho e número de flores e boa formação de folhas) e as vantagens culturais: facilidade de cultivo, tempo de desenvolvimento, durabilidade da flor, resistência a condições adversas e resistência a pragas e doenças (FILLIETTAZ, 2007).

O mercado mundial de plantas ornamentais encontra-se em expansão. Este é extremamente dinâmico e demanda lançamento de novidades constantemente. Para suprir as necessidades do agronegócio, é fundamental um programa de melhoramento genético sincronizado com as exigências do mercado consumidor (FILLIETTAZ, 2007).

O Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), desde a década de 1970, introduz e pesquisa plantas ornamentais, acumulando grande patrimônio institucional com, aproximadamente, 700 espécies de palmeiras, 2.000 de arbóreas, além de inúmeras herbáceas ornamentais. Com isso, o IAC se tornou instituição pioneira na domesticação e no melhoramento genético de plantas ornamentais no Brasil (TOMBOLATO e outros, 2004).

Essas plantas podem ser obtidas por meio de dois processos que atualmente fazem parte de um programa de melhoramento genético: por meio de cruzamentos entre plantas que apresentam características de interesse e via técnicas de manipulação genética. No processo de cruzamento convencional, o pólen do parental masculino é transferido ao parental feminino com o objetivo de transmitir as melhores características dos parentais às novas plantas que serão obtidas a partir da germinação das sementes resultantes desse cruzamento. Durante o desenvolvimento das plantas, as que apresentam as características desejáveis são selecionadas. As técnicas de manipulação genética estão sendo cada vez mais utilizadas como instrumento de obtenção de novas cultivares de ornamentais. Essas técnicas, além de focarem a obtenção de fenótipos diferenciados, e até mesmo difíceis e complexos de serem obtidos por meio do melhoramento convencional, tem sido cada vez mais empregadas na obtenção de cultivares resistentes às doenças ou pragas (FILLIETTAZ, 2007).

Segundo Fáril e Melo (1996), a micropropagação de espécies de importância agrícola tem grande aplicabilidade no processo de produção industrial. A clonagem *in vitro* é um procedimento signficante na multiplicação de espécies ornamentais, frutíferas e essências florestais, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento. Atualmente, milhares

de pequenas, médias e grandes empresas produzem de 10.000 a mais de 1.000.000 de espécimes de plantas *in vitro* por ano.

Os problemas principais, neste tipo de empreendimento, são: o investimento na produção é relativamente alto e o valor biológico das mudas micropropagadas é, em certas condições, instável (AITKEN-CHRISTIE e outros, 1992).

Tombolato e outros (2004) afirmam ainda que, dentre os fatores responsáveis pela escassez de pesquisas com novas cultivares de ornamentais estão o cultural, os direitos do obtentor e a falta de recursos para as atividades de domesticação, conservação e pré-melhoramento. Temos o exemplo das orquídeas que representam o único grupo de plantas com produção intensa de híbridos por colecionadores nacionais, porém, o material genético resultante tem tido pouca penetração na floricultura comercial. Assim, nota-se que plantas híbridas tem maior valor no mercado de ornamentais (ULMER e MACDOUGAL, 2004).

## **2.2 Classificação Botânica**

*Portulaca grandiflora* Hook é uma planta ornamental (**Figura 1**) que pertence à família Portulacaceae, ordem Caryophyllales e classe Magnoliopsida (WATSON e DALLWITZ, 1999).



**Figura 1 - *Portulaca grandiflora* Hook. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

A família Portulacaceae é constituída por plantas de hábito herbáceo e arbustivo, muitas vezes, suculentas e, frequentemente, contendo mucilagem nas células parenquimáticas do caule e das folhas (METCALFE e CHALK, 1985).

Portulacaceae tem distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 30 gêneros e 400 espécies, sendo ocorrentes no Brasil, aproximadamente, 30 espécies, pertencentes aos gêneros *Portulaca* e *Talinum* (SOUZA e LORENZI, 2005).

### **2.3 Aspectos da Biologia Floral e o Estudo dos Sistemas Reprodutivos**

#### ***2.3.1 Aspectos da Biologia Floral***

O estudo da biologia floral, associado aos mecanismos reprodutivos das espécies vegetais, é de fundamental importância ao melhoramento genético de plantas, pois auxilia na definição de técnicas de seleção e hibridação mais apropriadas a serem usadas (ALLARD, 1971).

A partir do estudo da biologia floral, podem-se fazer inferências sobre os mecanismos de herança, estimar a expressão e a determinação genética do sexo, estudar a fisiologia e os mecanismos envolvidos na auto-incompatibilidade e macho-esterilidade e, finalmente, determinar a taxa de cruzamentos naturais (FRANKEL e GALUN, 1977), por meio do plantio de genótipos com gene marcador recessivo, intercalados com genótipos apresentando o correspondente alelo dominante. As sementes são colhidas das plantas com características recessivas e a taxa de cruzamento natural é calculada a partir de indivíduos com caracteres recessivos e dominantes nas progênes (ALLARD, 1971).

Além de definir estratégias adequadas de melhoramento, o conhecimento acerca da biologia floral das espécies vegetais permite também compreender melhor sua história evolutiva e os mecanismos envolvidos, e pode ser importante ferramenta no estabelecimento de programas de conservação da espécie (ANDERSON, 1995).

Alguns dos aspectos mais importantes da biologia floral a serem avaliados em programa de melhoramento, além da receptividade dos estigmas, são a disponibilidade, a viabilidade e a conservabilidade dos grãos de pólen (SOUSA, 2005).

### ***2.3.2 Disponibilidade dos Grãos de Pólen***

Segundo Almeida e outros (2004), a disponibilidade dos grãos de pólen é obtida por meio da quantificação dos grãos, após a deiscência das anteras em diferentes estágios de desenvolvimento floral. Este parâmetro é utilizado para saber o quanto do pólen da espécie está disponível para ser

utilizado em programas de melhoramento ou de conservação, visando à determinação do melhor período de coleta.

De acordo com Sousa (2005), o pólen é o material básico utilizado nas técnicas de hibridação. Uma das condições ambientais essenciais para dispersão do pólen é a temperatura com a faixa indicada como de melhor eficiência entre 26°C e 29°C e com umidade relativa do ar de, aproximadamente, 60%, podendo variar de acordo com a cultivar utilizada. Temperaturas mais elevadas e comprimento do dia curto favorecem o surgimento de flores masculinas (AZEVEDO e LIMA, 2001).

### ***2.3.3 Viabilidade dos Grãos de Pólen***

O estudo da viabilidade dos grãos de pólen é de primordial importância em trabalhos de melhoramento genético, podendo também ser utilizado no diagnóstico de fatores envolvidos na formação de flores e embriões. A relação entre o pólen e o estigma depende da viabilidade dos grãos, da receptividade do estigma e das alterações genéticas entre as partes (BUENO e CAVALCANTE, 2001).

A viabilidade polínica é importante fator no melhoramento de plantas, pois em espécies alógamas, cada grão de pólen leva consigo a informação genética, conseqüente da heterozigose, fazendo com que essas plantas não transmitam à próxima geração genótipos em que os genes estejam fixados ou em homozigose, mas sim o próprio gameta, tamanha a probabilidade de diferentes combinações entre os alelos. Considerando-se que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos e, em última análise, de variabilidade genética (AKAMINE e GIROLAMI, 1959).

A viabilidade dos grãos de pólen pode ser alterada com a variação de umidade e temperatura do ambiente, por isso é imprescindível conhecer o

período de viabilidade dos grãos de pólen, especialmente, para utilizá-los em programas de hibridação. Esse período pode variar de acordo com a espécie, a exemplo de algumas gramíneas que podem apresentar viabilidade de minutos ou horas, enquanto que grãos de pólen de outras espécies podem permanecer viáveis por vários anos se armazenados adequadamente (BUENO e CAVALCANTE, 2001).

A viabilidade do grão de pólen é influenciada também por diferenças genótípicas e estágio fisiológico da planta e da flor. Em geral, na maioria das espécies, temperatura e umidade relativa baixas favorecem a viabilidade e a longevidade do pólen. No entanto, em gramíneas, são necessárias baixas temperaturas e alta umidade relativa. Em trigo-mouro foi descrito que a temperatura acima de 30°C é prejudicial ao desenvolvimento do pólen e das flores (ADHIKARI e CAMPBELL, 1998).

A viabilidade polínica é determinada por várias técnicas (FONSECA e outros, 2007; DAFNI, 1992; KEARNS e INOUE, 1993). As mais utilizadas são a germinação *in vitro* e a coloração, muito empregada no monitoramento de pólen armazenado (OLIVEIRA e outros, 2001).

Na técnica de coloração são usados diversos corantes. Dentre os mais utilizados está o carmim acético (MENDES, 1994), o qual tem como vantagem a grande praticidade e eficiência comprovada em várias espécies, porém, sempre com ajustes de protocolos. De modo que, são considerados normais/viáveis os grãos de pólen que apresentam coloração avermelhada e anormais/inviáveis os que apresentam coloração amarronzada (RIGAMOTO e TYAGI, 2002)

Um método rápido e seguro para testar a viabilidade de pólen é essencial para analisar o efeito dos fatores ambientais que afetam o desenvolvimento do mesmo, identificar possível macho-esterilidade, restabelecer linhagens e determinar o período ótimo da polinização de uma espécie (ADHIKARI e CAMPBELL, 1998).

O armazenamento de grãos de pólen é importante na preservação de germoplasma, bem como no auxílio de pesquisas que utilizem material

biológico em estoques para promover intercâmbio de germoplasma e potencializar programas de melhoramento (GOMES e outros, 2003), no qual a reposição periódica se faz necessária em função da queda de sua viabilidade (SOUZA e outros, 2002). Esse armazenamento é considerado uma das principais alternativas de conservação de genótipos importantes por possibilitar a realização de cruzamentos sem a necessidade do cultivo alternado de linhagens polinizadoras em campo.

A avaliação do desenvolvimento biológico de grãos de pólen é fundamental em trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permite obter maior sucesso nos cruzamentos realizados com a finalidade de obter novos híbridos e/ou aumentar a sua variabilidade (NUNES e outros, 2001).

A palinologia, ciência que estuda os grãos de pólen e esporos, possui íntima relação com os outros ramos da ciência, como por exemplo, a citologia e a genética. Dentre as inúmeras aplicações da palinologia, destaca-se a utilização prática no melhoramento de plantas, nos estudos de quantidade e viabilidade de pólen e substâncias químicas que estimulam o desenvolvimento do tubo polínico, oferecendo perspectivas de aumento da produção de várias culturas, por meio da obtenção do índice máximo de fertilização (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999).

Programas de melhoramento, envolvendo a produção de sementes por polinização controlada, dependem grandemente de eficiente sistema de manipulação de pólen. Como principal característica deste sistema, pode-se considerar a manutenção da viabilidade do pólen, que deverá sempre estar prontamente disponível quando requerido. O controle das condições ideais de armazenamento torna-se, assim, de vital importância, quando se deseja garantir adequada viabilidade. O armazenamento de pólen justifica-se aos programas de hibridação, quando há defasagem no florescimento entre as espécies e o pólen possui baixa longevidade sob condições naturais (SOUSA e PINTO JÚNIOR, 1992).

Dentre os fatores mais importantes ao sucesso desses programas, destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos. A eficácia dos cruzamentos, tanto entre variedades e cultivares de uma espécie como entre espécies, depende diretamente da viabilidade do pólen (TECHIO e outros, 2006).

Assim, a viabilidade do pólen é parâmetro de grande importância no estudo de plantas, pois, além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos, fornecendo informações básicas à aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, no planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo (ALEXANDER, 1980; ARROYO, 1981; GUINET, 1989).

#### ***2.3.4 Conservabilidade dos Grãos de Pólen***

A conservação dos grãos de pólen é importante na preservação da variabilidade genética, facilita o intercâmbio de germoplasma e contribui muito na geração de variabilidade obtida por meio de cruzamentos artificiais, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento. Uma das alternativas de manutenção de linhagens híbridas em uma cultura pode ser por meio do armazenamento do pólen, o que acaba por possibilitar cruzamentos de interesse, sem que haja a necessidade de cultivo destas linhagens polinizadoras em campo (GOMES e outros, 2003; VARGAS, 2006), onde a reposição periódica se faz necessária em função da queda de sua viabilidade (SOUSA, 2005).

Fatores importantes de conservação dos grãos de pólen, independentemente da duração do período de armazenamento, são temperatura e umidade relativa do ambiente. Com a redução de ambos, a viabilidade dos grãos de pólen tende a aumentar (PICKERT, 1988; GOMES e outros, 2003). Inúmeras técnicas são utilizadas no armazenamento do grão de pólen e, entre estas, destacam-se a conservação sob baixas temperaturas,

o congelamento ou a criopreservação pelo uso de nitrogênio líquido (-196°C) (VARGAS, 2006).

### ***2.3.5 Germinabilidade in vitro dos Grãos de Pólen***

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado em testes de viabilidade do pólen em programas de melhoramento genético. Existem diferenças entre espécies quanto às condições exigidas à germinação do pólen, envolvendo, principalmente, os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996).

O método geral consiste em germinar pequena amostra, em meio de cultura apropriado, e observar em microscópio para avaliação do potencial máximo de viabilidade que o pólen pode alcançar, nas condições ideais de temperatura, umidade e substrato, após um período necessário à germinação (GALLETTA, 1983).

A composição do meio afeta a germinação (SALLES e outros, 2006). O meio básico usado nestes testes é constituído de sacarose e de ácido bórico (MIRANDA e CLEMENT, 1990), podendo variar a combinação de outros nutrientes (GALLETTA, 1983).

A sacarose promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornece energia no desenvolvimento do tubo polínico. Já o boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade de estes se romperem (STANLEY e LINSKENS, 1974). Diferentes níveis de sacarose e tempos de incubação tem sido pesquisados na germinação dos grãos de pólen, como em trabalho realizado por Lacerda e outros (1995).

Segundo Pfahler (1967), a adição de boro é importante e suas respostas são variáveis, conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável, açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. Por exemplo, o pólen das angiospermas precisa de uma fonte de carbono, de boro e,

frequentemente, de outros nutrientes para promover a sua germinação (GALLETTA, 1983).

### ***2.3.6 Germinabilidade in vivo dos Grãos de pólen***

Segundo Souza e outros (2002), a germinação do pólen é importante para o melhoramento de plantas, pois o material genético presente em cada grão de pólen, consequente das recombinações, possibilita a transmissão de genótipos diversificados.

Scorza e Sherman (1995) consideram que o bom pólen deve apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Ainda que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação.

Para a verificação da germinação dos grãos de pólen, em diversas culturas, tem sido utilizada a aplicação de corantes, tais como o lugol, carmin acético, azul-de-amã, azul-de-anilina, azul-de-algodão e iodeto de potássio (HAUSER e MARRISON, 1964; STANLEY e LINSKENS, 1974).

### ***2.3.7 Receptividade dos Estigmas***

A receptividade dos estigmas é um fator fundamental para se determinar o melhor período de deposição do pólen na flor. Normalmente, o estigma receptivo produz substâncias viscosas que facilita a aderência do pólen, garantindo, provavelmente, a fertilização com a formação de frutos e sementes (MAUÉS e COUTURIER, 2002). A receptividade do estigma pode ser determinada por numerosas técnicas (DAFNI, 1992; KEARNS e INOUE, 1993).

O uso do alfa naftil-acetato serve na determinação da atividade de esterase (PEARSE, 1972).

O peróxido de hidrogênio detecta a ação da peroxidase (OSBORN e outros, 1998) em estigmas de flores, sendo a receptividade notada por meio da formação de bolhas de ar sobre o estigma. Este método é simples e barato (MAUÉS e COUTURIER, 2002).

O estudo da duração do período em que a flor está receptiva ao pólen e, portanto, apta à fertilização, é crucial ao sucesso de experimentos de hibridação ou a procedimentos de polinização artificial (BRUCKNER e outros, 1995).

### ***2.3.8 Estudo dos Sistemas Reprodutivos***

O tipo de reprodução é fundamental na escolha dos métodos de melhoramento genético, que serão utilizados no melhoramento de determinada espécie (POEHLMAN, 1983), porque o sucesso do melhoramento genético depende do entendimento do processo reprodutivo.

O tipo de sistema reprodutivo determina o modo de transmissão de genes de uma geração à outra (BROWN, 1989), o que faz com que as investigações sobre a dinâmica da mudança genética estejam concernidas, direta ou indiretamente, com o processo de cruzamento (CLEGG, 1980). Desta forma, o sistema reprodutivo não somente determina as frequências genotípicas subsequentes, mas, também, afeta os parâmetros genéticos populacionais, tais como, fluxo gênico e seleção (HAMRICK e GODT, 1990).

Na efetivação de qualquer programa de conservação e melhoramento genético de uma espécie, é fundamental o conhecimento dos níveis de distribuição da variabilidade genética entre e dentro de suas populações. Por sua vez, a estrutura genética é o resultado da interação de vários fatores reprodutivos e evolutivos (seleção, deriva genética, mutação e fluxo gênico). Assim, é importante conhecer o sistema reprodutivo da

espécie, haja vista que este determina como os genes são transmitidos de uma geração para a outra e como são reorganizados nos indivíduos; portanto, também determina sua estrutura genética espacial e temporal (BROWN, 1989). Devido a este fato, o mecanismo reprodutivo deve ser o primeiro passo no conhecimento genético de uma espécie, quando se objetiva sua conservação e seu melhoramento.

Apesar de existirem plantas que se hibridizam facilmente, há espécies em que a promoção da hibridação constitui-se em sério problema ao melhoramento genético, portanto, o estudo da biologia floral e dos mecanismos reprodutivos torna-se a meta básica a ser alcançada (NATION e outros, 1992).

#### **2.4 Visitantes Florais**

As abelhas são os principais agentes polinizadores dos vegetais. Em troca, os vegetais produzem substâncias adocicadas que atraem as abelhas, as quais carregam em seus pêlos o pólen das plantas.

A interação entre as abelhas e plantas garantiu aos vegetais (angiospermas) o sucesso na polinização cruzada, que constitui numa importante adaptação evolutiva das plantas, aumentando o vigor híbrido das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e aumentando a produção de frutos e sementes (COUTO e COUTO, 2002).

O bom polinizador visita grande número de plantas de uma mesma espécie, transportando, por sua vez, numerosos grãos de pólen em seus pêlos ramificados (ALMEIDA e outros, 2004).

Recentemente, vem crescendo o número de trabalhos sobre a utilização das abelhas na polinização de diversas culturas. Trindade e outros (2004), trabalhando com polinização e estudo comportamental, observaram que a abelha *Apis mellifera* é de extrema importância na polinização da cultura do meloeiro e que a presença da mesma, no processo de polinização, é indispensável, já que, na sua ausência, praticamente, não houve produção.

Malerbo-Souza e outros (2003a), estudando a cultura da laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pêra-Rio), concluiu que a flor de laranjeira é altamente atrativa às abelhas *A. mellifera*, sendo mais visitada no período da manhã e, também, que o início da frutificação das flores está em função do número de visitas (pelo menos, 10 visitas). A polinização realizada por estas abelhas influenciou, quantitativamente e qualitativamente, a produção de laranjas. Os frutos, cujas flores foram visitadas adequadamente pelas abelhas, foram mais pesados, menos ácidos e com maior número de sementes por gomo.

Malerbo-Souza e outros (2003b), estudando uma cultura de café (*Coffea arabica* L., var. Mundo Novo), quanto à biologia floral, a frequência e o comportamento dos insetos na flor, testando o produto Bee-Here®, quanto à sua atratividade para as abelhas *A. mellifera* e verificando a produção de frutos, com e sem a visita dos insetos, chegaram à conclusão que a polinização realizada por elas promoveu aumento quantitativo na produção de grãos de café (var. Mundo Novo).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Área Experimental**

Os estudos foram realizados com plantas, conduzidas em vasos com capacidade de 4 litros, em área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), localizada no *Campus* de Vitória da Conquista - BA (14° 51'S e 40° 50'W, altitude média de 928m), e nos Laboratórios de Biotecnologia e Fitopatologia da mesma universidade.

No município de Vitória da Conquista, normalmente, as temperaturas máxima e mínima apresentam médias de 25,3 e 16,1°C, respectivamente. A umidade relativa média é de 70%, com o índice

pluviométrico médio anual de 733,9mm, sendo a maior concentração de chuva entre os meses de novembro e abril. A vegetação predominante na região é a Mata-de-Cipó, zona de transição entre a Caatinga e a Mata Atlântica (ALMEIDA, 2007).

### 3.2 Material Vegetal

As plantas utilizadas nos experimentos foram oriundas de mudas já existentes em casa de vegetação (**Figura 2**), sendo sua procedência de plantas distintas.

As mudas foram transplantadas em vasos com capacidade de 4 litros de substrato (**Figura 3**) com solo e húmus de minhoca, na proporção de 3:1. Após o transplântio, os vasos permaneceram em área sombreada, próximo à casa de vegetação, visando melhor aclimatação. Posteriormente, os vasos foram levados a campo, onde ficaram expostos à plena luz solar, durante o restante do experimento. As mudas foram regadas uma vez por dia.



**Figura 2 - Muda de *P. grandiflora* Hook em casa de vegetação. Vitória da Conquista - BA, 2009.**



**Figura 3 - Muda de *P. grandiflora* Hook transplantada em vaso. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

Inicialmente, foram utilizadas 100 mudas de *P. grandiflora* Hook, sendo 50 plantas de flor rosa e 50 de flor branca. As plantas de flor branca foram atacadas por cochonilhas. Para o controle da praga, foi feito o tratamento com detergente, porém, não foi obtido resultado positivo. Fez-se, então, o controle químico e o resultado também foi negativo. Desta forma, optou-se por descartar estas plantas e plantar novas mudas da flor branca. Após o plantio, o ataque de cochonilhas se repetiu. O tratamento foi feito, porém, o resultado foi igual ao primeiro. Assim, decidiu-se trabalhar apenas com as 50 plantas de flor rosa.

O experimento foi conduzido no espaçamento de 1,0m x 0,5m, totalizando uma área de 25 m<sup>2</sup> (Figura 4).



**Figura 4 - Plantas de *P. grandiflora* Hook conduzidas em vasos mantidos em ambiente aberto. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

### **3.3 Descrição da Morfologia Floral**

Para a realização do estudo da descrição das flores e inflorescências de *P. grandiflora* Hook, foi utilizado material vivo, conduzido no Laboratório de Fitopatologia da UESB, *Campus* de Vitória da Conquista - BA. A morfologia externa e interna foi observada ao estereomicroscópio e descrita de acordo com Manual de Organografia de Vidal e Vidal (2003) e Ferri (1976), no mês de setembro de 2008.

### **3.4 Determinação dos Estádios de Desenvolvimento Floral**

Para determinação da antese, foram feitas observações diárias da abertura de 50 botões florais, escolhidos aleatoriamente, previamente marcados, no período de 7 até as 18h, durante 15 dias não consecutivos. Isso foi feito para correlacionar os estágios de desenvolvimento da flor com a maturação dos órgãos sexuais, bem como a determinação da fase ideal de coleta dos grãos de pólen para serem utilizados nos testes e subsidiar programas de hibridações artificiais, em programas de melhoramento genético vegetal. Foi descrita a morfologia externa relacionando-a com as atividades internas: disponibilidade, viabilidade, germinabilidade e conservabilidade dos grãos de pólen, receptividade dos estigmas e polinização.

### **3.5 Estudo dos Grãos de Pólen e do Estigma**

#### ***3.5.1 Disponibilidade dos Grãos de Pólen***

A disponibilidade dos grãos de pólen foi realizada em intervalos de duas horas, das 8 às 18h, e obtida após a deiscência das anteras, por meio da contagem dos grãos de pólen, advindos da média de duas anteras de uma flor colhida aleatoriamente. Em laboratório, as anteras foram maceradas sobre uma lâmina e seus grãos corados com o corante carmim acético a 1%, cobertos com uma lamínula e levados para observação e contagem em microscópio óptico, utilizando objetivas de 10x e 40x. As lâminas foram fotografadas com câmera digital de 7.2 mega pixels.

O experimento foi conduzido nos dias 5, 6 e 7 de maio de 2009, totalizando 3 dias de observação, afim de estimar a disponibilidade polínica da pré-antese até a pós-antese. Os dados foram analisados por meio da análise de regressão.

#### ***3.5.2 Viabilidade dos Grãos de Pólen***

Para obter dados da viabilidade polínica, fez-se o uso de botões florais colhidos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Os grãos de pólen foram retirados das anteras, provenientes de flores coletadas aleatoriamente e protegidas com sacos de papel. Logo após, o pólen foi colocado sobre uma lâmina de vidro e corado com carmim acético a 1%, segundo a técnica de Linsley e Cazier (1963), coberto com lamínula e observado sob microscópio óptico, utilizando-se das objetivas com aumentos de 10x e 40x.

Foi feita a contagem de 200 grãos de pólen, selecionados ao acaso. Os mesmos foram classificados em normais/viáveis, quando apresentaram coloração avermelhada e suas membranas íntegras; e anormais/inviáveis, com coloração amarronzada ou com citoplasmas retraídos ou, ainda, com suas membranas rompidas, baseado na reação dos mesmos com a solução do corante utilizado. As lâminas foram fotografadas com câmera digital de 7.2 mega pixels.

As análises foram obtidas em intervalos de duas horas, no período das 8 às 18h, dos dias 5, 6, 7 de maio de 2009. A temperatura média, nos três dias de avaliação, variou entre 18°C e 24°C.

A viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina, determinada por meio de várias metodologias, entre elas a técnica de coloração (OLIVEIRA e outros, 2001; GUERRA e SOUZA, 2002).

Os efeitos da viabilidade, nos diferentes estágios de desenvolvimento floral, ao longo do dia, foram demonstrados por análise de regressão.

### ***3.5.3 Conservabilidade dos grãos de pólen***

As anteras contendo os grãos de pólen foram coletadas às 8 horas. Utilizou-se de 60 tubos de *eppendorf*, contendo duas anteras por tubo. Estes foram preparados, previamente, com uma camada de sílica gel, funcionando na retenção da umidade do meio, após foi coberto com algodão para

sustentar as anteras (**Figura 5**). Sendo que, 30 tubos ficaram em geladeira à temperatura de  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e os outros 30 no freezer com temperatura de  $-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . De 30 em 30 dias, foram montadas lâminas, nas quais se fez a dissecação das anteras para extração dos grãos de pólen, que foram corados com carmim acético a 1%, e observados sob microscópio óptico com objetivas de aumento de 10x e 40x. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x2 (tempo de armazenamento x temperatura) com 10 repetições. Este estudo foi realizado no período compreendido entre 15 de junho a 14 de agosto de 2009.

Os grãos de pólen foram fotografados com câmera digital de 7.2 mega pixels e os dados analisados pelo SISVAR 4.0 (FERREIRA, 2000).



**Figura 5** – Tubos *eppendorf* contendo anteras de *P. grandiflora* para serem armazenados em geladeira e em *freezer*. Vitória da Conquista - BA, 2009.

#### **3.5.4 Germinabilidade *in vitro* dos Grãos de Pólen**

Para verificação da taxa de germinabilidade *in vitro*, os grãos de pólen foram coletados de flores escolhidas aleatoriamente em estágio de balão (botões intumescidos) ou de flores recém abertas. Foram testados os seguintes meios de cultura para a germinação do pólen:

- 1) 2,5g sacarose + 0,5g ágar + 50 ml água destilada
- 2) 5,0g sacarose + 0,5g ágar + 50 ml água destilada
- 3) 10g sacarose + 0,5g ágar + 50 ml água destilada
- 4) 15g sacarose + 0,5g ágar + 50 ml água destilada
- 5) 5,0g sacarose + 0,5g ágar + 50 ml água destilada + 5mg de ácido bórico
- 6) 10g sacarose + 0,5g ágar + 50 ml água destilada + 5mg de ácido bórico

Os elementos que constituíram os meios de cultura foram dissolvidos em água destilada, depois aquecidos em forno de microondas no nível de potência P10, até a completa dissolução do ágar. Os meios de cultura ainda quentes foram distribuídos em placas de Petri pequenas (diâmetro de 6 cm). Após esfriar, o pólen foi aspergido sobre o meio e as placas foram colocadas em câmara úmida, feita com placas de Petri maiores (diâmetro de 12 cm), em papel filtro umedecidos com água destilada, representando a umidade natural. Tampou-se para evitar qualquer contaminação. As placas foram deixadas à temperatura ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), por um período de 24h, para que fossem feitas as lâminas a serem analisadas quanto à formação do tubo polínico em microscópio óptico com objetivas de aumento de 10x e 40x. Utilizou-se azul-de-amã na coloração do grão de pólen. Foi considerado germinado o grão de pólen, cujo tubo polínico apresentou o comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen.

O experimento ocorreu dia 12 de maio de 2009, sendo repetido no dia 18 de maio de 2009, compreendendo 6 tratamentos com 4 repetições, em delineamento inteiramente casualizado (**Figura 6**).



**Figura 6– Placas de Petri com meios de cultura para germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *P. grandiflora*. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

O número de tubos polínicos formados foi verificado quanto à homocedastidade ou homogeneidade das variâncias pelo teste de *Cochran e Bartlett*; além do teste de normalidade de *Lilliefors* pelo SAEG 9.1, procedendo posteriormente à análise de variância e o teste *Tukey*.

### **3.5.5 Germinabilidade *in vivo* dos Grãos de pólen**

Para a verificação da taxa de germinabilidade *in vivo* dos grãos de pólen, foram feitos macerados de estigmas provenientes de flores distintas, em diferentes estágios de desenvolvimento floral, na presença de azul-de-amã, segundo a técnica de *Johansen* (1940). As lâminas foram levadas ao microscópio óptico com objetivas de aumento de 10x e 40x, onde foram contados os grãos de pólen germinados e os não germinados.

A taxa foi avaliada por três dias, utilizando-se de três estigmas na pré-antese, na antese e na pós-antese, obtidas em intervalos de duas horas, no período de 8 às 18h, dos dias 5, 6 e 7 de maio de 2009.

### **3.5.6 Receptividade dos Estigmas**

A receptividade foi verificada pelo seu aspecto viscoso e umectante (ALMEIDA, 1986), e testada utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% (KEARNS e INOUE, 1993).

Para obter resultados confiáveis, estigmas danificados ou com pólen na superfície não foram utilizados, evitando-se resultados falso-positivos (DAFNI, 1992).

Foram analisados três estigmas protegidos com sacos de papel, provenientes, aleatoriamente, de três plantas distintas, nos diferentes estágios de desenvolvimento floral.

As análises foram obtidas em intervalos de 1 hora, no período de 7 às 18h, dos dias 5, 6 e 7 de maio de 2009.

Os estigmas coletados foram levados ao Laboratório de Fitopatologia e depositados em placas de Petri, e sobre os mesmos foi gotejado o peróxido de hidrogênio a 3%, e observados quanto à sua receptividade, com o auxílio de uma lupa de laboratório. Aqueles que apresentaram formação de bolhas foram considerados receptivos.

Os efeitos da receptividade dos estigmas, nos diferentes estágios de desenvolvimento floral, ao longo do dia, foram fotografados com câmera digital de 7.2 mega pixels, para confirmação do teste.

### **3.6 Estudos dos Sistemas Reprodutivos**

Os estudos dos sistemas reprodutivos ocorreram nos meses de abril, maio, junho, novembro e dezembro de 2009. Para cada teste, foi

confeccionado etiquetas de identificação, as quais ficavam presas nos botões florais (**Figura 7**).



**Figura 7 – Etiquetas de identificação. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

Para determinação da estimativa da autopolinização (autogamia) natural, foram ensacados aleatoriamente, na pré-antese, 50 botões florais. Os sacos utilizados para a proteção dos botões eram de papel, segundo a técnica de Ormond e Pinheiro (1974) (**Figura 8**). Os botões foram ensacados 24 horas antes de sua abertura ou antese, para realização do teste. As observações eram diárias, até a obtenção dos frutos.

A autopolinização (autogamia) artificial foi estimada utilizando, basicamente, o mesmo procedimento anterior, sendo a diferença o fato dos botões serem emasculados antes da deiscência das anteras e, posteriormente, polinizados manualmente com o auxílio de uma pinça de laboratório, utilizando grãos de pólen de flores de outras inflorescências do mesmo indivíduo. Depois disso, foram ensacados para não ocorrer contaminação.



**Figura 8 – Botões florais de *P. grandiflora* protegidos por sacos de papel. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

Para estimar a taxa de polinização cruzada (alogamia) natural, foram escolhidos e ensacados, aleatoriamente, na pré-antese, 50 botões florais, os quais, depois de emasculados, ficaram expostos ao ambiente sem proteção alguma e, 24 horas depois, foram protegidos com sacos de polietileno para que não houvesse interferência externa, e observados diariamente até obtenção dos frutos.

Na polinização cruzada (alogamia) artificial, 50 botões florais foram escolhidos e ensacados aleatoriamente, na pré-antese. Todos os botões foram emasculados e imediatamente polinizados artificialmente, com grão de pólen de outra planta da mesma espécie, com o auxílio de uma pinça de laboratório. Em seguida, os botões foram novamente ensacados.

### **3.7 Visitantes Florais**

A descrição do comportamento dos insetos visitantes foi feita diariamente por meio de observações diretas e uso de fotografias. Foram registrados a frequência, duração e horário dos insetos.

Os visitantes florais foram capturados mediante uso de sacos de papel e, posteriormente, levados ao laboratório e identificados. A coleta ocorreu nos meses de maio, junho e novembro de 2009.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Descrição da Morfologia Floral**

Nas condições época e local dos estudos, a *P. grandiflora* Hook apresentou florescimento duas vezes em 2009, ano da coleta dos dados experimentais. Sua floração teve início, em média, 35 dias após serem transplantadas para os vasos. Os meses de floração corresponderam aos meses de abril, maio e junho de 2009, sendo que, no final deste último mês, todas as plantas perderam suas flores, retomando a floração no mês de novembro do mesmo ano.

De acordo com a análise floral, *P. grandiflora* Hook é do tipo herbáceo, pois apresenta caule macio e maleável, que pode ser cortado apenas com a unha. Suas folhas são simples, opostas e cruzadas, sem estípulas, carnosa e suculenta, com forma obovada. Possui inflorescências terminais, plurifloras simples do tipo indefinida ou racimosa. As flores apresentam coloração rosa e estão situadas em pedicelos com pedúnculos, possui peças florais dispostas de forma cíclica, diperiantada, presença de cálice e corola. A homogeneidade do perianto é heteroclamídea. Quanto ao número de estames, em relação ao de pétalas, é polistêmone, ou seja, número de estames superior ao de pétalas.

As flores da *P. grandiflora* Hook são hermafroditas (flor completa possuindo os dois sexos), abrindo uma única vez durante o dia, por volta das 8 horas. Permanece aberta em média 7 horas, posteriormente, o botão floral se fecha e, se fecundada, permanece assim por uma semana, aproximadamente, até surgir o fruto. Caso não haja fecundação, perde gradativamente a cor, murcha e cai num período curto de 24h, após aberta.

O cálice é verde e apresenta forma de cone com sépalas livres ou isoladas (soldadura dialissépalo); tem duração marcescente, ou seja, persiste, porém murcha. Outra característica do cálice é a simetria do tipo zigomorfo.

A corola é rosa, soldadura das pétalas dialipétala, pétalas livres entre si; pentâmera, zigomorfa e caduca.

O androceu é heterodínamo (estames de diferentes tamanhos), dialistêmone (estames livres entre si). Suas anteras são dorsifixas, diteca com deiscência longitudinal; o filete e a antera são amarelos.

O gineceu é gamocarpelar e pluricarpelar, com estigma bifido de cor amarela, estilete terminal, cilíndrico e de coloração amarelo esverdeado (**Figura 9**). O ovário é unilocular e súpero, ou seja, ovário livre, no qual os verticilos encontram-se abaixo ou em torno do gineceu.



**Figura 9 – Estigma bífido de cor amarela de *P. grandiflora*. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

#### **4.2 Determinação dos Estágios de Desenvolvimento Floral**

A atividade floral compreendeu três estágios:

- Pré-antese: botões fechados e intumescidos. Período denominado estágio de balão;
- Antese: quando aconteceu a abertura assincrônica das flores, deixando totalmente expostos o estigma e os estames;
- Pós-antese: quando ocorreu a distensão das pétalas e sépalas.

As flores não se abriram ao mesmo tempo nas inflorescências, sendo possível encontrar flores em diferentes estágios de desenvolvimento na mesma planta durante o dia.

Na pré-antese, com a flor ainda fechada, percebeu-se que o grão de pólen já se encontrava maduro, porém, devido à posição desfavorável das partes masculinas em relação às femininas de uma mesma flor hermafrodita, não seria possível a fecundação. Esse fato favorece a polinização cruzada, chamado de heteroestilia, concordando com Borém (1999). O estigma era lentamente exposto, sendo que as pétalas se encontravam numa estrutura em forma de espiral, protegendo o mesmo e dificultando a sua polinização inicialmente.

A antese ocorreu com maior frequência às 8 horas, com anteras já deiscentes e grãos de pólen disponíveis, os quais podem ser conduzidos pelos polinizadores que iniciam e intensificam suas atividades neste período, principalmente, abelhas que buscam o néctar e o pólen como recursos alimentares.

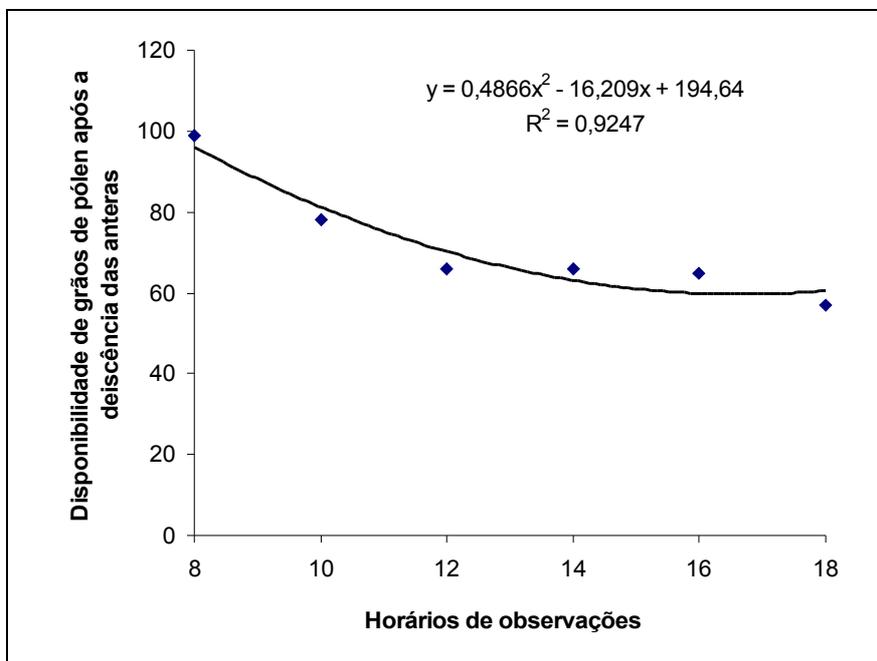
Na pós-antese, ocorre a polinização, com provável formação de tubo polínico e posterior formação de frutos e sementes.

A longevidade floral (período entre a antese e a senescência da corola) na *P. grandiflora* Hook foi de 24h em flor não fecundada e, aproximadamente, uma semana quando fecundada. Este período é variável entre as angiospermas e pode assegurar o sucesso da polinização (PRIMACK, 1985).

### **4.3 Disponibilidade dos Grãos de Pólen**

A disponibilidade dos grãos de pólen foi verificada após a deiscência das anteras, o que ocorreu antes mesmo da abertura do botão floral, às 7h.

Nos dias avaliados, houve um declínio ao longo do dia, principalmente, nas horas finais de avaliação, conforme ilustrado no **Gráfico 1**. Isso leva a supor que seja eficiente o transporte dos grãos de pólen por agentes polinizadores.



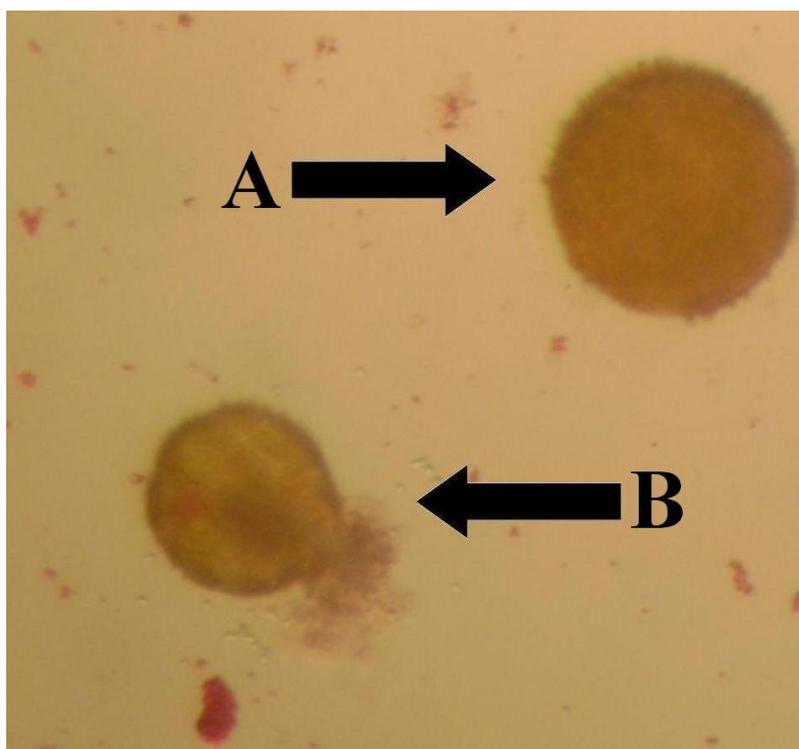
**Gráfico 1 – Estimativa do número de grãos de pólen disponíveis de *P. grandiflora* ao longo do dia, observados em 5, 6 e 7 de maio de 2009. Vitória da Conquista – BA.**

A presença de abelhas era comum ao longo de todo o dia e mais intensamente a partir das primeiras horas da abertura da flor, concordando com o estudo de Harder e Barret (1996), os quais afirmam que a atividade dos visitantes florais afeta diretamente o fluxo de pólen, permitindo a ocorrência tanto da autopolinização, quanto da polinização cruzada, característica de interesse na formação de híbridos.

#### **4.4 Viabilidade dos Grãos de Pólen**

Os grãos de pólen viáveis foram facilmente percebidos devido à coloração exibida com a utilização do corante carmim acético.

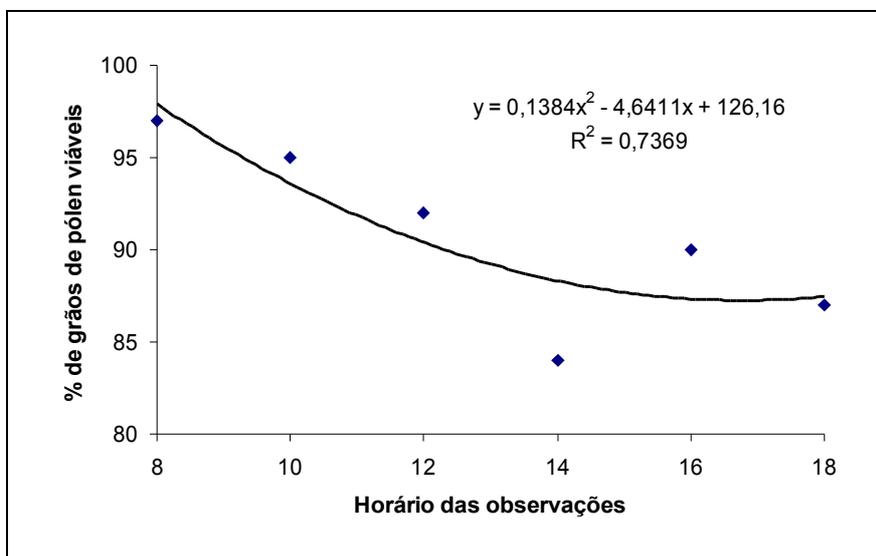
O pólen viável apresentou-se avermelhado e com suas membranas íntegras. Os inviáveis de coloração marrom e muitos dos quais com seu citoplasma retraído ou, ainda, com suas membranas rompidas (**Figura 10**).



**Figura 10 – Grãos de pólen normais/viáveis (A) e anormais/inviáveis (B) de *P. grandiflora*. Vitória da Conquista – BA, 2009.**

Essa técnica de coloração é empregada no monitoramento de pólen *in vitro* e *in vivo* e está baseada na reação de coloração de grãos de pólen amiláceos, indicando pólen maduro com protoplasma vivo (OLIVEIRA e outros, 2001; GUERRA e SOUZA, 2002).

Durante os três dias de avaliação, a viabilidade mostrou-se elevada ao longo do dia (**Gráfico 2**), com valores superiores a 80%. De acordo com Souza e outros (2002) e Domingues e outros (1999), valores acima de 70% já são considerados de alta viabilidade, de 31 a 69% como média, e até 30% baixa viabilidade.



**Gráfico 2 – Estimativa do percentual de grãos de pólen viáveis de *P. grandiflora* nos dias 5, 6 e 7 de maio de 2009. Vitória da Conquista – BA.**

O grão de pólen, na abertura da flor, necessita estar plenamente viável. Geralmente, à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fertilização (SOUZA e outros, 2002).

#### **4.5 Conservabilidade dos Grãos de Pólen**

Os dados referentes à conservabilidade dos grãos de pólen de *P. grandiflora* estão expostos na **Tabela 1**.

**Tabela 1 – Taxa da conservabilidade (%) dos grãos de pólen de *P. grandiflora* armazenados aos 30, 60 e 90 dias em dois ambientes. Vitória da Conquista – BA, 2009\***

ARMAZENAMENTO	30 Dias	60 Dias	90 Dias
<b>Geladeira</b>	58,20aA	40,50aA	34,60bB
<b>Freezer</b>	50,90aA	47,60aA	62,10aA
<b>Média</b>	<b>48,98</b>		
<b>CV (%)</b>	<b>38,73</b>		

\* Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observado, nesta etapa do experimento, que os grãos de pólen armazenados, tanto no ambiente geladeira ( $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) quanto em *freezer* ( $-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), conservaram-se viáveis ao longo dos 90 dias de observação (**Figura 11**).



**Figura 11 – Conservabilidade do pólen de *P. grandiflora* em carmim acético a 1%. Vitória da Conquista - BA, 2009. (400X).**

Em programas de melhoramento genético, metodologias que aperfeiçoem a conservação dos grãos de pólen são de extrema importância, dada a necessidade destes se manterem viáveis até o momento em que será utilizado em hibridações (FRANZON e outros, 2004).

A análise dos resultados revelou que os grãos de pólen da *P. grandiflora* avaliados manteve germinação média de 48,98%. Os conservados no ambiente geladeira apresentaram taxa igual 34,60% aos 90 dias, diminuindo sua viabilidade, significativamente, quando comparado às demais épocas de avaliação. No ambiente *freezer*, as maiores médias foram alcançadas aos 90 dias (62,10 %), entretanto, não diferiu estatisticamente em relação às outras épocas de avaliação.

Com relação ao tempo de armazenamento, aos 90 dias o ambiente *freezer* proporcionou maior viabilidade do pólen em relação ao ambiente geladeira. Com isso, observou-se que, de acordo com o período de armazenamento, quanto mais baixa a temperatura maior a chance de se obter altos níveis de viabilidade do pólen.

Resultados semelhantes alcançados por Pio e outros (2007) com o pólen de laranjas doces revelaram que os grãos de pólen armazenados em congelador (*freezer*) apresentaram maior porcentagem de germinação que o conservado em geladeira. O emprego de baixas temperaturas, normalmente, encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade.

Isso demonstra que esta metodologia, de baixo custo, é uma alternativa viável à conservação dos grãos de pólen, podendo subsidiar programas de melhoramento, viabilizando cruzamentos entre indivíduos com potencial econômico, que apresentem barreiras temporais de floração, baixa taxa de polinização ou, geograficamente, separados, como observado por Oliveira e outros (2001) em açazeiro.

O armazenamento de grãos de pólen é importante na preservação de germoplasma, bem como no auxílio de pesquisas que utilizem este material biológico em estoques para promover intercâmbio de germoplasma e potencializar programas de melhoramento (GOMES e outros, 2003), nos quais a reposição periódica se faz necessária, em função da queda de sua viabilidade (SOUZA e outros, 2002). Desta forma, é considerado como alternativa à conservação de genótipos importantes em cruzamentos, pois

possibilita a realização dos mesmos sem a necessidade do cultivo alternado dessas linhagens polinizadoras em campo.

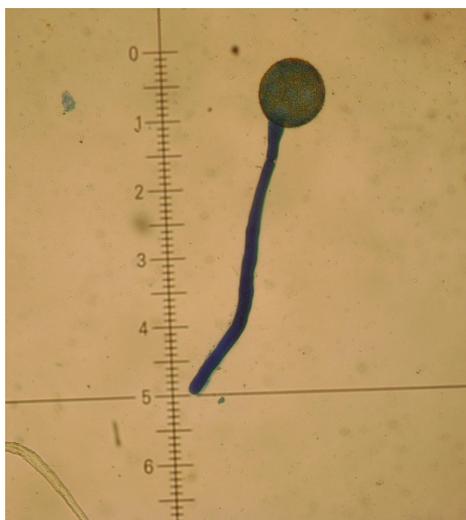
#### 4.6 Germinabilidade *in vitro* dos Grãos de Pólen

Os dados referentes à germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *P. grandiflora* estão apresentados na **Tabela 2** e o grão de pólen germinado na **Figura 12**.

**Tabela 2 – Médias da porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *P. grandiflora* em diferentes meios de cultura. Vitória da Conquista – BA, 2009\***

<b>MEIOS DE CULTURA</b>	<b>MÉDIAS</b>
2,5g sacarose	7,25 A
5,0g sacarose + ácido bórico	7,00 AB
15g sacarose	4,00 AB
5,0g sacarose	3,50 AB
10g sacarose	3,25 AB
10g sacarose + ácido bórico	2,50 B
Média geral	4,58
CV(%)	44,23

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



**Figura 12 – Germinação *in vitro* do grão de pólen de *P. grandiflora*.  
Vitória da Conquista - BA, 2009.**

Foram obtidos índices muito baixos de germinação *in vitro*, entre os diferentes meios de cultura utilizados, mesmo assim, houve diferenças estatísticas entre eles. O primeiro tratamento com 2,5g de sacarose diferiu dos demais e foi considerado superior, ou seja, foi o meio que proporcionou maior germinabilidade dos grãos de pólen. Os tratamentos com 5g de sacarose mais 5mg de ácido bórico, 15g, 5g e com 10g de sacarose não diferiram entre si, sendo considerados iguais estatisticamente. O tratamento com 10g de sacarose mais 5mg de ácido bórico foi considerado inferior a todos os outros tratamentos utilizados, ou seja, foi o meio de cultura que obteve menor número de grãos de pólen germinados. Assim, dentre os meios de cultura avaliados, o primeiro seria o meio recomendado, em caso de testar a germinabilidade de grãos de pólen.

Scorza e Sherman (1995) consideram que um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos e, ainda que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar,

pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar de baixa porcentagem de germinação.

A perda da viabilidade polínica, em função do tempo de abertura da flor, foi observada no maracujazeiro-amarelo (SOUZA e outros, 2002), no entanto, para a *P. grandiflora* não foi avaliado o quesito tempo, o que pode ter influenciado nas análises feitas.

Em muitas espécies, a esterilidade do pólen pode estar associada com irregularidades meióticas, tais como citomixia (CAETANO-PEREIRA e PAGLIARINI, 1997) e mixoploidia (CAETANO-PEREIRA e outros, 1998) em milho, anormalidades na formação do fuso em *Centella asiatica* (CONSOLARO *et al.*, 1996), baixa frequência de quiasmas em espécies de *Lycopersicon* (HAROUN, 1996), segregação irregular de univalentes em espécies de *Pennisetum* (DUJARDIN e HANNA, 1984) e em *Aptenia cordifolia* (PAGLIARINI, 1990). Em variedades de soja, a inviabilidade polínica tem sido relacionada às anormalidades meióticas (BIONE e outros, 2000).

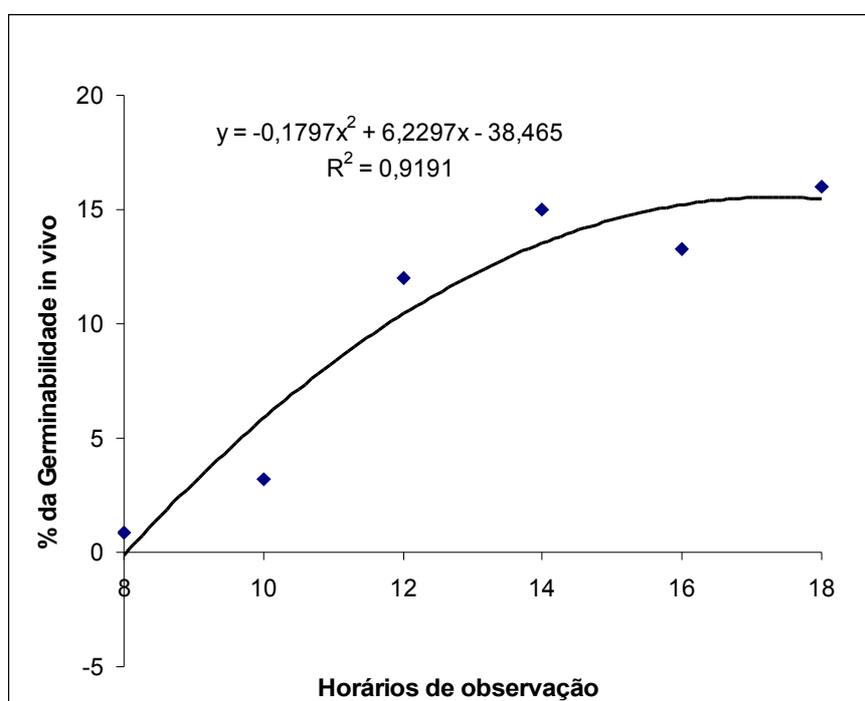
Fatores ambientais também podem interferir na viabilidade polínica. Quando a abertura da antera coincide com elevada umidade do ar, a alta pressão osmótica do conteúdo celular do grão de pólen, aliada à baixa resistência de sua parede, diminuem a viabilidade polínica (SOUSA, 1994). Estudos em outras espécies tem demonstrado que botões florais são, particularmente, sensíveis a estresse por aquecimento, num estágio de 3 a 5 dias, antes da abertura da antese, causando redução na produção e viabilidade dos grão de pólen (VARA PRASAD e outros, 1999).

A germinação *in vitro* simula condições naturais para o crescimento e desenvolvimento do tubo polínico, assim, ajustes de protocolos são necessários para se atingir uma taxa desejável. O aumento da germinação pode ser conseguido com tentativas em alterar as concentrações de sacarose ou outros meios de cultura ou, ainda, aumentando o tempo de incubação, pois é necessário que o pólen mantenha elevados níveis de germinabilidade.

#### 4.7 Germinabilidade *in vivo* dos Grãos de Pólen

Foi observado que, a partir das 8h, as anteras já se encontravam deiscentes. Com isso, desse período em diante, foram encontrados grãos de pólen depositados no estigma, o qual já se encontrava receptivo.

No **Gráfico 3**, observa-se o percentual da germinabilidade dos grãos de pólen nas condições do mês em estudo.



**Gráfico 3 - Percentual da germinabilidade *in vivo* dos grãos de pólen de *P. grandiflora*, observados em 5, 6 e 7 de maio de 2009. Vitória da Conquista – BA.**

A formação do tubo polínico (**Figura 13**) ocorre somente na pós-antese, ou seja, a fecundação e posterior fertilização acontecem nesse período, a partir das 8h. Foi observado que, no decorrer do dia, o percentual

da germinabilidade *in vivo* dos grãos de pólen foi crescente. O último horário, às 18h, foi o que mostrou um maior percentual de germinação, indicando ser este o melhor horário para obter sucesso reprodutivo com cruzamentos.



**Figura 13– Germinabilidade do grão de pólen de *P. grandiflora* em presença de Azul-de-Amã, segundo a técnica de Johansen (1940). Vitória da Conquista – BA, 2009.**

#### **4.8 Receptividade dos Estigmas**

O estigma de *P. grandiflora* manteve-se receptivo durante todos os horários de coleta, ou seja, na pré-antese, antese e pós-antese, das 7h às 18h, nos três dias de coleta.

Estigmas receptivos foram caracterizados por alta atividade enzimática; a presença de várias enzimas coincide com os estágios de desenvolvimento do estigma e, conseqüentemente, a maioria dos métodos

que determinam a receptividade do estigma *in vitro* baseia-se na identificação da atividade enzimática (DAFNI e MAUÉS, 1998). A receptividade do estigma resulta da maturação do gameta feminino e pode influenciar na taxa de fecundação e no sucesso da polinização.

Com o uso do peróxido de hidrogênio a 3%, houve formação imediata de bolhas na cavidade estigmática (**Figura 14**), indicando a atividade da peroxidase, concordando, assim, com os autores Pio e outros (2007), os quais relatam que a reação enzimática da enzima peroxidase baseia-se na hipótese que a presença desta enzima reflete a receptividade do estigma.



**Figura 14 – Receptividade do estigma de *P. grandiflora*. Vitória da Conquista – BA, 2009.**

Para o sucesso da fertilização, é desejável que o pólen seja transferido ao estigma receptivo de uma flor. Em muitos casos, entretanto, a fertilização pode ocorrer quando o grão de pólen é depositado antes do

período receptivo dos estigmas, desde que permaneça viável em tempo suficiente para poder germinar, assim que a flor se torne receptiva (RAMOS e outros, 2008).

Por apresentar receptividade antes da deiscência das anteras, a *Portulaca grandiflora* é caracterizada como protogínica, concordando com Fernandes e outros (2004), ao afirmarem que a flor não precisa, necessariamente, estar aberta para que o estigma esteja receptivo. Tais autores verificaram que polinizações em botões florais foram realizadas e detectaram taxa de 16,67 % de frutificação.

#### 4.9 Estudos dos Sistemas Reprodutivos

Com base no sistema reprodutivo, *Portulaca grandiflora* mostrou-se, preferencialmente alógama, como pode ser visto na **Tabela 3**.

**Tabela 3 – Taxa de Pegamento (%) dos cruzamentos naturais e artificiais em *P. grandiflora*. Vitória da Conquista – BA, 2009**

PARÂMETROS	SISTEMAS REPRODUTIVOS			
	Autogamia		Alogamia	
	Natural	Artificial	Natural	Artificial
<b>Nº Total de Flores</b>	50	50	50	50
<b>Pegamento</b>	9	3	41	23
<b>Tx de Pegamento</b>	<b>18%</b>	<b>6%</b>	<b>82%</b>	<b>46%</b>

Segundo Paterniani (1974), a alogamia possibilita a manutenção ou o aumento do vigor híbrido das espécies, pela ocorrência de novas combinações de genes codificadores de caracteres de interesse agrônomico.

Na hibridação que envolve plantas alógamas, cada grão de pólen leva consigo a herança genética, conseqüente da heterozigose, fazendo com que essas plantas não transmitam à próxima geração, genótipos em que os genes estejam fixados em homozigose, mas, sim, o próprio gameta, tamanha a probabilidade de diferentes combinações alélicas (SOUZA e outros, 2002).

Assim, se considerar que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas masculinos e femininos, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos e, em última análise, de variabilidade genética (SOUZA e outros, 2002).

#### 4.10 Visitantes Florais

Dentre os visitantes florais coletados, foi percebido que cerca de 80% era *Apis mellifera*, como destacado na **Figura 15**. Essa espécie de abelha é comum na visitação de várias espécies de plantas ornamentais. Os outros 20% foram representados por formigas.

Os insetos visitantes das flores de *P. grandiflora* são de hábito diurno, sendo o horário das 8h o mais visitado. Isto se dá por este ser o horário em que, basicamente, todas as flores já se encontravam abertas e, também, os primeiros horários da manhã ser o momento em que a concentração de grãos de pólen é maior.

Foi notada a frequência diária com duração em torno de 8 segundos por flor, sendo que as abelhas saíam pousando várias flores, com maior intensidade de visitação pela manhã.

As flores da *Portulaca grandiflora* tem um colorido bastante atraente, são vistosas, aromáticas, possuem pouco néctar, mesmo assim, causam forte atração aos polinizadores. Tais fatos favorecem à polinização cruzada, principalmente, por insetos (SILVA e SÃO JOSÉ, 1994; HOFFMANN, 1997).



**Figura 15 – Visitante floral: *Apis mellifera* de *P. grandiflora*. Vitória da Conquista - BA, 2009.**

As flores, embora sejam hermafroditas, recebem pólen exógeno (pólen de outra planta da mesma espécie) por meio dos polinizadores.

O bom polinizador visita grande número de plantas da mesma espécie, transportando, por sua vez, numerosos grãos de pólen em seus pêlos (ALMEIDA e outros, 2004), requisito este que faz a *Apis mellifera* ser importante vetor de pólen para *P. grandiflora* Hook, garantindo elevada produção de sementes e assegurando a variabilidade genética da espécie.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com o local e épocas das avaliações, realizadas em *P. grandiflora*, conclui-se que:

- a espécie apresenta antese assincrônica;
- houve redução da disponibilidade do pólen ao longo do dia;
- a viabilidade do pólen se mostrou elevada ao longo do dia;
- a conservação dos grãos de pólen com 90 dias demonstrou bons níveis de viabilidade;
- na germinação *in vitro*, o tratamento com 2,5g de sacarose foi superior aos demais;
- na germinação *in vivo*, o horário das 18h foi o que mostrou maior percentual da germinação do grão de pólen, indicando ser este o melhor horário para obter sucesso reprodutivo com cruzamentos;
- o estigma apresentou receptividade na pré-antese, antese e pós-antese;
- o sistema reprodutivo preferencial da espécie é a polinização cruzada (alogamia);
- a *Apis mellifera* foi o inseto mais comum na visitação de *P. grandiflora*;

Conforme os resultados obtidos e as conclusões expostas acima, entende-se que a pesquisa realizada atingiu seus objetivos de avanço no conhecimento científico de *P. grandiflora*, com vistas ao melhoramento genético de espécies ornamentais, contribuindo aos melhoristas e pesquisadores que trabalham com o tema.

## REFERÊNCIAS

ADHIKARI, K. N.; CAMPBELL, C. G. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. **Euphytica** n.102, p. 87–92. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1998.

AITKEN-CHRISTIE, J. *et al.* Effect nutrient media composition on sugar-free growth and chlorophyll fluorescence of *Pinus radiata* shoots in vitro. **Acta Hort.**, p. 125-130, 1992.

AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, D. G. **Pollination and fruit set in yellow passion fruit**. Havaí: Hawaii Agric. Exp. Sta., 44 p. (Tech. Bull. nº 39). 1959.

ALEXANDER, M.P.A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v.1, n.5, p.13-8, 1980.

ALLARD, R W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 381pp. 1971.

ALMEIDA, E.C. Biologia Floral e mecanismos de reprodução em *Crotaria mucronata*, Desv. **Ceres**, v.33, n.190, p.528-540, 1986.

ALMEIDA, O.S. **Biologia Floral. Tendências reprodutivas e efeito alelopático da tulase (*Ocimum sanctum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia), UESB, Vitória da Conquista, BA. 2007.

ALMEIDA, O.S.; SILVA, A.H.B.; SILVA, A.B.; SILVA, A.B.; AMARAL, C.L.F. Estudo da Biologia Floral e mecanismos reprodutivos do alfavacão

(*Ocimum officinalis* L.) visando o melhoramento genético. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v.26, n.3, p.343-348, 2004.

ANDERSON, G.J. Systematics and biology. In: — HOCH, P.C.; STEPHENSON, A.G. (Eds.). Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. **Monographs in Systematics. Missouri Botanical Garden** v. 53, p.263-272, 1995.

ARROYO, M.T.K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: POLHILL, M.; RAVEN, P.H. (Eds.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, p.723-69, 1981.

AZEVEDO, D. M. P. DE e LIMA, E. F. O **agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão**, Campina Grande–PB, 305p. 2001.

BIONE, N.C.P.; PAGLIARINI, M.S.; TOLEDO, J.F.F. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, p.423-631, 2000.

BORÉM, A. O Melhoramento de Plantas na Virada do Milênio. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.7, jan/fev. p.68-72, 1999.

BROWN, A. H. D. Genetic characterization of plant mating systems. In: BROW, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (ed.). **Plant populations genetics, breeding and genetics resources**. Sinauer, Sunderland, USA, p.145-162, 1989.

BRUCKNER, C.H.; CASALI, V.W.D; MORAIS, C.F.; REGAZZI, A.J.; SILVA, E.A.M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horti.**, v.370: p.45-57, 1995.

BUENO, D. M.; CAVALCANTE, K. L. **Estudo da viabilidade de grãos de pólen de flores de melão (*Cucumis melo* L.)**. Fortaleza – CE; 2001.

CAETANO-PEREIRA, C.M.; PAGLIARINI, M.S. Cytomixis in maize microsporocytes. **Cytologia**, Tokyo, v.62, p.351-355, 1997.

CAETANO-PEREIRA, C.M.; TASCETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S.; BRASIL, E.M. Spontaneous mixoploidy in maize anthers. **Cytologia**, Tokyo, v.63, p.305-309, 1998.

CLEGG, M. T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, **30** (12): 814-818, 1980.

CONSOLARO, M.E.; PAGLIARINI, M.S.; CHAVES, L.J. Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae). **Cytologia**, Tokyo, v.61, p.375-381, 1996.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 191 p., 2002.

DAFNI, A.; MAUÉS, M.M. A rapid and simple, procedure to determine stigma receptivity. **Sex Plant Reprod.**, v.11: p.177-180, 1998.

DAFNI, A.; **Pollination ecology: a practical approach**. IRL, Oxford, 1992.

DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade do pólen em cultivares de laranja doce. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.2, p. 265-272, 1999.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. Microsporogenesis, reproductive behavior, and fertility in five *Pennisetum* species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.67, p.197-201, 1984.

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**, Jaboticabal, SP, v.28, n.1, p. 5-7, 2006.

FARIL, M.; MELO, N.F. Automação e racionalização na micropropagação industrial, **Abctp Notícias**, n.26, 1996.

FERNANDES, P.C.; FACANALI, R.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; MARQUES, M.O.M. Cultivo de manjerição em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.260-264, abril-junho 2004.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA**, v.45, UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258, julho de 2000.

FERRI, M.G. **Botânica morfologia externa das plantas (Organografia)**. 11.ed. São Paulo, Melhoramentos, Ed. da Universidade de São Paulo, p. 63-85, 1976.

FILLIETTAZ, A. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.95, jul./dez., 2007. Melhoramento Genético de Plantas Ornamentais. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v69\\_2/p95.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v69_2/p95.pdf)>. Acesso em: 21/01/10.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding**. Berlin, Springer-verlag, hiedelberg, 1977, p.281.

FRANZON, R.C.; CORRÊA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Teste de germinação *in vitro* e conservação de pólen de feijão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18. 2004, Florianópolis. **Anais...**, 2004.

FONSECA, T.C.; CARMELLO, A.C. de C.; MORETI, A.C.C.C.; ALMEIDA, J.E.; OTSUK, I.P. Viabilidade do Pólen de Amoreira (*Morus alba* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.405-407, jul. 2007.

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, P.R.; RASEIRA, M. do C.B.; BAUDET, L.L.; PSKE, S.T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p. 14-17. 2003.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. de. **Como observar cromossomos** – um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, p.131, 2002.

GUINET, P.H. **Advances in legume biology**: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 842p., 1989.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. Allozyme diversity in plant species. In: BROW, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (ed.). *Plant*

populations genetics, breeding and genetics resources. Sinauer, Sunderland, USA, p.43-63. Johansen, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. 1990.

HARDER, L.D.; BARRET, S.C.H. pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In. —. **Floral biology, studies on floral evolution in animal-pollinated plants**. New York: Chapman e Hall, p.1400190. (eds D.G. LLOYD e S.C.H. BARRET), 1996.

HAROUN, S.A. Chromosome association and pollen fertility of parental and interespecific hybrids of *Lycopersicon esculentum* X *L. hirsutum* and *L. pennellii*. **Genetica**, Dordrecht, v.98, p.103- 106, 1996.

HAUSER, E. J. P.; MARRISON, J. H. The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 51, n. 7, p. 748-752, 1964.

HOFFMANN, M. Polinização do maracujá amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá: temas selecionados (1)**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.58-70, 1997.

JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York:McGraw-Hill, 523p., 1940.

KEARNS, C.A.; INOUE, D.W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, p.579, 1993.

LACERDA, C.A.; OLIVERA, L.M.; ALMEIDA, E.C.; LIMA, J.O.G.. Meio de cultura e condições idéias para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Santa Cruz Kada. **Ceres**, v.42, n.241, p.308-318, 1995.

LATTUADA, D.S.; FIOR, C.S.; RODRIGUES, L.R. **Germinação *in vitro* de pólen de *Portulaca* sp. – testes preliminares.** 16° Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais / 3° Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas / 1° Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas, [2007], Goiânia.

LINSLEY, E.C.; CAZIER, M.A. Further observation on bees which take pollen from plants of genus *Solanum*. **Pan Pacific Entomologist**, v.39, n.1, p.1-18, 1963.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil, Nativas e Exóticas**; Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512p.

MALERBO-SOUZA D. T.; NOGUEIRA-COUTO R. H.; COUTO L. A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40: p.237-242, 2003a.

MALERBO-SOUZA D. T.; NOGUEIRA-COUTO R. H.; COUTO L. A.; SOUZA J. C. Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40: p.272-278, 2003b.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 67, p.101-104, 1996.

MAUÉS, M.M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n. 4, p. 441-448, 2002.

MENDES, M. DA S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum spp.***  
Pelotas: UFPel, 75f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) –  
Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 1994.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: wood  
structure and conclusion of the general introduction**, 2.ed. v.II. Oxford,  
Clarendon Press, 1985.

MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye  
(*Bactris gasipaes*) palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San José,  
v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.

NATION, G. R.; JANICK, J.; SIMON, E. J. Estimation of outcrossing in  
basil. **HortScience**, 27 (11): 1221-1222. 1992.

NUNES, J.C.O. *et al.* Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do  
estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de  
Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.

OLIVEIRA JÚNIOR, A.F. Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos  
fisiológicos da germinação de grãos de pólen do pessegueiro diamante  
(*Prunus persicae* L. Bastch). Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de  
Concentração em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras –  
MG. 58 p, 1999.

OLIVEIRA, M.S.P.; MAUÉS, M.M.; KALUME, M.A. de A. Viabilidade de  
pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasílica**,  
v.15, n.1, p.27-33, 2001.

ORMOND, W.T.; PINHEIRO, M.C.B. Contribuição aos estudos bioquímico e ecológico de *Petiveria alliacea* L. **Revista Brasileira de Biologia**, v.34, n.1, p.123-124, 1974.

OSBORN, N.M.; KEVAN, P.G.; LANE, M. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. **Plant Systematics and Evolution**, 159: 85-94, 1998.

PAGLIARINI, M.S. Meiotic behavior and pollen fertility in *Aptenia cordifolia* (Aizoaceae). **Caryologia**, Firenze, v.43, p.157- 162, 1990.

PATERNIANI, E. Evolução dos sistemas dos vegetais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.26, n.5, p.476-481, 1974.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry: Theoretical and Applied, n.2. **Churchill, Edinburgh**. 1972.

PFAHLER, 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.

PICKERT, M. *In vitro* germination and storage of trinucleate *Arabidopsis thaliana* (L.) pollen grains. **Arabidopsis Information Service**, v.3, p.39-42, 1988.

PIO, L.A.S.; RAMOS, J.D.; PASCAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n.1, p. 147-153, jan/fev. 2007.

POEHLMAN, J.M. Breeding Field crops. 2.ed. Westport, Connecticut: Avi. PUBLISHING COMPANY, 486 p., 1983.

PRIMACK, R.B. Longevity of individual flowers. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.16, p.15-37, 1985.

RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; SALLES, L.A.; CHAGAS, E.C.; PIO, R. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, v.33, n.1, p.51-55. Caracas, Venezuela, 2008.

RIGAMOTO, R.R.; TYAGI, A. P. Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. **South Pacific Journal of Natural Science**, v. 20. p. 30-33. 2002.

SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1**: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n.1, p. 170-174, 2006.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John e Sons, p.325-440, 1995.

SILVA, A. C.; SÃO JOSÉ, A. R. Classificação botânica do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Bahia: Universidade Estadual da Bahia, p.1-5, 1994.

SOUSA, P.J.S. Polinização em maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, p.65-70, 1994.

SOUSA, S.A. **Cultura da Pinheira**: caracterização de frutos, germinação e atributos de qualidade requeridos pelo sistema de comercialização. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia. Cruz das Almas, 2005.

SOUSA, V.A.; PINTO JÚNIOR, J.E. Efeito de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. Embrapa Florestas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.24/25, p.9-17, jan/dez.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*). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras. v.26, n°6, p.1209-1217. nov./dez., 2002.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen**: biology, biochemistry and management. New York: Springer – Verlag, 172p., 1974.

TECHIO, V.H.; *et al.* Viabilidade do Grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim elefante x milheto). **Acta Scientiarum** (UEM), Maringá, v.28, p.7-12, 2006.

TOMBOLATO, A.F.C.; *et al.* **Domesticação e pré-melhoramento de plantas: I. Ornamentais.** Campinas, 56(1), 2004. Disponível em: <<[http://www.iac.sp.gov.br/OAgronomico/56\\_1/InformacoesTecnicas2.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/OAgronomico/56_1/InformacoesTecnicas2.pdf)>>. Acesso em: 02/02/10.

TRINDADE M. S. de A.; SOUSA A. H.; VASCONCELOS W. E. *et al.* Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. sem.1. v.4, n.1, 2004.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora passionflowers of the world.** Portland: Timber Press, 2004. 430p.

VARA PRASAD, P.V.; CRAUFURD, P.Q.; SUMMERFIELD, R.J. Fruit number in relation to pollen production and viability in Groundnut exposed to short episodes of heat stress. **Annals of Botany**, London, v.84, p.381-386, 1999.

VARGAS, D.P. **Mamona (*Ricinus communis* L.):** cultura de anthera, viabilidade e conservação de pólen. Dissertação (Mestrado de Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, RS, 2006.

VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. **Botânica-Organografia:** Quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. 4.ed., Viçosa: UFV, 2003.

WATSON, L. DALLWITZ, M.J. **The Families of Flowering Plants**, 1999.