

Germinação “*in vitro*” de pólen em Nogueira-Pecã cv. Barton

Marina Andressa de Araújo e Silva ⁽¹⁾; **Gilmar Antônio Nava** ⁽²⁾; **Carlos Roberto Martins** ⁽³⁾; **Américo Wagner Júnior** ⁽⁴⁾; **Jakelyne Maria Verus** ⁽⁵⁾.

(1) Engenheira Florestal, Mestranda em Agroecossistemas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos, Dois vizinhos- PR, mah.andreza@gmail.com

(2) Eng. Agr., Dr. em Fruticultura, Professor na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois vizinhos, Dois vizinhos- PR, gilmarlava@utfpr.edu.br

(3) Eng. Agr., Dr., Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas- RS, carlos.r.martins@embrapa.br

(4) Eng. Agr., PhD. em Fitotecnia, Professor na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois vizinhos, Dois Vizinhos- PR, americowagner@utfpr.edu.br

(5) Acadêmica do Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos, Dois Vizinhos – PR, jakelynemaria@outlook.com

INTRODUÇÃO

A Nogueira-pecã [*Carya Illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]] pertence à Família Juglandaceae, sendo nativa das planícies do rio Mississipi, que tem solos bastantes profundos com alta fertilidade e bem drenados, com amplitude de distribuição de Illinois (EUA) até o México (Sparks, 2005). É uma árvore de grande porte, podendo atingir até 40 metros de altura, diâmetro de copa entre 10 a 20 metros e 2 metros de circunferência de tronco, apresentando longevidade de até 200 anos (Brizon, apud Ortiz 2000).

A noqueira-Pecã é uma planta monóica que apresenta flores masculinas e femininas na mesma planta, porém cada cultivar apresenta maturação dessas estruturas em épocas diferentes. Assim, a liberação do pólen ocorre em tempos diferentes e, quanto maior for o período de polinização, maior será o sucesso de fecundação e de frutificação (Stella; Lucchese, 2015).

O pólen da Nogueira-pecã apresenta viabilidade curta, assim é prática comum o armazenamento do pólen para a realização de futuros cruzamentos em programas de melhoramento genético (Faïscas & Madden, 1985). O pólen dessa espécie, para que ocorra a germinação, é dependente de sacarose, que é um regulador de potencial osmótico (Holdaway-Clarke et al., 2003).

Yates et al. (1991) relata que o armazenamento do pólen a -12 °C por um período de até 2 anos em sacos a prova de umidade é considerado igualmente viável ao pólen fresco. Faïscas e Yates (2002) afirmam que o pólen armazenado em nitrogênio líquido pode assegurar sua viabilidade por até 13 anos. Os mesmos autores também citam que o polén pode perder a viabilidade em poucos dias, embora por até 59 dias pode apresentar baixa germinação.

Visto a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a espécie, o objetivo do trabalho foi avaliar a taxa de germinação *in vitro* do pólen da Nogueira pecã, cv. Barton, sob distintas concentrações de sacarose, tempos de incubação em meio de cultura e tempos de secagem do pólen.

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de germinação *in vitro* do pólen foram realizados no laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Dois Vizinhos. O material utilizado para o estudo (amentos contendo o pólen) foi coletado de uma noqueira adulta com 20 anos da cultivar Barton no *Câmpus* no dia 28 de novembro de 2018.

O material foi desmembrado do amento e colocado em uma placa de petri. Os meios de cultura foram preparados utilizando-se ágar a 2,0%, sacarose e água destilada, em concentrações diferentes que eram pesadas com auxílio de uma balança analítica, transferidos para um Becker e diluídos na água destilada. Após esse processo, os meios foram levados ao micro-ondas para aquecê-los na maior potência, onde a cada 10 segundos eram agitados com ajuda de um bastão de vidro e após perceber a gelatinização do material esse era transferido para uma placa de petri, onde o mesmo solidificava e em seguida era cortado em pequenos cubos (1x1cm) e armazenados a fim de serem utilizados posteriormente.

Dois experimentos foram realizados: O primeiro experimento foi arranjado no delineamento inteiramente casualizado num fatorial 4 x 3 (concentrações de sacarose x tempos de incubação em BOD) com quatro repetições. As concentrações de sacarose testadas foram de 10, 20, 30 e 40mg/L⁻¹ e os tempos de incubação à 25 °C foram de 6, 12 e 24 horas. No segundo experimento, as anteras contidas no material coletado (amentos) foram removidas com pinça e acondicionadas em placas de petri para a secagem a temperatura ambiente, por períodos diferentes (1, 2 e 3 dias), constituindo os três tratamentos num monofatorial com quatro repetições.

O material foi colhido, desmembrado e extraído os grãos de pólen. E para adequar esse material foi necessário a utilização de caixas tipo gerbox e laminas de vidro, onde cada caixa gerbox contava com quatro laminas e em cada lamina eram dispostos 2 cubos pequenos do meio de cultura que iria ser testado, para cada meio utilizado foi preciso quatro caixas gerbox sendo ao todo 16 caixas e 64 laminas de vidro utilizadas.

Assim, foram montadas as lâminas com os meios testados e posteriormente acondicionadas em caixas gerbox. Em seguida as caixas receberam um papel toalha umedecido no fundo afim de assegurar a umidade, após essas laminas serem adequadas foi realizado com auxílio de uma pinça a colocação dos cubos do meio sendo dois por lamina, e em seguida com auxílio de um pincel foi realizado o polvilhamento do grão de pólen, sendo aferido dois toques do pincel por cubo para evitar o excesso de grãos e dificultar a leitura. Sendo esse processo repetido para com todos os outros meios de cultura.

As caixas gerbox contendo o pólen a ser incubado foram transferidas para uma BOD a 25 C e a contagem dos grãos de pólen germinados e não-germinados foi realizada com auxílio de um microscópico óptico, com tempo de incubação de 6,12 e 24 horas onde contava-se os grãos de pólen germinados ou não germinados em 100- grãos em quatro pontos diferentes do cubo (400 grãos/amostra no total). Considerou-se grão germinado quando o mesmo apresentava comprimento do tubo polínico maior ou igual ao seu diâmetro. A contagem dos grãos de pólen germinados foi realizada em microscópio com lente de aumento de 10 vezes). Posteriormente, os valores obtidos foram transformados em percentagem.

Aos dados originais aplicou-se os testes de Normalidade de Lilliefors e de análise de variância (ANOVA). Os dados médios dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) com auxílio do pacote estatístico Genes (CRUZ, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 é possível observar que houve interação entre os fatores estudados (concentrações de sacarose x tempo de incubação do pólen). Sobretudo nas menores concentrações de sacarose testadas (10 e 20 g.L⁻¹) observou-se que o pólen apresentou atraso na germinação, necessitando de mais tempo de incubação (pelo menos 12 horas). A maior taxa de viabilidade *in vitro* do pólen da noqueira-pecã cv. Barton (5,73%) foi obtida com a concentração de sacarose de 40 g.L⁻¹ com 24 horas de incubação do pólen à 25°C. Para Conner (2011), o tempo de germinação de 4 a 24 h produz percentagens semelhantes de germinação final do pólen de noqueira-pecã, divergindo parcialmente dos resultados obtidos na presente pesquisa, a depender da concentração de sacarose usada.

Tabela 01 - Germinação “*in vitro*” de pólen de noqueira-pecã, cv. Barton sob diferentes concentrações de sacarose e tempo de incubação. UTFPR-DV, Dois Vizinhos, 2019.

Concentração Sacarose (g.L ⁻¹)	Tempo de incubação			Média
	6 horas	12 horas	24 horas	
10	0,23 bB*	0,46 cAB	0,69 cA	0,46
20	0,27 bB	0,69 cAB	1,02 cA	0,66
30	0,58 bC	1,29 bB	2,00 bA	1,29
40	1,12 aC	3,23 aB	5,73 aA	3,36
Média	0,55	1,42	2,36	1,44
CV (%)	17,51			

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Em função da grande quantidade de pólen contida num só amento, a qual é capaz de gerar produção de 22.000 kg de noz-pecã, como citado por Rohla (2016), é possível inferir que essa espécie frutífera não necessita de alto poder germinativo do pólen para que ocorra índices de frutificação e de produtividade adequados. Observa-se, frequentemente, que o número de amentos em uma árvore adulta é muito expressivo, fator esse que deve compensar as baixas taxas relativas de germinação de pólen em condição natural de campo dessa e de outras cultivares de noqueira-pecã.

Logo, para essa espécie frutífera, de polinização predominantemente alógama, acredita-se que os fatores mais decisivos para a obtenção de altas taxas de frutificação efetiva e boas produtividades estejam mais relacionados com a compatibilidade de pólen e coincidência de floração entre as cultivares presentes no pomar.

Na tabela 2 pode-se observar que a percentagem de germinação *in vitro* do pólen na cultivar Barton foi maior com dois dias de secagem a temperatura ambiente. Isso nos permite compreender ou inferir que as mesmas condições previstas para a germinação “*in vivo*” nas plantas a campo se repetem ao laboratório (*in vitro*), de que o pólen necessita passar por uma leve desidratação a temperatura ambiente para que o mesmo possa germinar.

No entanto, de acordo com Peng et al. (2015), o pólen na noqueira-pecã não perde sua viabilidade rapidamente nos primeiros dias em condições ambientais, mas sua viabilidade é influenciada pela temperatura de reidratação e germinação. Para os mesmos autores, o pólen teve uma temperatura ótima de germinação a 25 °C, mas a temperatura ideal de reidratação, de 16 °C, foi menor do que a temperatura mínima de germinação.

Tabela 02 - Germinação “*in vitro*” de pólen de noqueira-pecã, cv. Barton em resposta ao tempo de secagem do pólen à temperatura ambiente. UTFPR-DV, Dois Vizinhos, 2019.

Tempo de secagem (Dias)	Germinação do pólen (%)
1	0,27 b
2	3,49 a
3	0,57 b
Média	1,44
CV (%)	11,51

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P≤0,05).

CONCLUSÕES

A maior taxa de germinação in vitro do pólen de noqueira-pecã cv. Barton foi obtida com 40 g.L⁻¹ de sacarose e 24 horas de incubação à 25°C. A viabilidade do pólen reduziu a partir do segundo dia de secagem e acondicionamento em temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

CONNER, P. J. Optimization of in vitro pecan pollen germination. **HortScience**, v. 46, n. 4, p. 571-576, 2011.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 285 p.

HOLDAWAY-CLARKE, T. L.; WEDDLE, N. M.; KIM, S.; ROBI, A.; PARRIS, C.; KUNKEL, J. G.; HEPLER, P. K. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. **Journal of Experimental Botany**, p. 65–67, 2003.

ORTIZ, E. R. N. **Propriedades nutritivas e nutracêuticas das nozes**. Monografia apresentada ao curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade de Santa Cruz do Sul. 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201711/07100436-propriedades-nutritivas-e-nutraceuticas-das-nozes-edson-ortiz.pdf>>

PENG, H. Z.; JIN, Q. Y.; YE, H. L.; ZHU, T. J. A novel in vitro germination method revealed the influence of environmental variance on the pecan pollen viability. **Scientia Horticulturae**, v. 181, p. 43-51, 2015.

ROHLA, C. Cross pollination is essential for pecan production. The Samuel Roberts Noble Foundation. Center for Pecan and specialty agriculture, 2016. 1 p.

SPARKS, D.; MADDEN, G. Pistillate flower and fruit abortion as affected by cultivar, time, and pollination. **Journal of American Society for Horticultural Science**, p. 219-223, 1985.

SPARKS, D.; YATES, I. E. Pecan pollen stored over a decade retains viability. **Hortscience**, p. 176-177, 2002.

STELLA, A. L. S.; LUCCHESI, A. O. **Avaliação da Bibliografia Livre Como Subsídio aos Sistemas de Cultivo de Nogueira-Pecã (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch)**. Relatório Técnico científico. SEMINÁRIO DE INOVAÇÃO E TECNOLOGIA, 5., 2015, Ijuí. 7 p.

YATES, I. E.; SPARKS, D.; CONNOR, K.; TOWILL, L. Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. **Journal American Society for Horticultural Science**, p. 430-434, 1991