

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NA GERMINAÇÃO DE PÓLEN DE SETE ESPÉCIES DE *PINUS*

Antonio Nascim Kalil Filho¹
Maria Elisa Cortezzi Graça²
Antonio Carlos de Souza Medeiros³

RESUMO

Este trabalho verificou a viabilidade do pólen de sete espécies de *Pinus*, através de testes de germinação, em diferentes concentrações de sacarose *in vitro*. As concentrações de 10% e 20% foram as melhores para todas as espécies de *Pinus* estudadas. A espécie *Pinus elliotii* var. *elliotii* apresentou a mais alta taxa de germinação na concentração de 10% de sacarose, embora não diferindo estatisticamente do *P. kesyia*. *Pinus echinata* apresentou o maior valor de germinação máxima na concentração de 20% de sacarose.

PALAVRAS-CHAVE: viabilidade, melhoramento genético.

ABSTRACT

This paper verifies pollen viability of seven *Pinus* under different sucrose levels. The best sucrose concentrations are 10% and 20%. *P. elliotii* var. *elliotii* exhibits the higher pollen germination, but it not differs from *P. kesyia*. *P. echinata* presented the best germination level at 20% of sucrose.

KEY-WORDS: viability, genetic improvement.

¹ Eng. Agrônomo, Doutor, CREA nº 49.250/D, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

² Eng. Agrônomo, Doutor, CREA nº 14659, 7ª Região, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

³ Eng. Agrônomo, Doutor, CREA nº 9637/D, Pesquisador da *Embrapa Florestas*.

INTRODUÇÃO

No programa de melhoramento do gênero *Pinus*, a produção de sementes híbridas ocorre nos pomares clonais e bancos de genes formados a partir de espécies economicamente importantes, para condições edafoclimáticas específicas. Na Austrália, têm sido formados diversos híbridos de polinização controlada em pomares clonais (Nikles et al., 1987). Híbridos superiores entre *P. elliotii* var. *elliottii* e *P. caribaea* var. *hondurensis* em relação ao vigor, circunferência do tronco, resistência ao vento e tolerância ao encharcamento foram produzidos em Queensland, Austrália (Slee & Abbott, 1990). O pólen de *P. caribaea* var. *hondurensis* é aplicado artificialmente sobre estróbilos femininos de *P. elliotii* var. *elliottii* sem o seu isolamento. Como, em geral o pólen de *P. elliotii*, espécie monóica, é auto-incompatível, a maioria das sementes produzidas é híbrida (Slee & Abbott, 1990).

Trabalhos referentes à palinologia de *Pinus* são relevantes à medida em que a produção de híbridos é obrigatoriamente artificial, como nos casos em que ocorre assincronia de florescimento entre as diferentes espécies. Portanto, é de fundamental importância e inerente ao trabalho de produção de híbridos a aplicação de pólen de boa qualidade, com elevada capacidade de germinação.

Em 1910, Pfundt já relatava que o pólen da família *Pinaceae* é longo vivo sob condições favoráveis (Johri & Vasil, 1961). O pólen de *Pinus* é testado por germinação e coloração (teste do tetrazólio). Estróbilos masculinos de *P. elliotii* var. *elliottii* apresentam o ponto de maturação para coleta, quando apresentam cor azul apurpurada. O processo de abertura de estróbilos é acelerado quando estes são colocados num balde d'água, em casa-de-vegetação. O pólen destas espécies deve ser armazenado em condições ambientais ajustadas para 3,8°C e 30% de umidade relativa do ar (Righter, 1939). Duffield (1954) assevera que o pólen de *Pinus* é totalmente sensível à temperatura e à umidade do ambiente, mesmo tendo-se em conta o fato de conservar-se por mais tempo que o pólen de várias outras Gimnospermas. O pólen de *Pinus*, armazenado por dois meses possui a mesma percentagem de germinação de pólen fresco à temperatura ambiente. Barber & Stewart (1957), Duffield & Callahan (1959) e Ehreberg (1961), citados por Snyder (1961) afirmam que pólen armazenado em freezer e utilizado nas polinizações artificiais produz mais sementes que pólen por ser mais viável que pólen armazenado em temperaturas de geladeira, em torno de 4°C.

Brewbaker (1963), citado por Martin (1970), relata que estudos de germinação dos grãos de pólen são geralmente feitos *in vitro*, pois muitos grãos de pólen são capazes de germinar numa solução aquosa contendo sacarose e

poucos sais minerais, especialmente o cálcio e o boro.

De todos os carboidratos, a sacarose e o mel são os mais frequentemente adicionados no meio de germinação de grãos de pólen (Goddard & Mathews, 1981). Segundo Goddard & Mathews (1981), é recomendada a concentração de 10% de sacarose para uso, mas alguns pólenes de *Pinus* armazenados apresentam maior germinação na concentração de 20% de sacarose (Snyder & Clausen, 1974).

A variabilidade da germinação de pólen de *Pinus* é, em parte, decorrente do armazenamento (Goddard & Mathews, 1981). Outros aditivos como mel e boro também foram utilizados em testes de viabilidade de pólen de *Pinus*. O meio contendo sacarose foi utilizado para comparação com o meio de Brewbaker & Kuwack (1963) por Sousa-Lang & Pinto Junior (1997) em *Eucalyptus* sp. Estes autores constataram que quando o meio de Brewbaker & Kuwack (1963) foi ajustado, ampliando-se a concentração de sacarose de 10% para 30%, este último superou o meio contendo apenas sacarose a 10%, evidenciando que a sacarose é de alta relevância para a germinação de pólen *in vitro*.

Segundo Denison & Franklin (1975), o pólen deve ser coletado no momento de máxima maturidade fisiológica, coincidindo com a maturidade da deiscência dos estróbilos.

O presente trabalho tem por objetivo testar a germinação de pólen de sete espécies de *Pinus*, sob diferentes concentrações de sacarose. Trabalhos similares ainda não têm sido levados a efeito.

MATERIAL E MÉTODOS

As espécies utilizadas para o estudo de pólen foram: *Pinus elliotii* var. *elliotii*, *P. caribaea caribaea*, *P. oocarpa*, *P. kesyia*, *P. cubensis*, *P. occidentalis* e *P. echinata*.

O pólen foi coletado nos meses de maio a outubro, retirando-se os ramos contendo os estróbilos maduros (começando a soltar pólen), em sua maioria, na parte inferior da copa. Os ramos contendo estróbilos foram colocados em um saco de polietileno e encaminhados ao laboratório. Apenas os estróbilos abertos foram retirados. A extração do pólen foi realizada com o auxílio de funis metálicos. Em sua parte inferior foi acoplado a outro tubo plástico unido a um tubo de borracha, fixado por uma presilha. Os estróbilos foram colocados em uma peneira de malha fina em

camada rasa, acondicionada no interior do funil, juntamente com “bonecas” de sílica-gel, presas externamente. Para a extração, portanto, as condições ideais foram baixa umidade, proporcionada pela sílica-gel e alta temperatura, verificada no interior de casa-de-vegetação. Após a secagem do pólen, procedeu-se à obtenção dos grãos de pólen, batendo-se com pedaço de madeira num dos lados do funil para que ocorresse a acumulação do pólen no tubo de borracha. O pólen foi retirado, abrindo-se a presilha, sendo recebido num frasco de vidro, com uma camada fina de aproximadamente 1 cm de altura, para ser mantido seco. Em seguida, o pólen foi peneirado em tecido de malha fina (voal). O pólen foi beneficiado, colocando-se em frascos com tampões de algodão e “bonecas” de sílica-gel. O ponto ideal de secagem foi aquele no qual não ocorre mudança de coloração das “bonecas” de sílica-gel. Quando se atingiu este ponto, as “bonecas” de sílica-gel foram trocadas. O pólen foi embalado em vidros munidos de tampões e “bonecas” de sílica-gel e, imediatamente colocados em dessecador, sendo armazenado em freezer a -15°C , seguindo-se, imediatamente, as análises de germinação.

O teste de viabilidade por germinação foi conduzido de acordo com Duffield (1954). Dessa forma, utilizou-se a parafina solidificada em caixas do tipo gerbox, apresentando 16 orifícios. Nestes orifícios foi colocado o pólen diluído e homogeneizado em solução de sacarose a 10%, 20%, 30% e 40% (meio de cultura). A placa foi tampada, após sua superfície de junção haver sido untada com vaselina e levada ao germinador mantido a 28°C , por 72 horas no escuro. Após este período, a placa foi retirada e o pólen levado a uma lâmina onde, com o auxílio de um microscópio, sob aumento de 100 vezes, foram contados os grãos de pólen germinados. Foram avaliados 200 grãos de pólen, em 2 repetições de 100 grãos de pólen. A análise de variância para *P. echinata* foi feita separadamente daquela concernente às outras seis espécies, uma vez que, no primeiro caso, foram utilizadas seis repetições.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com 2 repetições, sendo utilizado o teste de Tukey para a comparação de espécies e regressão polinomial para o estudo das concentrações de sacarose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As comparações de médias de germinação de pólen entre espécies para cada concentração de sacarose, segundo o teste de Tukey (Tabela 1, Figura 1) mostraram que: 1) na concentração de 10%, a germinação de *P. elliotii* não

diferiu da de *P. kesyia*, mas diferiu da germinação de pólen das demais espécies. A germinação de pólen de *P. kesyia* diferiu estatisticamente apenas daquela encontrada em *P. cubensis*. As demais espécies não diferiram entre si; 2) na concentração de 30%, a germinação de pólen de *Pinus elliotii* var. *elliotii* não diferiu estatisticamente das encontradas em *P. oocarpa*, *P. kesyia* e *P. occidentalis*, diferindo das germinações encontradas em *P. oocarpa*, *P. cubensis* e *P. caribaea caribaea*. Com exceção de *P. elliotii* e *P. kesyia*, as demais espécies não diferiram entre si quanto à germinação de pólen; 3) nas concentrações de 20% e 40% não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as espécies de *Pinus*.

Cook & Stanley (1960) relatam que a variação de mais ou menos 10%, usando-se 200 grãos de contagem de pólen de *Pinus* pelo método colorativo de cloreto de tetrazólio, não é incomum. Pólen de *Pinus* em desenvolvimento apresenta-se suscetível a baixas ou altas temperaturas, respondendo com baixa porcentagem de germinação.

TABELA 1 – Médias de germinação do pólen de seis espécies de *Pinus* com quatro concentrações de sacarose.

	CONC. SACAROSE (%)			
	10	20	30	40
<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	92,11 a	56,01 a	42,82 a	0 a
<i>P. kesyia</i>	47,71 ab	19,83 a	4,72 ab	0 a
<i>P. occidentalis</i>	33,94 bc	27,28 a	0,50 ab	0 a
<i>P. oocarpa</i>	5,27 bc	17,96 a	14,54 b	0 a
<i>P. car. caribaea</i>	2,92 bc	29,29 a	0 b	0 a
<i>P. cubensis</i>	8,76 c	16,99 a	0 b	0 a

*Valores seguidos por mesma letra no sentido vertical, não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 2 - Análise de variância e médias de germinação de pólen de *Pinus echinata* em diferentes concentrações de sacarose.

	CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE (%)			
	10	20	30	40
Germinação	19,82	67,05	20,89	0
C.V.	G.L.	Q.M.	F	PROB> F
Regr.Linear	1	3440,0	27,5	0,00013
Regr.Quadrát.	1	4658,9	37,3	0,00004
Desv. De Regr.	1	970,7	7,8	0,01104
Residuo	20	125,1		

Pólen de diversas espécies de *Pinus* tem uma alta percentagem de germinação, germinação mais rápida e tubos polínicos mais longos em meio contendo sacarose quando comparados à utilização de apenas água destilada (Stanley, 1967). De acordo com esse autor, a sacarose, sendo um carboidrato, supre energia para o pólen germinar.

Foi observado também (Tabelas 1 e 2 e Figura 1) que *P. elliotii* var. *elliotii*, *P. kesyia* e *P. occidentalis* apresentaram as maiores percentagens de germinação na concentração de 10%, oficialmente recomendada por Goddard & Mathews (1981) para *Pinus*. Entretanto, pólenes de *P. oocarpa*, *P. caribaea* var. *caribaea*, *P. cubensis* e *P. echinata* germinaram melhor na concentração de 20% de sacarose, concordando com os resultados de Snyder & Clausen (1974).

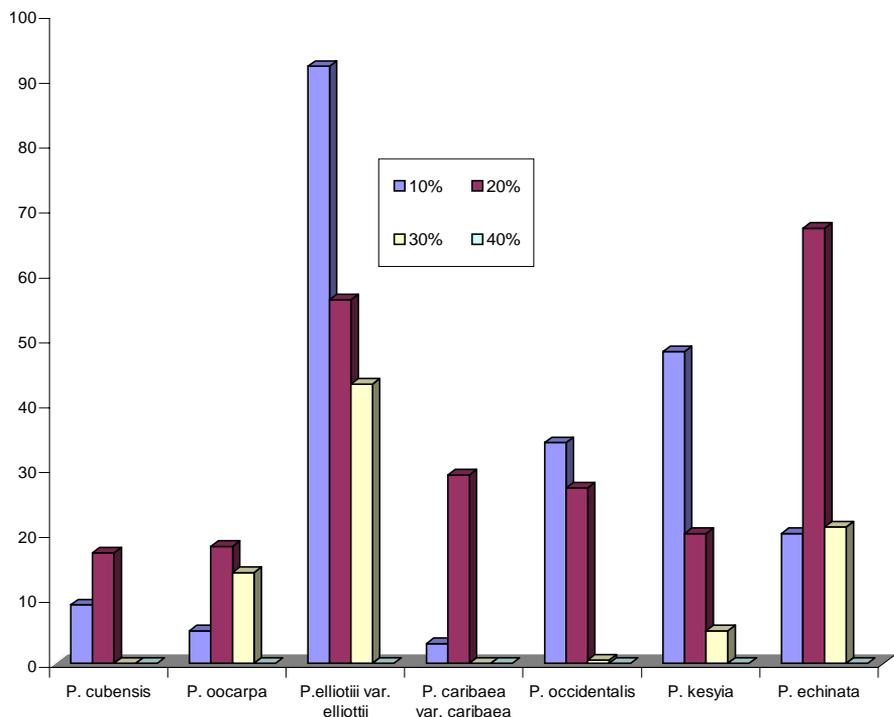
As equações de regressão polinomial da germinação de pólen de *Pinus* em função da concentração de sacarose mostram alta precisão (R^2 altos) em *P. oocarpa*, *P. elliotii* var. *elliotii*, *P. occidentalis*, *P. kesyia* e *P. echinata* (Tabela 3).

Tabela 3 – Modelos de germinação de pólen de espécies de *Pinus* em função da concentração de sacarose.

Espécies	Equação polinomial	Coefficiente de determinação (R ²)
<i>P. cubensis</i>	$G = 20,5 + 0,13C - 0,02C^2$	0,66
<i>P. oocarpa</i>	$G = -16,9 + 3,85C - 0,09C^2$	0,99
<i>P. elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	$G = 78,4 - 0,33C - 0,04C^2$	0,95
<i>P. caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	$G = -2,45 + 2,24C - 0,06C^2$	0,45
<i>P. occidentalis</i>	$G = 51,5 - 1,35C$	0,89
<i>P. kesyia</i>	$G = 62,8 - 2,04C + 0,01C^2$	0,99
<i>P. echinata</i>	$G = -15,7 + 5,89C - 0,13C^2$	0,89

G = germinação e C² = Concentração de sacarose

Figura 1 – Germinação de pólen de sete espécies de *Pinus* sob diferentes concentrações de sacarose.



CONCLUSÕES

Os melhores percentuais de germinação de pólen de *Pinus* podem ser alcançados nas concentrações de 10% e 20% de sacarose, para as sete espécies de *Pinus* estudadas. As mais altas taxas de germinação foram obtidas com pólen de *Pinus elliottii* var. *elliottii*, *P. echinata* e *P. kesyia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BREWBAKER, J.L.; KWACK, B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, New York, v.50, p.859-865, 1963.
- COOK, S.A.; STANLEY, R.G. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. **Silvae Genetica**, v.9, n.5, p.134-136, 1960.
- DENISON, N.P.; FRANKLIN, E.C. **Pollen management**. London: Majesty's Stationary Office, 1975. 100p.
- DUFFIELD, J.W. Studies of storage, extraction and testing of Pine pollen. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.3. n.2, p.39-45, 1954.
- DUFFIELD, J.W.; CALLAHAM, R.Z. Deep freeezing pine pollen. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.8. p.2-24, 1958.
- DUFFIELD, J.W. Studies of storage, extraction and testing of Pine pollen. **Silvae Genetica**, v.3. n.2, p.39-45, 1954.
- GODDARD, R.E.; MATHEWS, F.R. Pollen testing In: FRANKLIN, C.E. **Pollen management handbook**. Washington: USDA. Forest Service, 1981. 98p. (Agriculture Handbook, 587).
- JOHRI, B.M.; VASIL, J.K. Physiology of pollen. **Botanical Review**, Bronx, v.27. n.3. p.325-381, 1961.
- MARTIN, F.W. Pollen germination on foreign stigmas. **Bulletin of Toney Botanical Club**, v.97, n.1, p.1-6, 1970.
- NIKLES, D.G.; BOWYIER, P.C.; EISEMANN, R.L. Performance and potential of hybrids of slash and Honduras Caribbean pines in the subtropics. In: SIMPÓSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENETICO DE SPECIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires. **Proceedings**. Buenos Aires: Centro de Investigaciones y Experiências Forestales, 1987.

- RIGHTER, F.I. A simple method of making germination tests of pine pollen. **Journal of Forestry**, v.37. p.574-576, 1939.
- SLEE, M.U.; ABBOTT, D.C. Pollination investigations for production of the hybrid between Slash and Caribbean Pines. **South African Forestry Journal**, Pretoria, n.152, p.191, 1990.
- SNYDER, E.B. **Extracting processing and storing southern pine pollen**. New Orlenas: USDA. Forest Service, Southern Forest Experiment Station, 1961. 14p.
- SNYDER, E.B.; CLAUSEN, K.E. Pollen handling. In: SCHOPMEYER, C.S. **Seeds of woody plants in the United States**. Washington: USDA, 1974. 883p. (USDA. Agriculture handbook, 450).
- SOUSA-LANG, V.A. de; PINTO JUNIOR, J.E. Influência do meio de cultura na germinação do pólen de três espécies de *Eucalyptus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.34, jan./jun. 1997.
- STANLEY, R.G. Factors affecting germination of pollen grain. In: IUFRO CONGRESS, 14., 1967, Munich. **Proceedings**. Munich, 1967. p.38-59.