

CRIOPRESERVAÇÃO DE PÓLEN DE *Eucalyptus* SPP.

Valderês Aparecida de Sousa*

RESUMO

Observou-se o efeito do congelamento do pólen para algumas espécies de *Eucalyptus* com o objetivo principal de adaptar técnicas de criopreservação para o armazenamento a longo prazo. Um lote de pólen de *Eucalyptus urophylla* (umidade não determinada), *E. robusta* (3,05% de umidade) e dois de *Eucalyptus dunnii* (umidades respectivas de 5,61% e 4,52%) foram utilizados. A taxa de resfriamento em nitrogênio líquido (-196°C) foi de 19°C x min⁻¹ e a viabilidade determinada pelo teste de germinação "in vitro". Não se verificou o efeito negativo do congelamento sobre o pólen das espécies estudadas. Os resultados apontam a criopreservação como método potencial para o armazenamento a longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação, pólen, germinação "in vitro", *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus robusta* e *Eucalyptus dunnii*.

CRYOPRESERVATION OF *Eucalyptus* SPP. POLLEN

ABSTRACT

The consequence of freezing on pollen viability in three *Eucalyptus* species was observed, aiming to adapt techniques of cryopreservation for long term storage. *Eucalyptus urophylla* (undetermined humidity), *Eucalyptus robusta* (3,05% humidity) and *Eucalyptus dunnii* (5,61% and 4,52% humidity respectively) were examined. The cooling rate in liquid nitrogen (-196°C) was 19°C x min⁻¹. The viability was determined by "in vitro" germination test. Under these condition freezing has not affected pollen viability. Therefore, cryopreservation is a potential method for long term pollen storage.

KEY-WORDS: Cryopreservation, pollen, "in vitro" germination, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus robusta* e *Eucalyptus dunnii*.

1. INTRODUÇÃO

A hibridação em *Eucalyptus* tem sido utilizada visando a combinação de características favoráveis de diferentes indivíduos. Esse procedimento possibilita a obtenção de plantas que podem ser mais adaptadas e produtivas para o emprego

* Eng.-Florestal, M.Sc., CREA n° 124.217/D, Pesquisadora da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas.

em áreas marginais, onde as espécies parentais não desenvolvem-se satisfatoriamente.

O armazenamento de pólen é um processo imprescindível quando se pretende proceder o cruzamento de espécies com períodos distintos de floração. Para que o mesmo tenha sucesso, fatores como a sua umidade e temperatura de armazenamento devem ser controlados. Estes estão diretamente relacionados ao metabolismo do pólen e à contaminação por microorganismos. A redução dessas atividades tende a aumentar a longevidade do pólen armazenado. O método de armazenamento a longo prazo mais promissor é em nitrogênio líquido. Com temperatura em torno de -196°C , o metabolismo do pólen reduz-se a praticamente zero, permitindo, teoricamente, a manutenção de sua viabilidade por um período indefinido.

Os estudos de armazenamento de pólen de *Eucalyptus* têm sido feitos considerando apenas a curto e médio prazos. No entanto, devido à sazonalidade da produção de flores e a baixa longevidade do pólen sob condições naturais, faz-se necessário desenvolver uma tecnologia de armazenamento a longo prazo. Com isso, será possível coletar pólen em anos de abundante floração, amostrando, assim, a maioria dos genes da população. Esse procedimento é de grande utilidade, também, para a manutenção do germoplasma na forma de banco de conservação.

Pretende-se neste trabalho, desenvolver técnicas de armazenamento de pólen de *Eucalyptus* na forma de criopreservação para a manutenção de sua viabilidade a longo prazo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O armazenamento de pólen em nitrogênio líquido tem sido aplicado com sucesso para diversas áreas florestais. Dentre essas, há relatos de armazenamento por 5 a 7 anos (LIVINGSTON & CHING 1967). Pólen de *Pseudotsuga menziesii* foi mantido viável por três anos (COPEES, 1987) e de *Juglans regia* L. por um ano (LUZA & POLITO 1988). Outros pesquisadores como PARFITT & ALMEHDI (1983) armazenaram com sucesso o pólen de *Vitis vinifera*. O sucesso dessa tecnologia está fortemente ligado a uma série de fatores, principalmente o teor de umidade. Aparentemente, existe um nível ideal de umidade para cada espécie.

COPEES (1987) armazenou o pólen de *Pseudotsuga menziesii* com umidade entre 4 a 7%, enquanto que para o pólen de *Juglans regia* a umidade ideal era entre 3,2 e 7,0% (LUZA & POLITO, 1988). Existem, também, espécies cujos pólenes perdem a viabilidade com a secagem drástica, como *Simmondria chinensis* e *Zea mays*. Nessa última espécie, o estágio trinuclear do pólen dificulta o processo. A umidade elevada é prejudicial para a criopreservação pois concorre para a formação de gelo intracelular na ocasião do congelamento.

Em geral, o limite máximo de umidade do pólen, previamente ao seu congelamento, para diversas espécies, está entre 20 e 40%. Por outro lado, o limite inferior estimado entre 1% e 5% deve ser utilizado com cuidado, pois pode haver redução de viabilidade a esses níveis (KARTHA 1985).

Os crioprotetores constituem-se um meio para superar o problema de injúrias provocadas pelo congelamento. Existem vários produtos que podem ser utilizados com essa finalidade, como etanol, glicóis DMSO (dimetilsulfóxido), acetado de amônio, carboidratos, sorbitol, betaína, sarcosina, uréia, açúcares, álcoois-açúcares, vários aminoácidos, polióis, óxido de trimetilamina e finalmente o glicerol como o

mais efetivo (KARTHA 1985). Esse último tem a vantagem de não ser tóxico mesmo em alta concentração. Ele tem se mostrado eficiente para as células animais (KARTHA 1985), mas não para as vegetais (LUIZA & POLITO 1988). Os aminoácidos são considerados bons crioprotetores de células vegetais, devido à sua rápida permeabilidade (KARTHA 1985).

Outro fafor muito discutido no armazenamento em nitrogênio líquido é a velocidade do processo. Pesquisadores como LUZA & POLITO (1988) aconselham o congelamento lento (1°C/min), enquanto que outros defendem uma taxa alta (150°C/min) e até uma ampla faixa de velocidade, desde 0,5°C/min a 100°C/min (Nath & Anderson e Lu et al., respectivamente, citados por LUZA & POLITO (1988).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram feitos três ensaios para detectar o efeito do congelamento sobre a manutenção da viabilidade do pólen de *E. dunnii*, *E. urophylla* e *E. robusta*. Foram avaliados quatro lotes de pólen, sendo A e B de *E. dunnii*, C de *E. urophylla* e D de *E. robusta*. Os lotes A e B apresentavam umidades respectivas de: 5,61%, 4,52%. O lote C foi seco por 48 horas em dessecador com sílica-gel, o lote D apresentava 3,05%. O material em estudo foi coletado de árvores originárias da Austrália (*E. dunnii* de Acácia Creek, *E. robusta* de Newfoundland e *E. urophylla* de procedência desconhecida). O pólen das duas primeiras espécies foi coletado de árvores plantadas em Colombo-PR e a última espécie de Itapetinga-SP.

A umidade foi reduzida em dessecadores com sílica-gel, sob vácuo. Em seguida congelou-se o pólen à taxa de -19°C por minuto até atingir -196°C. O pólen foi retirado do nitrogênio líquido para a determinação de sua viabilidade pelo teste "in vitro". A testemunha também teve a sua viabilidade avaliada pelo mesmo teste. Esse método envolveu o meio de cultura com sacarose e ágar nas concentrações respectivamente de 30% e 0,8%. Após a incubação por 24 horas em câmara de germinação (25°C e 99% de umidade relativa), foram avaliados 370 grãos de pólen por tratamento repetido. Essa quantidade de grãos é recomendada por GDDARD & MATTHEWS (1981).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Figura 1, não se notou o efeito negativo do congelamento sobre a viabilidade do pólen das espécies estudadas. Os resultados mostraram dois grupos distintos: o primeiro (*E. dunnii* - 5,6% de umidade e *E. urophylla*) não teve a sua viabilidade reduzida após o congelamento em nitrogênio líquido e o outro (*E. robusta* e *E. dunnii* - 4,3% de umidade) que, surpreendentemente, teve a sua viabilidade incrementada. Não houve diferença estatística significativa ($X^2 = 0,08$ n.s. GL = 1) entre o pólen submetido ao nitrogênio líquido e a testemunha de *E. dunnii* com umidade de 5,61%. O segundo com 4,25% de umidade mostrou maior viabilidade do pólen tratado sobre a testemunha ($x^2 = 14,33^{**}$ GL = 1), sugerindo que o pólen com menor umidade, quando submetido ao nitrogênio líquido, apresenta a sua germinação estimulada. Futuras investigações deverão esclarecer essas observações. Esse fenômeno não tem sido bem entendido, mas pesquisadores como KARTHA (1985) também verificaram maior viabilidade do pólen congelado, comparativamente ao recém-colhido. Segundo esse autor, durante esse processo de

congelamento pode haver a liberação de alguns nutrientes necessários à germinação do pólen.

5. CONCLUSÕES

O congelamento do pólen, em nitrogênio líquido (-196°C), para diferentes espécies de *Eucalyptus* foi bem sucedido, considerando a umidade igual ou inferior a 5,61%. Por conseguinte, o armazenamento em nitrogênio líquido pode ser considerado promissor para manutenção da viabilidade a longo prazo.

6. BIBLIOGRAFIA

COPEL, D.L. Long term storage of douglas-fir pollens. **Forest Science**, Washington, v.33, n.1, 244-46, 1987.

GODDARD, R.E.; MATTHEWS, F.R. **Pollen management handbook**. Washington, 1981. p.40-43.

KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, CRC Press., 1985. 276p.

LIVINGSTON, G.K.; CHING, K.K. The longevity and fertility of freeze dried douglas-fir pollen. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.16, p.98-101, 1967.

LUZA, J.G.; POLITO, V.S. Cryopreservation of english walnut (*Juglans regia* L.) pollen. **Euphytica**, Wageningen, n.37, p.141-48, 1988.

PARFITT, D.E.; ALMEHDI, A.A. A cryogenic storage of grape polen. **American Journal of Enology and Viticulture**. Davis, v.34, n.4., p.227-28, 1983.

7. AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos aos seguintes pesquisadores:

- José Kazumassa Thaira pelo apoio à execução desse trabalho nas dependências do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR).
- Jarbas Yukio Shimizu pelas valiosas sugestões na composição desse trabalho.

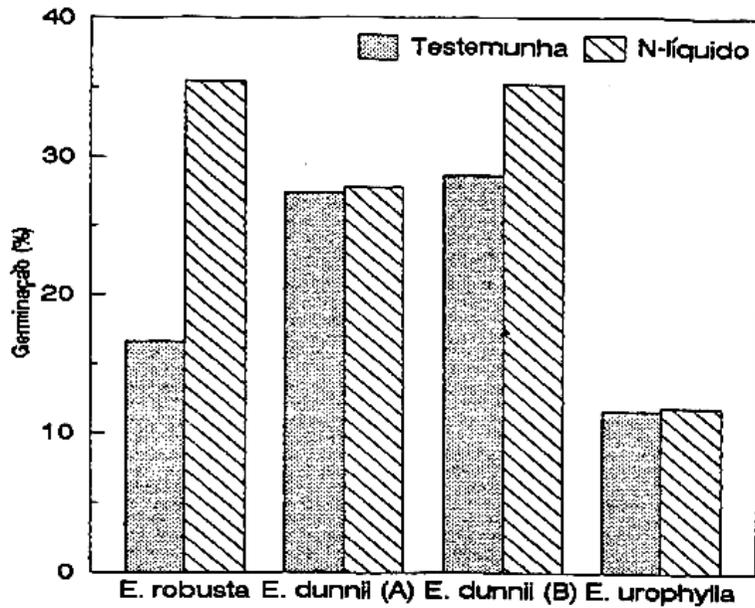


FIGURA1. Viabilidade do pólen para diferentes espécies de *Eucalyptus* após o congelamento em nitrogênio líquido.