

EFEITO DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA VIABILIDADE DE PÓLEN DE *Eucalyptus* spp.

Valderês Aparecida de Sousa*
José Elidney Pinto Júnior**

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi testar diferentes tipos de solventes orgânicos, visando a sua aplicação no transporte e no armazenamento do pólen a longo prazo. O efeito do benzeno, xileno, metanol e tolueno sobre a viabilidade do pólen de *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus robusta* Smith e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake foi avaliado, após a sua imersão nos referidos solventes. Aproximadamente três horas depois, procedeu-se ao teste de germinação "in vitro" em meio de cultura composto de 0,8% de ágar e 30% de sacarose. A contagem de 370 grãos, por repetição, revelou que o benzeno não afetou a viabilidade do pólen de *E. dunnii* e *E. urophylla*. Já o xileno e tolueno não reduziram a viabilidade do pólen de *E. dunnii*, *E. uriphylla* e *E. grandis*. Esses resultados revelam a conveniência de se reforçar a utilização do benzeno, tolueno e xileno em pesquisas relacionadas com o transporte de pólen assim como o seu armazenamento a longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE: *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus robusta*, *Eucalyptus urophylla*, solventes orgânicos, armazenamento de pólen, germinação "in vitro".

EFFECT OF ORGANIC SOLVENTS ON THE VIABILITY OF *Eucalyptus* spp. POLEN

ABSTRACT

For a long-term storage of *Eucalyptus* pollen, a preservative solvent may be required. Benzene, xylene, toluene and methanol were evaluated for their effects on pollen viability of *Eucalyptus dunnii* Maiden, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus robusta* Smith e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Pollen was immersed for almost three hours, and germination trials were carried out on a media containin a mixture of 0,8% of agar and 30% of sucrose. The results indicated that benzene, toluene and xylene are appropriated to pollen manipulation for *E. dunnii* and *E. urophylla*, while *E. grandis* pollen should be treated with either toluene or xylene.

KEY-WORDS: *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus robusta*, *Eucalyptus urophylla*, organic solvents, pollen storage, "in vitro" germination.

* Eng.-Florestais, M. Sc., CREA n° 124.217-D e 70858-D, respectivamente, Pesquisadores da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisas de Florestas.

1. INTRODUÇÃO

Programas de melhoramento envolvendo a produção de sementes por polinização controlada dependem grandemente de um eficiente sistema de manipulação de pólen. Como principais características 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 uma adequada viabilidade. O armazenamento de pólen justifica-se para os programas de hibridação, quando há defasagem no florescimento entre as espécies e o pólen apresenta baixa longevidade sob condições naturais. Deve-se considerar importante, também a sua aplicação aos programas de conservação genética, sob a forma de bancos, onde a reposição periódica de pólen se faz necessária em função da queda de sua viabilidade. Muitos métodos têm sido utilizados para essa finalidade. Todavia, alguns deles, apesar de atrativos, dependem da disponibilidade de equipamentos especiais e do desenvolvimento de técnicas sofisticadas, tais como a liofilização e o armazenamento em recipientes contendo gases liquefeitos. Existem métodos mais fáceis e práticos como o armazenamento em solventes orgânicos que, segundo STANLEY & LINSKENS (1974), apresentam baixo custo e a possibilidade do transporte eficiente, sem a necessidade do uso de gelo seco ou refrigeração. O pólen de *Camellia japonica*, por exemplo foi transportado com sucesso, após sua imersão em solventes orgânicos, por Okohama a Fukuoka no Japão, segundo IWANAMI (1972).

O objetivo desse trabalho foi testar os efeitos dos solventes orgânicos na manutenção da viabilidade do pólen, visando estudos de longo prazo com transporte e armazenamento de pólen. Discutiram-se os resultados obtidos do emprego de quatro solventes orgânicos sobre o pólen de quatro espécies de *Eucalyptus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os estudos sobre manuseio do pólen de espécies florestais, a nível mundial, têm sido pouco numerosos, a despeito de sua importância para os programas de melhoramento e conservação genética. Os trabalhos pioneiros tratando de pólen de *Eucalyptus* surgiram no final da década de 50, na Austrália, primeiramente com PRYOR (1954) e, em seguida, com BODEN (1958). No Brasil, o primeiro trabalho sobre manuseio de pólen de *Eucalyptus* spp. foi publicado por GABRIELLI et al. (1965). Para esse mesmo gênero, estudos sobre coleta de pólen podem ser observados nos trabalhos de BORGES et al. (1973) e SOUSA (1982); sobre extração, nos trabalhos de SOUSA (1982), SOUSA (1983a) e SOUSA & GONÇALVES (1986). Com relação à secagem de pólen de *Eucalyptus*, quatro espécies foram contempladas nos estudos realizados por SOUSA (1988). Resultados sobre armazenamento e viabilidade de pólen de diversas espécies deste gênero encontram-se relatados nos trabalhos de GABRIELLI et al. (1965), BORGES et al. (1973), SOUSA (1982,1982a, 1983,1983a e 1988) e CANGIANI (1988). O aperfeiçoamento constante de técnicas envolvendo todos esses processos é de fundamental importância para o adequado armazenamento do pólen.

Os estudos sobre o emprego de solventes orgânicos ganharam um maior impulso recentemente, e continuam sendo atrativos para o armazenamento de pólen de diversas espécies agrícolas, em função dos resultados positivos encontrados. Vários tipos de solventes têm sido empregados não só para a embebição como para o armazenamento do pólen de diferentes espécies. Dentre eles, podem ser citados:

acetonitrila, acetato de n-amil, acetato etílico, acetato metílico, álcool n-amílico, álcool benzílico, álcool n-butílico, álcool isobutílico, álcool etílico, álcool isopropílico, paraldeído, benzina de petróleo, tetracloreto de carbono, clorofórmio, dioxano, 1,1,1, tricloroetano, sym-dicloroetano, éter isoamílico, n-heptano, diclorometano, u-pentano, iso-pentano e pitidina. Os solventes mais freqüentemente utilizados, no entanto, são aqueles encontrados na Tabela 1.

TABELA 1. Solventes orgânicos mais freqüentemente empregados no manuseio do pólen de diferentes espécies.

Solvente	Espécie	Referência
acetona	<i>Camellia japonica</i>	IWANAMI (1972)
	<i>Crotalaria retusa</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Lathyrus sativus</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
		JAIN & SHIVANNA (1988)
	<i>Pisum sativum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Vicia faba</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Iris ensata</i>	YABUYA (1983)
	<i>Lilium auratum</i>	IWANAMY (1984)
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	SOUSA & GONÇALVES (1986)
álcool amílico	<i>Camellia japonica</i>	IWANAMI (1972)
	<i>Crotalaria retusa</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Lathyrus sativus</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Pisum sativum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Vitis vinifera</i>	AGARWAL (1983)
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Vicia faba</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
benzeno	<i>Camellia japonica</i>	IWANAMI (1972)
	<i>Iris ensata</i>	YABUYA (1983)
	<i>Vitis vinifera</i>	AGARWAL (1983)
ciclohexano	<i>Crotalaria retusa</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Lathyrus sativus</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Pisum sativum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Vicia faba</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
etanol	<i>Lilium auratum</i>	IWANAMY (1984)
éter etílico	<i>Iris ensata</i>	YABUYA (1983)
	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	SOUSA & GONÇALVES (1986)
éter dietílico	<i>Camellia japonica</i>	IWANAMI (1972)
	<i>Chrysanthemum pacificum</i>	IWANAMI (1975)
	<i>Lilium longiflorum</i>	IWANAMI (1975)
	<i>Crotalaria retusa</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Lathyrus sativus</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Pisum sativum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Vicia faba</i>	MISHRA & SHIVANNA (1982)
	<i>Lilium auratum</i>	IWANAMI (1984)
	<i>Crotalaria retusa</i>	JAIN & SHIVANNA (1988)
éter de petróleo	<i>Iris ensata</i>	YABUYA (1983)
	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	SOUSA & GONÇALVES (1986)
hexano	<i>Iris ensata</i>	YABUYA (1983)
	<i>Crotalaria retusa</i>	JAIN & SHIVANNA (1988)
metanol	<i>Lilium auratum</i>	IWANAMI (1984)
	<i>Crotalaria retusa</i>	JAIN & SHIVANNA (1988)
xileno	<i>Lilium auratum</i>	IWANAMI (1984)

A escolha do solvente adequado para um pólen específico constitui-se em um trabalho árduo, devendo ser feita mediante ensaio com vários solventes, pois as reações que ocorrem também são específicas. Todavia, JAIN & SHIVANNA (1988) constataram que solventes, tais como o hexano, ciclohexano e éter dietílico propiciam uma boa germinação do pólen e a manutenção da integridade da membrana celular. Por sua vez, outros solventes tais como metanol e isopropanol afetaram a viabilidade do pólen em decorrência da lixiviação de fosfolipídeos, açúcares e aminoácidos, de acordo com esses mesmos autores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Na realização dos testes de imersão do pólen, considerou-se a reação específica pólen x solvente orgânico como fator determinante da presente investigação.

Os grãos de pólen utilizados originaram-se das seguintes espécies e locais:

- a) *Eucalyptus dunnii*, Estação Experimental do CNPF-EMBRAPA (banco clonal), em Colombo-PR;
- b) *Eucalyptus robusta*, Estação Experimental do CNPF-EMBRAPA (arboreto), em Colombo-PR;
- c) *Eucalyptus grandis*, Estação Experimental de Anhembi-SP do LCF/ESALQ-USP;
- d) *Eucalyptus urophylla*, Estação Experimental de Anhembi-SP do LCF/ESALQ-USP.

Foram utilizados os solventes orgânicos: benzeno, tolueno, xileno e metanol (PA) para essas espécies de *Eucalyptus* testadas. Os ramos com botões florais com o opérculo interno próximo à abscisão foram conduzidos à casa da vegetação, para a completa antese. As estruturas estaminais foram separadas das estruturas florais e conservadas, em "freezer" (-16°C), até o início do ensaio com os diversos solventes. Neste caso, o período de armazenamento não é um fator preponderante, uma vez que a qualidade do pólen é determinada diretamente através da germinação "in vitro", por ocasião do teste. A extração foi feita através da adição dos solventes às estruturas estaminais, seguida da agitação em tubos de ensaio, conforme descrito por SOUSA & GONÇALVES (1986). Após a filtração em peneira, o pólen imerso no solvente permaneceu em repouso, por aproximadamente três horas, até a total evaporação.

A viabilidade foi avaliada através da germinação "in vitro". Para tanto, utilizou-se um meio de cultura com 30% de sacarose e 0,8% de ágar. Durante o período de 24 horas, o pólen permaneceu em uma câmara de germinação com 99% de umidade relativa e 25°C de temperatura. Na avaliação, utilizaram-se amostras contendo um total de 370 grãos de pólen, por repetição. Segundo Stanley & Linskens, citado por GODDARD & MATTHEWS (1981), 369 grãos por repetição têm um tamanho adequado como amostra, para a germinação encontrada, ao nível de 5% de probabilidade. Para cada tratamento, utilizaram-se quatro repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

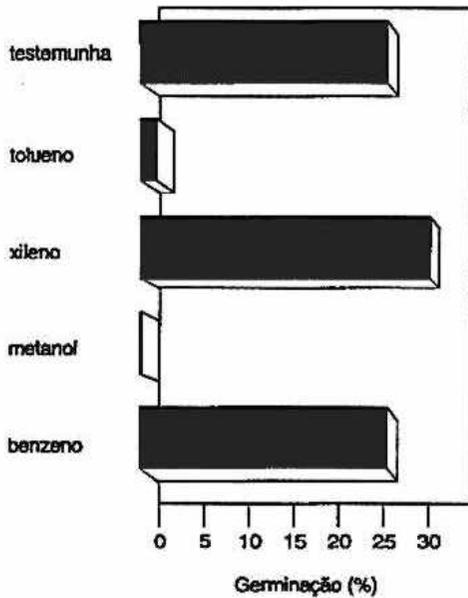
A análise estatística dos dados pelo teste do qui-quadrado mostrou resultados significativos ao nível de 1% de probabilidade, para todas as espécies estudadas. Para valores de $GL = 4$, os valores obtidos para as espécies foram: *Eucalyptus dunnii* = 1257,80 **, *Eucalyptus robusta* = 88,56 **, *Eucalyptus urophylla* = 511,49 ** e *Eucalyptus grandis* = 1327,45 .

O efeito dos solventes sobre a germinação do pólen das diferentes espécies foi diferenciado (Figura 1). O benzeno, por exemplo, reduziu muito pouco a viabilidade do pólen de *E. dunnii* e *E. urophylla*, mas causou uma drástica redução na viabilidade de pólen de *E. grandis*. O resultado positivo para as duas primeiras espécies contraria aquele encontrado por IWANAMI (1984), onde o benzeno afetou a viabilidade do pólen de *Iris ensata*, reforçando o fato da reação solvente orgânico/pólen ser específica. Já o xileno mostrou bons resultados para o pólen de *E. dunnii*, comparativamente aos resultados negativos encontrados para o pólen de *E. urophylla* e *E. grandis*, confirmando os resultados de IWANAMI (1984) com *Lilium auratum*, apesar das espécies serem distintas. O metanol prejudicou a viabilidade do pólen de todas as espécies estudadas, resultando em valores praticamente nulos. Esse resultado também foi constatado por JAIN & SHIVANNA (1988), para o pólen de *Crotalaria retusa*. O tolueno, por sua vez, provocou queda da viabilidade do pólen de *E. dunnii*, enquanto propiciou um resultado altamente satisfatório para *E. urophylla* e *E. grandis*. O pólen de *E. robusta*, com baixa porcentagem de germinação inicial, não permitiu discussões sobre o comportamento dos solventes empregados. Outros solventes não foram incluídos para teste neste trabalho, em função de resultados altamente negativos obtidos em trabalhos anteriores. Neste grupo, incluem-se os casos da acetona, éter etílico e éter de petróleo. A acetona foi testada no pólen de *E. urophylla* por SOUSA & GONÇALVES (1986) e por MISHRA SHIVANNA (1982) para pólen de outras espécies. Por outro lado, bons resultados para o emprego de acetona em *Iris ensata* foram encontrados por YABUYA (1983). O éter etílico e éter de petróleo foram utilizados nos trabalhos de SOUSA & GONÇALVES (1983) para o *E. camaldulensis* e de YABUYA (1983), para *Iris ensata*, com resultados negativos.

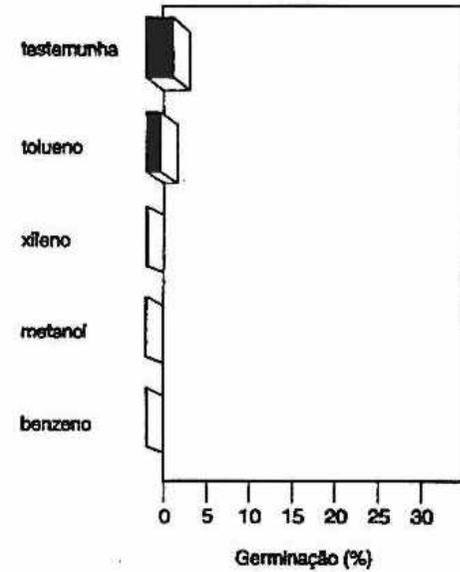
A obtenção de resultados discrepantes em relação à potencialidade de diferentes solventes mostra, uma vez mais, a necessidade de se realizar ensaios específicos envolvendo diversas espécies e distintos solventes.

** Significativo ao nível $\alpha = 0,01$

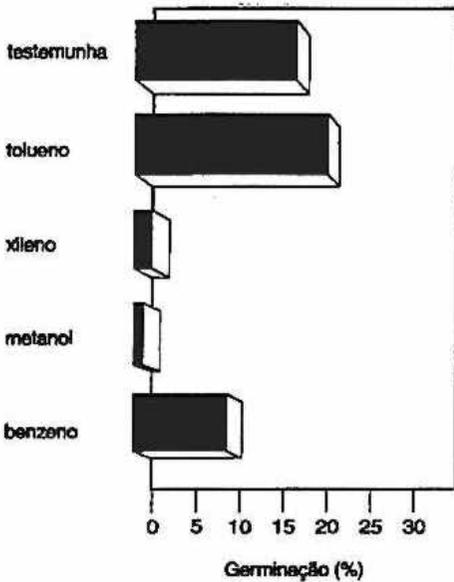
Eucalyptus dunni



Eucalyptus robusta



Eucalyptus urophylla



Eucalyptus grandis

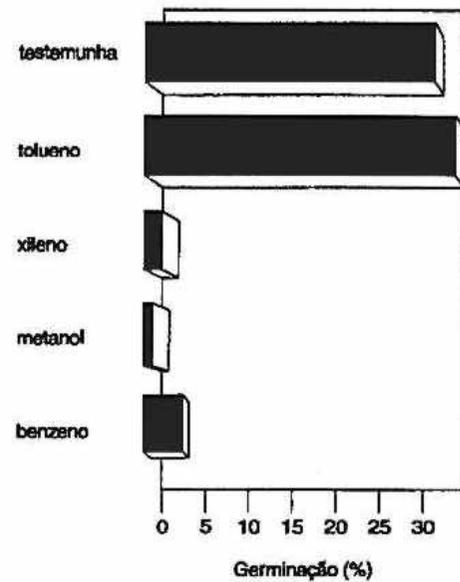


FIGURA 1. Germinação do pólen (%) para diferentes espécies de *Eucalyptus* em função dos tratamentos com solventes orgânicos.

5. CONCLUSÕES

O xileno, tolueno e benzeno não alteram significativamente a viabilidade do pólen das espécies de *Eucalyptus* estudadas e, portanto, merecem atenção especial para estudos de extração e armazenamento de pólen. Em vista dos resultados promissores obtidos neste trabalho, constituem-se, assim, em produtos potenciais para o armazenamento a longo prazo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, P. K. Effect of storage in organic solvent on the germination of grapevine pollen. **Journal of Horticultural Science**, London, v.58, n.3, p.389-392, 1983.
- BODEN, R.W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. **Australian Forestry**, Canberra, v.12, n.2, p.73-81, 1958.
- BORGES, C.P., SILVA, A.A.; FERREIRA, M. Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, Piracicaba, n.6, p.3-32, 1973.
- CANGIANI, S.M.P. Extração e armazenamento de pólen de *Eucalyptus camaldulensis*. **Circular Técnica IPEF**. Piracicaba, n.162, p.1-5, 1988.
- GABRIELLI, A.C.; CUNHA, R.A.; MAULE, V. Conservação do pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fins de cruzamento. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.40, n.2, p.51-57, 1965.
- GODDARD, R.E.; MATTHEWS, F.R. Pollen testing. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Forest Service. **Pollen management handbook**. Washington, 1981. p.40-43.
- IWANANI, Y. Retaining the viability of *Camellia japonica* pollen in various organic solvents. **Plant and Cell Physiology**. Tokyo. v.13, p.1139-1141, 1972.
- IWANAMI, Y. Absolute dormancy of pollen induced by soaking in organic solvents. **Protoplasma**, New York, n.84, p.1981-1984, 1975.
- IWANAMI, Y. The viability of pollen grains of a lily (*Lilium auratum*) and the eggs of the brine-shrimp (*Artemia salina*) soaked in organic solvents for 10 years. **Experientia**. Basel, v.40, p.568-569, 1984.
- JAIN, A.; SHIVANNA, K.R. Storage pollen grains in organic solvents: Effect of organic solvents on leaching of phospholipids and its relation-ship to pollen viability. **Annals of Botany**. London, v.61, n.3, p.325-330, 1988.
- MISHRA, R.; SHIVANNA, K.R. Efficacy of organic solvents for storing pollen grains of some leguminous taxa. **Euphytica**, Wageningen, v.31, p.991-995, 1982.
- PRYOR, L.D. An F1 hybrid between *Eucalyptus cinerea* F. Muell and *Eucalyptus robusta* Smith. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, n.5/6, 1954.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen biology biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307p.

- SOUSA, V.A. Relatório do Convênio ESALQ/IPEF e Champion Papel e Celulose S.A., apresentado à área de melhoramento florestal. Piracicaba: ESALQ/USP. Departamento de Engenharia Florestal. 1982, 50p.
- SOUSA, V.A. Relatório do Convênio ESALQ/IPEF e Champion Papel e Celulose S.A., apresentado à área de melhoramento florestal. Piracicaba: ESALQ/USP. Departamento de Ciências Florestais. 1982a. 36p.
- SOUSA, V.A. Relatório do Convênio ESALQ/IPEF e Champion Papel e Celulose S.A., apresentado à área de melhoramento florestal. Piracicaba: ESALQ/USP. Departamento de Ciências Florestais. 1983. 23p.
- SOUSA, V.A. Relatório do Convênio ESALQ/IPEF e Champion Papel e Celulose S.A., apresentado à área de melhoramento florestal. Piracicaba: ESALQ/USP. Departamento de Ciências Florestais. 1983a. 39p.
- SOUSA, V.A.; GONÇALVES, A.N. Efeitos de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 5.; 1986, Olinda. **Anais**. São Paulo: SBS, 1986. 76p.
- SOUSA, V.A. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus***. Piracicaba: ESALQ/USP 1988. 155p. Tese-Mestrado.
- YABUYA, T. Pollen storage of *Iris ensata* Thunb. in organics solvents and dry under freezing. **Japanese Journal of Breeding**, Tpkyo, v.33, p.269-274, 1983.