

## INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DO PÓLEN DE TRÊS ESPÉCIES DE *Eucalyptus*

Valderês Aparecida de Sousa-Lang<sup>\*</sup>  
José Elidney Pinto Junior

### RESUMO

Dada a importância da manutenção de polens viáveis a serem usados nos programas de melhoramento e conservação genética, diferentes meios de cultura foram testados, para identificar aquele que possibilite avaliar, com precisão, a viabilidade do pólen armazenado. O pólen foi obtido de árvores amostradas em pomares de semente e bancos clonais de três espécies de *Eucalyptus*, estabelecidos em dois municípios do Estado de São Paulo. Para o teste de germinação *in vitro*, foram utilizados: 1) meio de Brewbaker & Kwack; 2) meio de Brewbaker & Kwack ajustado para sacarose a 30% e 3) meio contendo ágar e sacarose. As características estudadas foram a germinação *in vitro* e o comprimento do tubo polínico. A avaliação foi feita 24 horas após a incubação dos polens, contando-se 200 grãos e medindo-se 20 tubos polínicos, em cada uma das 4 repetições. A análise de variância mostrou que o meio de Brewbaker & Kwack ajustado proporcionou melhor germinação e crescimento do tubo polínico, para todas as espécies. Foi detectado valor significativo de F para a interação meio de cultura x espécie, indicando que *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. robusta* respondem de forma diferenciada. Evidenciou-se, assim, o potencial do meio de Brewbaker & Kwack ajustado para a avaliação da viabilidade do pólen dessas espécies, mostrando ainda a conveniência de testá-lo em outras espécies do gênero *Eucalyptus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** germinação *in vitro*, tubo polínico.

## INFLUENCE OF MEDIA ON GERMINATION OF POLLEN IN THREE *Eucalyptus* SPECIES

### ABSTRACT

The media Brewbaker & Kwack, Brewbaker-Kwack adjusted to a 30% sucrose and an agar and sucrose media were tested to assess their value for germination of pollen of *Eucalyptus urophylla*, *E. grandis* and *E. robusta*. Pollen was collected from seed orchards and clonal banks in two municipalities of the State of São Paulo, Brazil. A random block design with four replications was used to evaluate pollen germination and tube growth in the media. Evaluation was done 24 hours after introduction of pollen into the media by counting 200 grains and measuring 20 tubes in each replication. Both germination and tube growth levels were higher in the Brewbaker-Kwack medium adjusted to a 30% sucrose level than without adjustment.

---

\* Eng. Florestal, Mestre, CREA nº 124217/D, Pesquisadora da *Embrapa* - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas.

\*\* Eng. Florestal, Mestre, CREA nº 70858/D, Pesquisador da *Embrapa* - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas.

As for tube growth, F value of media x species interaction showed that the three species reacted differently. When comparing the original in Brewbaker-Kwack media and the adjusted one, it was verified that the 30% concentration of sucrose was the factor responsible for the best results in germination and tube growth. Therefore, it was shown that the Brewbaker-Kwack media adjusted to 30% sucrose was the best media to the evaluation of pollen viability in these species and that it is worth trying the procedure with other species of *Eucalyptus*.

**KEY WORDS:** germination *in vitro*, tube growth.

## 1. INTRODUÇÃO

O meio de Brewbaker & Kwack (BREWBAKER & KWACK, 1963) foi desenvolvido para testar pólen de espécies com dificuldades de germinação *in vitro*, nos meios convencionais. A diferença básica deste para os meios convencionais está na adição de íons inorgânicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , e  $\text{H}^+$ ), além do boro, que normalmente estimulam a germinação e o crescimento do tubo polínico. BHOJWANI & BATHNAGAR (1974) e STANLEY & LINSKENS (1974) consideram esses como elementos indispensáveis à germinação do pólen. O meio de Brewbaker & Kwack tem sido empregado, com sucesso, para espécies agrícolas, ornamentais e florestais, tais como *Prunus serotina* (FARMER & HALL, 1975), *Discorea rotundata* (AKORODA, 1984), espécies da família *Bignoniaceae* (RATHORE & CHAUHAN, 1985), *Narcissus* sp. (BOWES, 1990), *Zea mays*, *Pinus* sp. e *Picea* sp. (CONNOR & TOWILL, 1993).

A manutenção da viabilidade do pólen, de fundamental importância para a condução de programas de melhoramento e conservação genética, está sujeita, além dos fatores intrínsecos à espécie, às condições de armazenamento. Para se obter estimativas confiáveis de viabilidade do pólen armazenado, é necessário dispor de um meio de cultura que possibilite a expressão do seu potencial fisiológico para a formação do tubo polínico. Um meio de cultura ideal para pólen de eucalipto tem sido buscado desde o final década de 50.

A maioria dos trabalhos com eucalipto vem apontando, por sua vez, a sacarose como ingrediente estimulador necessário à germinação do pólen (BODEN, 1958; GABRIELLI et al., 1965; BORGES et al., 1973; GRIFFIN et al., 1982; SOUSA, 1988, CANGIANI, 1988 e MENCK et al., 1990). Mesmo em meios com concentrações adequadas de açúcar e/ou complementados com alguns elementos estimulantes, nem sempre é possível obter a maximização da germinação do pólen maduro de eucalipto. Desta forma, o meio de Brewbaker & Kwack, sendo um meio mais completo em termos de composição, mostra-se potencial para espécies de eucalipto. Esse trabalho avaliou o efeito do meio de Brewbaker & Kwack, original e ajustado, e outro contendo ágar e sacarose, sobre a germinação e o crescimento do tubo polínico de três importantes espécies de *Eucalyptus* (*E. urophylla*, *E. grandis* e *E. robusta*), visando a maximização da germinação do pólen.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram tomadas 6 árvores para o fornecimento de pólen, para cada espécie, sendo *E. urophylla* ST Blake e *E. robusta* Sm., em Angatuba-SP e *E. grandis* Hill (ex Maiden), em Itatinga-SP (Tabela 1).

Após secagem a 30°C, o pólen permaneceu armazenado por 20 a 30 dias, em congelador (temperatura de -18°C). Para a execução dos testes, o pólen foi

reidratado por 24 horas, em câmara úmida.

**TABELA 1 . Procedência do pólen das espécies estudadas.**

Espécie	Procedência	Local de coleta
<i>E. grandis</i>	Itatinga- São Paulo	PSC
<i>E. urophylla</i>	Angatuba- São Paulo	PSC
<i>E. robusta</i>	Angatuba- São Paulo	BC

PSC = Pomar de Semente Clonal

BC = Banco clonal

Foram empregados três meios de cultura (Tabela 2).

**TABELA 2. Composição dos meios de cultura testados na germinação do pólen de *Eucalyptus* spp.**

Composição	Ágar	Brewbaker & Kwack	Brewbaker & Kwack Ajustado
Ágar(0,8%)	+	+	+
Sacarose (30%)	+	-	+
Sacarose(10%)	-	+	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O(0,03%)	-	+	+
KNO <sub>3</sub> (0,01%)	-	+	+
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O (0,02%)	-	+	+
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,01%)	-	+	+

Como testemunha, utilizou-se um meio contendo ágar (0,8%) e sacarose (30%).

Os meios de Brewbaker & Kwack, tanto o original como o ajustado, tiveram o pH ajustado para 7,3; seguindo indicação de BREWBACKER & KWACK (1963).

O meio contendo apenas ágar e sacarose foi incluído para comparação, tendo em vista os resultados satisfatórios observados na germinação *in vitro* do pólen de eucalipto (GRIFFIN et al., 1982; SOUSA, 1988 e MENCK et al., 1990).

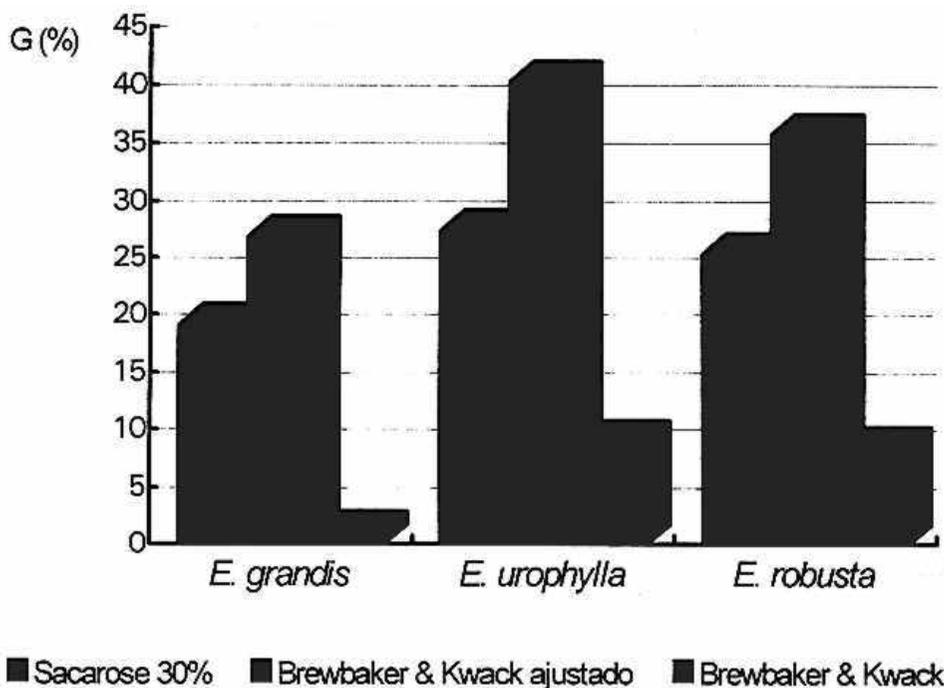
O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 4 repetições.

A germinação foi conduzida à temperatura de 25°C ± 0,5°C e 99% de umidade relativa do ar. Nas avaliações, realizadas 24 horas após a incubação, foram contados 200 grãos de pólen e medidos, em câmara clara, 20 tubos polínicos de cada repetição.

O grão foi considerado germinado quando o seu tubo polínico atingiu comprimento maior que o seu maior diâmetro, conforme a metodologia sugerida por Cook & Stanley (1960), citados por SPRAGUE (1977).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação de pólen para as diferentes espécies e meios de cultura é apresentada na Figura 1.



**FIGURA 1. Germinação do pólen (G%) em diferentes meios de cultura.**

Houve diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre os meios de cultura e entre as espécies estudadas (Tabela 3), quanto à germinação de pólen.

**TABELA 3. Análise de variância da germinação de pólen de eucalipto para os diferentes meios de cultura.**

Causa de variação	G.L.	Q.M.	Valor de F	Probabilidade > F
Meio	2	2.423,5278	176,4497	0,00001
Espécie	2	318,5278	23,1910	0,00002
Meio x Espécie	4	10,0486	0,7316	0,58146
Bloco	3	18,0995	1,3178	0,29127
Resíduo	24	13,7350		
Total	35			

O coeficiente de variação da porcentagem de germinação ( $CV = 17,23\%$ ) indicou uma boa eficiência experimental, considerando que o tipo de material trabalhado está sempre sujeito a uma maior variação. Para todas as espécies, a germinação de pólen foi maior no meio de Brewbaker & Kwack ajustado. Isto se deve à maior concentração de sacarose (30%) no meio ajustado, em relação ao meio original ou, ainda, possivelmente decorrente de sua interação com os nutrientes empregados. O meio contendo apenas ágar e sacarose, por sua vez, também apresentou germinação maior que o original de Brewbaker & Kwack (Tabela 4 e Figura 1). Embora o meio original de Brewbaker & Kwack contenha componentes

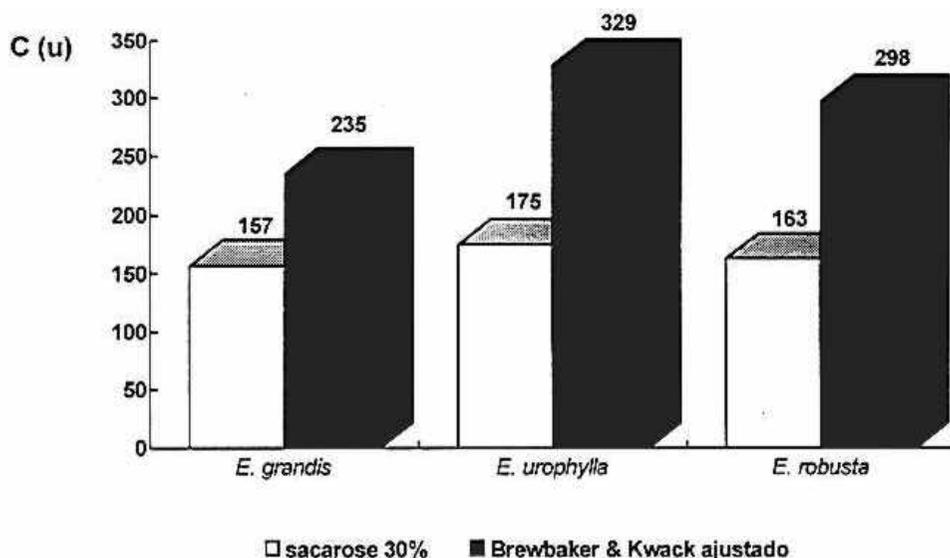
essenciais à germinação e crescimento do tubo polínico, o que pode explicar a superioridade da germinação no meio contendo apenas ágar e sacarose pode ser a sua maior concentração de sacarose (30%) ou o possível efeito de sua interação com os nutrientes presentes.

**TABELA 4. Germinação de pólen de 3 espécies de eucaliptos nos diferentes meios de cultura.**

Meio de Cultura	Germinação(%)		
	<i>E. grandis</i>	<i>E. urophylla</i>	<i>E. robusta</i>
Brewbaker & Kwack ajustado	26,88 a	40,25 a	35,75 a
Ágar e sacarose	19,13 b	27,38 b	25,63 b
Brewbaker & Kwack original	1,13 c	9,00 c	8,50 c

Obs.: médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si, ao nível de  $P \leq 0,01$ .

Considerando o crescimento do tubo polínico, a análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre os meios de cultura e espécies (Tabela 5 e Figura 2). Devido à baixa germinação do pólen no meio original de Brewbaker & Kwack, decidiu-se não efetuar a medição dos tubos polínicos.



**FIGURA 2. Comprimento do tubo polínico (C) em meios de cultura.**

A menor concentração de açúcar (10%) provavelmente foi o fator responsável pela baixa germinação, uma vez que o meio modificado apresentava a mesma composição, mas com maior concentração de açúcar (30%).

**TABELA 5. Análise de variância para comprimento do tubo polínico de espécies de eucalipto, em diferentes meios de cultura.**

Causa de Variação	G.L	Q.M.	Valor de F	Probabilidade > F
Meio	1	89.548.1667	163,4389	0,00001
Espécie	2	6.466.7917	11,8029	0,00111
Meio x Espécie	2	352.6667	5,6699	0,01448
Bloco	3	3.106.5417	0,6435	0,60181
Resíduo	15	547.9000		
Total	23			

O coeficiente de variação do comprimento do tubo polínico (CV = 10,37%) indicou uma boa eficiência experimental, considerando que o tipo de material trabalhado está sempre sujeito a uma maior variação.

Pela análise de variância do comprimento do tubo polínico, observou-se diferenças estatisticamente significativas entre meios de cultura e espécie ( $p \leq 0,01$ ), e para a interação meio de cultura x espécie ( $p \leq 0,05$ ). Houve um maior crescimento do tubo polínico no meio de Brewbaker & Kwack ajustado (Tabela 5), em relação ao meio contendo apenas ágar e sacarose, para todas as espécies (Figura 2). Esse maior desenvolvimento se deveu à presença de nutrientes que estimularam o crescimento do tubo polínico. Em relação ao meio contendo ágar e sacarose, não houve diferença de crescimento do tubo polínico, entre as espécies. No meio de Brewbaker & Kwack ajustado, o crescimento do tubo polínico de *E. urophylla* foi maior que o de *E. grandis*, indicando tratar-se de variação específica.

O meio de Brewbaker & Kwack ajustado proporcionou maior crescimento do tubo polínico, para todas as espécies (Tabela 6). Ao considerar o fator espécie em diferentes meios, entretanto, o tubo polínico de *E. urophylla*, no meio de Brewbaker & Kwack ajustado, desenvolveu-se mais que o de *E. grandis* e *E. robusta*.

**TABELA 6. Médias de comprimento de tubo polínico ( $\mu$ ) de eucalipto e resultados do teste Tukey, para os diferentes meios de cultura e espécies.**

Espécie	Comprimento de tubo polínico ( $\mu$ )	
	Meios de Cultura	
	Brewbaker & Kwack Ajustado	Ágar e Sacarose
<i>E. urophylla</i>	328,75 a	175,00 a
<i>E. robusta</i>	297,50 ab	162,75 a
<i>E. grandis</i>	234,50 b	156,50 a

Obs: médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si, ao nível de  $p \leq 0,01$

#### 4. CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* do pólen de *E. urophylla*, *E. grandis* e *E. robusta* ocorreu em todos os meios de cultura testados. A germinação e o desenvolvimento do tubo polínico dessas espécies foram maiores no meio de Brewbaker & Kwack ajustado em relação ao meio original. A concentração de sacarose pode ter desempenhado um papel estimulador da germinação e do crescimento do tubo polínico, a julgar pela comparação entre os meios original e ajustado. O meio de Brewbaker & Kwack ajustado mostra-se potencial para a avaliação da viabilidade do pólen dessas espécies.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Companhia Suzano de Papel e Celulose S.A., por intermédio da pesquisadora Ana Luisa de Moraes Menck e do pesquisador Shinitiro Oda, pelo fornecimento do pólen utilizado. Agradecem, ainda, à técnica da *Embrapa Florestas* - Sra. Elci Batistella Favretto, pela participação na obtenção dos dados de germinação *in vitro*, e ao pesquisador Erich Gomes Schaitza, pelas sugestões apresentadas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKORODA, M.O. Estimating pollen viability for controlled hybridization in white yam. **Crop Research**, Edinburg, v.24, p.11-22, 1984.
- BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The embryology of angiosperms**. New Delhi: Sylark Painters, 1974. 264 p.
- BODEN, R.W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. **Australian Forestry**, Canberra, v.12, n.2, p.73-81, 1958.
- BOWES, S.A. Long term storage of narcissus anthers and pollen in liquid nitrogen. **Euphytica**, Wageningen, v.48, n.3, p.275-278, 1990.
- 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.
- 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.
- CANGIANI, S.M.P. **Extração e armazenamento de pólen de *Eucalyptus camaldulensis***. Piracicaba: IPEF, 1988. 5p. (IPEF. **Circular Técnica**, 162).
- CONNOR, K.F.; TOWILL, L.E. Pollen handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, Wageningen, v.68, p.77-84, 1993.
- FARMER JUNIOR., R.E.; HALL, G.C. In vitro testing and long-term storage of black cherry pollen. In: **NORTHEASTERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE**, 22., 1974, Syracuse. **Proceedings**. Upper Darby: USDA Forest Service, 1975. p.19-22.

- GABRIELLI, A.C.; CUNHA, R.A.; MAULE, V. Conservação de pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fins de cruzamento. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.40, n.2, p.51-7, 1965.
- GRIFFIN, A.R.; CHING, K.K. JOHNSON, K.W.; HAND, F.F.; BURGUESS, I.P. Processing *Eucalyptus* pollen for use in controlled pollination. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.31, n.5/6, p.198-203, 1982.
- MENCK, A.L.M.; ODA, S.; MARCHZ, E.L.; KOVALSKI, M. E. Influencia do sistema de coleta de botões florais na viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, Piracicaba, n.43/44, p.20-23, 1990.
- RATHORE, V.; CHAUHAN, S.V.S. In vitro pollen germination in some Bignoniaceae. **Indian Journal of Forestry**, Dehra Dun, v.8, n.2, p.99-102, 1985.
- SOUSA, V.A.de. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp.** Piracicaba: ESALQ, 1988. 155p. Tese de mestrado.
- SPRAGUE, J. R. Seed and pollen handling. In: TREE IMPROVEMENT SHORT COURSE, 1977, Raleigh. Raleigh: Carolina State University, 1977. p.90-102.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen biology biochemistry management.** Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.