

No Quadro III observamos que a sobrevivência é superior a 80%, o Volume Sólido Com Casca é superior a 94 m<sup>3</sup>/ha e o IMA é superior a 19 m<sup>3</sup>/ha/ano em todas as procedências, exceto em Timor, mostrando claramente que suas procedências não estão adaptadas para a região, o que está em concordância com Ferreira (1990), citado por SANTOS et alii (1990), MOURA (1981), BERTOLOTI & BRASIL (1980) e SCANAVACA JUNIOR et alii (1990).

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados concluiu-se que:

- a) As procedências de Timor não estão adaptadas para região;
- b) As procedências de Flores estão bem adaptadas e devem constituir o material básico para os programas de melhoramento da empresa;
- c) As procedências das Outras Ilhas podem ser incluídas com as procedências de Flores. Considerando-se, além da produtividade a forma do fuste.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTOLOTI, G. & BRASIL, W. M. Ensaio de procedências de *Eucalyptus urophylla* S. T. BLAKE. *Boletim Informativo IPEF*, Piracicaba, vol.8, Nº.7, P.31-3. Dez. 1980.
- MARTIN, B. & COSSALTER, C. Les *Eucalyptus* des +les de la Sonde. *Bois et forêt des tropiques*, Nogent-sur-Marne, (163):3-25, 1976.
- MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y. & FERREIRA, M. Variação genética e interação progênie x locais em *Eucalyptus urophylla*. *IPEF*, Piracicaba (39): 53-63, 1988.\*
- SANTOS, P. E. T. dos; MORI, E. S. & MORAIS, M. L. T. de Potencial para programas de melhoramento, estimativas de parâmetros genéticos e interação progênie x locais em Populações de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. *IPEF*, Piracicaba, (43/44):11-9, 1990.
- SCANAVACA JUNIOR, L.; FERREIRA, M. & SANTOS, P. E. T. dos Relatório de Estágio na FRDSA - Sistema Norte - MA e PA. Piracicaba, 1990. 61p.

## DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN, EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Valderês Aparecida de Sousa

José Elidney Pinto Junior

EMBRAPA/CNPFFlorestas - Colombo-PR

## RESUMO

Os principais parâmetros utilizados para a avaliação "in vitro" de lotes de pólen armazenados são a germinação e o crescimento do tubo polínico. As pesquisas nesta área têm-se concentrado na obtenção de um meio de cultura ideal que se aproxime das condições "in natura" da germinação do pólen. Apesar de diversos meios serem considerados como ideais para a avaliação da viabilidade e vigor do pólen, as possibilidades de variações na sua composição ainda não foram adequadamente exploradas. O objetivo deste trabalho foi testar três meios de cultura para o desenvolvimento do tubo polínico e germinação do pólen de *Eucalyptus dunnii*, procedente de Colombo-PR (ex-Acacia Creek-NSW/Austrália). Para a avaliação da germinação e crescimento do tubo polínico, foram empregados os meios: convencional para *Eucalyptus*, Brewbaker & Kwack mais ágar (ambos já bem difundidos), e de Brewbaker & Kwack modificado, com a contagem de 360 grãos de pólen por repetição e medição do tubo polínico de 10% do total de grãos de pólen avaliados. Os resultados obtidos para a germinação do pólen especificamente para este material mostraram maior valor para o meio convencional (sem nutrientes), enquanto o crescimento do tubo polínico foi aproximadamente cinco vezes maior no meio Brewbaker & Kwack modificado comparativamente aos demais meios testados. Aparentemente, houve interação entre a concentração de sacarose e os nutrientes contidos nos meios de cultura, indicando a necessidade de rever a composição dos meios ditos "ideais" para a finalidade proposta. Idealmente, este meio deverá congrega máximos valores de germinação do pólen e de crescimento do tubo polínico.

Palavras-chaves: pólen; germinação "in vitro" e crescimento tubo polínico; meios de cultura; *Eucalyptus dunnii*.

## ABSTRACT

The main aspects considered in the "in vitro" evaluation of pollen storage conditions are pollen germination and tube growth. Research in this area aims to obtain an ideal culture media that closely simulates pollen tube growth in nature. Several media have been proposed in the literature. However, modifications in the composition of these media have not been adequately exploited yet. We tested three culture media on pollen of *Eucalyptus dunnii* introduced from Acacia Creek, NSW, Australia and planted in Colombo, PR, Brazil. We examined germination and growth of pollen tubes "in vitro" using the following media: conventional medium for *Eucalyptus*, BREWBAKER and KWACK medium plus agar and BREWBAKER and KWACK medium with modifications in nutrient composition. In each experiment, 360 pollen grains were scored for germination. Pollen tube growth was measured in 10% of the total number of germinated grains. The conventional medium (without nutrients) proved to be superior for pollen germination in this material. However, pollen tube growth was five times higher in the modified medium of BREWBAKER and KWACK as compared to the other media. Results suggest an interaction between sucrose concentration and the nutrients present in the culture media. The composition of the so called "ideal" culture media should

be adjusted for each material, because an ideal evaluation of viability should combine highest values of both germination and pollen tube growth.

Key words: pollen; "in vitro" germination and pollen tube growth; culture media; *Eucalyptus dunnii*.

## INTRODUÇÃO

O armazenamento de pólen de *Eucalyptus* spp. tem mostrado atualmente maior potencial de emprego aos programas de melhoramento genético, especialmente para produção de híbridos interespecíficos e avaliação da constituição genética dos Pomares de Sementes, além de sua importância para a conservação genética. O controle da qualidade do pólen armazenado e utilizado nos programas de melhoramento deve ser feito periodicamente, através de testes confiáveis de viabilidade. Embora exista a possibilidade de aplicação de testes com corantes específicos, o teste de germinação "in vitro" ainda é o mais utilizado para o gênero

*Eucalyptus*. Os primeiros estudos sobre germinação "in vitro", segundo BODEN (1958), foram realizados por Pryor, em 1954, para *E. robusta* e *E. cinerea*. Em seguida, vários autores testaram a germinação "in vitro" do pólen de *Eucalyptus*, tais como BODEN (1958); GABRIELLI et al. (1965), BORGES et al. (1973); GRIFFIN et al. (1982); Brune (1978) citado por VAN WYK (1981); CAUVIN (1984); SOUSA (1988); MENCK et al. (1990). Esses autores empregaram, como meio de cultura, sacarose com concentração entre 20 e 40% e um agente solidificante (ágar ou gelatina) com concentração variando de 0,5 a 2,0%. Todavia, Brune (1978) citado por VAN WYK (1981) e SOUSA (1988) para *Eucalyptus* spp.; e DHAR (1983) e EENIK (1983) para outras espécies vegetais verificaram que uma melhor germinação do pólen pode ser obtida quando nutrientes são adicionados ao meio de cultura, no caso destes estarem ausentes ou em pequenas quantidades "in natura". Isto porque boro, cálcio e magnésio, dentre outros nutrientes, fazem parte da composição do tecido estilar ou do fluido estigmático, no qual o pólen germina naturalmente (STANLEY & LINSKENS, 1974).

Para diversas espécies de *Eucalyptus*, o exsudato estigmático contém quantidades variáveis de carboidratos, lipídeos e proteínas. Carboidratos, na forma de açúcares livres como a sacarose, têm sido detectados também em exsudatos estigmáticos de outros gêneros. Existe forte evidência que o exsudato do estigma e estilete propiciam um meio de cultura para a germinação e crescimento do tubo polínico (POTTS & MARSDEN-SMEDLEY, 1989). São os carboidratos, portanto, essenciais na composição do meio de cultura para a germinação "in vitro".

O crescimento do tubo polínico é, por sua vez, um parâmetro importante na avaliação do vigor do pólen. De acordo com os resultados encontrados por LUZA & POLITO (1985), a perda da viabilidade do pólen está associada ao decréscimo de seu vigor, indicado pelo menor crescimento do tubo polínico "in vitro". A importância desse parâmetro para a avaliação da qualidade do pólen de espécies agrícolas também é considerada nos trabalhos de ZIELNSKI & OLEZ (1963) e MALTI & SHIVANNA (1985), dentre outros.

Devido à existência de diferenças intra e interespecíficas quanto à germinação do pólen, com origem genética e/ou fisiológica, faz-se necessário desenvolver meios de cultura específicos que se aproximem das condições "in natura".

Face à baixa germinação do pólen de *E. dunnii* encontrada em testes preliminares realizados pelo CNPF-EMBRAPA, e em função dos resultados positivos obtidos para várias espécies de *Eucalyptus* com relação ao teor de sacarose e ágar, e de nutrientes para outras espécies vegetais, decidiu-se testar previamente os meios de cultura convencional, e os meios com suplementação de nutrientes neste trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

O pólen foi coletado de um Banco Clonal de *E. dunnii*, localizado no município de Colombo-PR, pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa de Florestas-EMBRAPA, cuja procedência é Otacilio Costa-SC e a origem é Acacia Creek-NSW/Austrália.

Os ramos contendo botões florais em avançado estágio de maturação foram mantidos em casa de vegetação até a antese. Nessa ocasião, as estruturas estaminais foram separadas e armazenadas em "freezer".

Um mês após seu armazenamento em "freezer", com temperatura de 18°C negativos, o pólen foi submetido ao teste de germinação "in vitro" e avaliação do crescimento do tubo polínico. Os tratamentos empregados foram aqueles indicados na tabela seguinte.

TABELA 1. Meios de cultura e respectivas concentrações dos componentes.

COMPONENTE	TRATAMENTOS		
	MEIO I (%)	MEIO II (%)	MEIO III (%)
Sacarose PA	30	10	30
Ágar	0,80	0,80	0,80
Ácido Bórico	-	0,01	0,01
Nitrato de Cálcio 4H <sub>2</sub> O	-	0,03	0,03
Sulfato de Magnésio 7H <sub>2</sub> O	-	0,02	0,02
Nitrato de Potássio	-	0,01	0,01

I = Meio Convencional referido por BODEN (1958) e GRIFFIN (1982).

II = Meio de Brewbaker & Kwack mais ágar referido por AKORODA (1984).

III = Meio de Brewbaker & Kwack modificado para sacarose e ágar.

Os meios II e III tiveram o pH ajustado para 7,3, usando-se ácido clorídrico (1N) e hidróxido de potássio (1N).

Todo meio de cultura foi avaliado considerando quatro repetições e a contagem de 360 grãos de pólen totais (germinados e não germinados) por repetição, da forma preconizada por STANLEY & LINSKENS (1974). A contagem dos grãos de pólen foi feita após 24 horas de incubação em

germinador (temperatura de 25°C e 99% de umidade relativa do ar).

Considerou-se grão germinado quando o crescimento do tubo polínico ultrapassou seu maior diâmetro, de acordo com metodologia de Cook & Stanley (1960), sugerida por SPRAGUE (1977). A medição dos tubos polínicos, correspondente a 10% do total de grãos por repetição, foi feita em Câmara Clara.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para a análise dos dados de germinação do pólen, devido a sua natureza binomial. Para os dados de crescimento do tubo polínico, empregou-se análise de variância, com transformação logarítmica (ln). Comparações entre médias foram feitas pelo Teste Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de germinação do pólen, em porcentagem, nos diferentes meios de cultura testados, são expressos pela Figura 1. Os resultados da análise pelo Qui-quadrado mostraram valores altamente significativos para meios de cultura ( $X^2 = 74,03^{***}$ ). O meio I (Convencional), ao contrário do esperado, apresentou germinação significati-

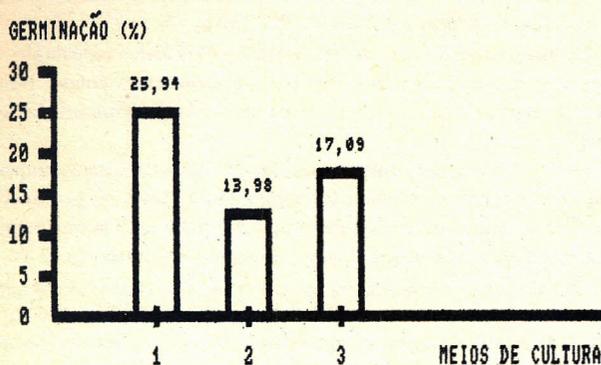


Figura 1 - Porcentagem de germinação de pólen de *E. dunnii*, nos diferentes meios de cultura.

vamente superior em relação aos meios II ( $X^2 = 65,49^{**}$ ) e III ( $X^2 = 33,81^{**}$ ) que continham nutrientes. Provavelmente, tal comportamento possa ser explicado pela presença dos nutrientes necessários à germinação "in vitro", no próprio grão de pólen. A adição de nutrientes ao meio de cultura, no caso em que o pólen já contenha naturalmente níveis adequados desses nutrientes, pode provocar, por outro lado, a inibição da germinação, da forma relatada por

DIAVANSHIR & FECHNER (1975) para boro, e por FILITI & MARCUCCI (1982) para cálcio. No caso dos meios de cultura que receberam nutrientes, a germinação do meio III foi 22,22% superior ao do meio II ( $X^2 = 5,45^*$ ). Essa superioridade deveu-se à maior concentração de sacarose no meio III e provavelmente devido à interação existente entre essa e os nutrientes contidos naquele meio. Na literatura, uma concentração ao redor de 30% para sacarose é indicada como ideal para a germinação do pólen de *Eucalyptus* spp. (GABRIELLI et al., 1965; VAN WYK, 1981; GRIFFIN et al., 1982; SOUSA, 1988; POTTS & MARSDEN-SMEDLEY, 1989; MENCK et al., 1990). A existência da interação sacarose x nutrientes, especialmente boro e cálcio, atuando na germinação do pólen de diversas espécies é reconhecida, mas não elucidada (KWACK, 1965; DHAR, 1983; LUZA & POLITO, 1985; FILITI & MARCUCCI, 1982; POTTS & MARSDEN-SMEDLEY, 1989).

Embora o boro possa também estimular o crescimento do tubo polínico (FILITI & MARCUCCI, 1982), sua presença tem sido frequentemente relacionada ao estímulo da germinação do pólen (DHAR, 1983; POTTS & MARSDEN-SMEDLEY, 1989). Este estímulo deve-se à atuação do boro na biossíntese de carboidratos (BHOJWANI & BATHNAGAR, 1974; STANLEY & LINSKENS, 1974).

A germinação do pólen observada neste trabalho, mesmo nos meios com nutrientes, encontra-se aquém dos valores esperados. A resposta diferencial para espécies de *Eucalyptus* em relação à germinação e crescimento do tubo polínico em um determinado meio tem sido verificada em diversos trabalhos (BODEN, 1958; GABRIELLI et al., 1965;

BORGES et al., 1973; SOUSA, 1988; POTTS & MARSDEN-SMEDLEY, 1989). Essas variações interespecíficas refletem principalmente as diferenças que ocorrem na fisiologia do pólen (POTTS & MARSDEN-SMEDLEY, 1989). SOUSA (s.d.) observou também di-

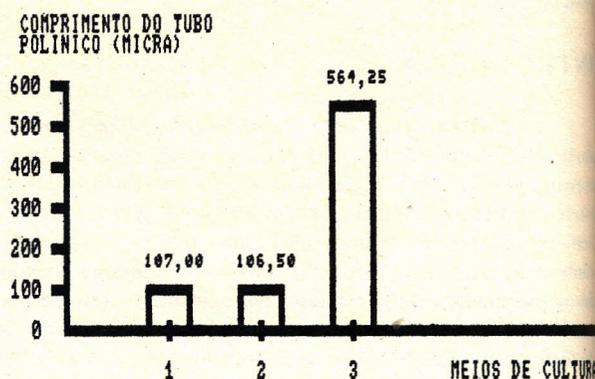


Figura 2 - Comprimento do tubo polínico de *E. dunnii*, nos diferentes meios de cultura.

ferenças entre espécies de *Eucalyptus* quanto à germinação do pólen, em meio de cultura contendo ágar e sacarose. Os valores de germinação do pólen encontrados por essa última autora permitiram reunir *E. tereticornis*, *E. camaldulensis* e *E. citriodora* em um grupo que mostrou valores variando de 70 a 100%; e *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. dunnii* em outro grupo mostrando valores máximos ao redor de 30%.

Os resultados de comprimento do tubo polínico são mostrados na Figura 2. A análise de variância dos dados transformados mostrou diferenças significativas para os meios de cultura empregados, ao nível de  $\alpha = 0,01$ . O meio III propiciou o maior crescimento do tubo polínico, aproximadamente 430% superior aos meios I e II. Apesar do meio II também conter nutrientes na mesma quantidade do meio III, a diferença ocorrida pode ter sido devido ao teor de sacarose, maior no meio III, interagindo com os nutrientes, principalmente boro e cálcio.

POTTS & MARSDEN-SMEDLEY (1989) têm reportado uma concentração de 20% como aquela em que ocorreu o maior crescimento do tubo polínico dentre as quatro espécies de *Eucalyptus* estudadas.

O maior crescimento, vigor e menor ocorrência de rompimento do tubo polínico (permeabilidade da membrana), segundo BHOJWANI & BATHNAGAR (1974) têm sido associados à

presença de cálcio, na germinação do pólen. Isto se deve ao fato do cálcio estar relacionado à síntese de substâncias pécticas, conforme relatam STANLEY & LINSKENS, 1974. O efeito do cálcio sobre o crescimento do tubo polínico e germinação do pólen depende, todavia, da presença de uma pressão osmótica adequada, oxigênio e boro. Essa pressão pode ser conseguida por intermédio de um doador metil, tal como metionina e/ou outros cátions inorgânicos como  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $H^+$  (BREWBAKER & KWACK, 1963; BHOJWANI & BATHNAGAR, 1974). Segundo STANLEY & LINSKENS (1974), com exceção do ácido giberélico, nenhuma outra substância como o cálcio promove o crescimento tão eficazmente do tubo polínico. Ainda, de acordo com BHOJWANI & BATHNAGAR (1974), a ausência de cálcio no meio germinativo aumenta a permeabilidade da membrana do pólen, com a consequente perda de metabólitos internos.

Interações significativas entre sacarose e cálcio no crescimento do tubo polínico e germinação do pólen foram detectadas nos estudos de Brewbaker e Kwack (1963), citados por LUZA & POLITO (1985). STANLEY & LINSKENS (1974) estão de acordo com a hipótese do

boro participar direta ou indiretamente nos passos enzimáticos da biossíntese de carboidratos. Exemplos de interação sacarose e boro atuando no comprimento do tubo polínico e na germinação do pólen podem ser vistos nos trabalhos de POTTS & MARSDEN-SMEDLEY (1969) e DHAR (1983), para espécies de *Eucalyptus* e *Atropa belladonna*, respectivamente. Por outro lado, a interação entre a sacarose, boro e cálcio neste trabalho pode estar ocorrendo, da forma relatada por KWACK (1965), que estudou

40 distintas espécies vegetais. Na presença de sacarose, pode estar havendo ainda interações entre os nutrientes, como no caso de cálcio e boro relatado por DHAR (1983), influenciando o crescimento do tubo polínico.

#### CONCLUSões

- O meio de cultura contendo apenas sacarose e ágar (Convencional) proporcionou maior valor para germinação do pólen de *E. dumii*, do que os demais meios.

- No meio de Brewbaker & Kwack modificado para sacarose e ágar, a germinação do pólen foi 22% superior àquela observada no meio de Brewbaker & Kwack mais ágar.

- O meio de "Brewbaker & Kwack modificado para sacarose e ágar" propiciou o maior crescimento do tubo polínico, aproximadamente 430% superior aos demais meios testados.

- A germinação "in vitro" e especialmente o crescimento do tubo polínico de *E. dumii* mostraram comportamento diferenciado em relação aos meios de cultura testados, em decorrência das possíveis interações dos seus componentes.

- Os resultados mostraram baixos valores de germinação do pólen de *E. dumii* comparativamente às outras espécies do gênero. Os fatores fisiológicos, dentre outros, podem ser responsabilizados pelas diferenças ocorridas na germinação e crescimento do tubo polínico, justificando concentrar maiores esforços aos estudos sobre fisiologia do pólen desse gênero.

- Nenhum dos meios testados congregou valores máximos de germinação e crescimento do tubo polínico, indicando a necessidade de pesquisas para a definição da proporção ideal dos componentes do meio de cultura.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração do Estatístico Osmir José Lavoranti do CNPF-EMBRAPA pela elaboração das Figuras.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKORODA, M.O. Estimating pollen viability for controlled hybridization in white yam. *Crop Research*, Edinburgh, v.24, p.11-22, 1984.
- BHOJWANI, S.S. & BHATNAGAR, S.P. *The embryology of angiosperms*. New Delhi, Sylark Painters, 1974. 264p.
- BODEN, R.W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. *Australian Forestry*, Canberra, 12(2):73-81, 1958.
- BORGES, C.P.; SILVA, A.A.; FERREIRA, M. Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de *Eucalyptus* spp. *IPEF*, Piracicaba, (6):3-32, 1973.
- BREWBAKER, J.L. & KWACK, B.H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, New York, 50:859-65, 1963.
- BRIGATTI, R.A. Relatório do convênio Champion Papel e Celulose S.A., IPEF, Piracicaba, Departamento de Silvicultura, 1981 (1º semestre, 59p.)
- CAUVIN, B. *Eucalyptus* hybridation controlée. *Annales de Recherches*

- Sylvicoles*, Paris (1984):85-118, 1984.
- DHAR, A.K. In vitro germination and pollen tube growth of belladonna (*Atropa belladonna*, L.) *Crop Improvement*, v.10, n.2, p.142-144, 1983.
- DIAVANSHIR, R.K.; FECHNER, G.H. Pollen germination and pollen tube growth of juniperous from autumn and winter collections. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 24(1):26-9, 1975.
- DORMAN, K.W. *The genetics and breeding of southern pines*. Washington, USDA, Forest Service, 1976. 407p.
- EENIK, A.H. Preliminary results of research on storage and "in vitro" germination of lettuce pollen as an aid in lettuce breeding. *Euphytica*, Wageningen, v.32, p.521-526, 1983.
- FILITIN, N.; MARCUSSI, M.C. Germination "in vitro" di polline di pero: influenza di alcuni fattori colturali. *Revista della Ortoflorofrutticoltura Italiana*, Firenze, v.66, p.201-216, 1982.
- GABRIELLI, A.C.; CUNHA, R.A.; MAULE, V. Conservação do pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fim de cruzamento. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 40(2):51-7, 1965.
- GRIFFIN, A.R.; CHING, K.K.; JOHNSON, K.W.; HAND, F.F.; BURGESS, J.P. Processing *Eucalyptus* pollen for use in controlled pollination. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 31(5/6):198-203, 1982.
- KWACK, B. The effect of calcium on pollen germination. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, Geneva, v. 86, p. 818-823, 1965.
- LUZA, J.G. & POLITO, V.S. In vitro germination and storage of english walnut pollen. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.27, p.303-316, 1985.
- MALTI, SHIVANNA, K.R. The role of pistil in screening compatible pollen. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.70. p.684-686, 1985.
- MENCK, A.L.M.; ODA, S.; MARCHI, E.L.; KOVALSKI, M.E. Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp. *IPEF*, Piracicaba, (43/44):20-23, 1990.
- PICTON, J.M.; STEER, M.W. Evidence for the role of Ca<sup>2+</sup> ions in tip extension in pollen tubes. *Protoplasma*, New York, v.115, p.11-17, 1983.
- POTTS, B.M.; MARSDEN-SMEDLEY, J.B. "In vitro" germination of *Eucalyptus* pollen: response to variation in basic acid and sucrose. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v.37, p.429-41, 1989.
- SOUSA, V.A. Relatórios de estágio referente ao Convênio IPEF-Champion Papel e Celulose S.A. Piracicaba-SP, (s.d.).
- SOUSA, V.A. Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp. Piracicaba, ESALQ, 1988. 155p. (Tese Mestrado).
- SPRAGUE, I. Seed and pollen handling. In: TREE IMPROVEMENT SHORT COURSE. Raleigh, Carolina State University, 1977. p.90-102.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. *Pollen Biology Biochemistry Management*. Berlin, Springer-Verlag, 1974. 307p.
- VAN WYK, G. Pollen management for eucalypts. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. P.84-8.
- ZIELINSKI, Q.B.; OLEZ, H. Effects of levels of manganese in the culture medium on pollen germination and pollen growth of prune. In: PROCEEDINGS OF THE AMERICAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE. Geneva. v.83. p.205-209, 1963.