



VIABILIDADE DO PÓLEN DE MAMONA HÍBRIDO LARA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

CUCHIARA, Cristina Copstein¹; BORGES, Clarissa de Souza¹; LOPES, Amanda Moreira¹; RICKES, Letícia Neutzling¹; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos e²; BOBROWSKI, Vera Lucia¹.

¹Laboratório de Genética, Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil, fone (53) 91654778, e-mail: cccuchiara@hotmail.com;

²Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, EMBRAPA, Pelotas, RS

1. INTRODUÇÃO

O armazenamento, como meio de manutenção da viabilidade do pólen, é importante para a preservação da variabilidade genética, facilita o intercâmbio de germoplasma e contribui muito na geração de variabilidade obtida através de cruzamentos artificiais aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genético (Gomes et al., 2003).

O emprego de baixas temperaturas influencia no armazenamento e normalmente encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Pode-se conseguir redução de temperatura por meio de refrigeradores e freezers, que são de fácil acesso (Pio et al., 2007).

A técnica da criopreservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C) proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Almeida et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade dos grãos de pólen de mamona conservados em diferentes ambientes de armazenamento, por um período de 15 e 30 dias, visando sua utilização em programas de melhoramento e conservação de germoplasma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética (DZG, IB, UFPel). Foi utilizado o híbrido Lara, proveniente do campo experimental da Embrapa Clima Temperado, localizado em Pelotas, RS, na latitude 31°41'S e longitude 52°21'W e de altitude 60m.

As amostras foram coletadas de cinco inflorescências em estádios de desenvolvimento diferentes, transportadas ao laboratório e mantidas em água

destilada à temperatura ambiente até a abertura floral. Os grãos de pólen das inflorescências foram coletados e acondicionados em tubo tipo *ependorf*.

Os tratamentos de conservação utilizados neste experimento foram nitrogênio líquido (-196°C); ultrafreezer (-72°); freezer (-18 °C) e refrigerador (4°C) durante 15 e 30 dias e germinação direta, ou seja, semeadura dos polens logo após a coleta, como controle da viabilidade polínica inicial, para todos os tratamentos.

A avaliação da viabilidade do pólen foi feita pelo teste de germinação *in vitro*, onde foram utilizados meios de cultura constituídos de 10g de açúcar cristal, 1g de ágar para 100ml de água destilada e diferentes concentrações de ácido bórico (0; 4; 8 e 10 mg.L⁻¹) com pH ajustado para 6, os quais foram aquecidos para total diluição do ágar. Ainda quente, os meios foram distribuídos em lâminas escavada de Kline com doze poros (o conjunto de seis poros equivale a repetições iguais). O pólen foi polvilhado sobre o meio frio, com um pincel.

As placas foram colocadas em placas de Petri com fundo coberto por papel germiteste umedecido (simulando uma câmara úmida), e levadas para incubação em câmara de germinação tipo BOD com temperatura controlada de 20°C.

Após uma hora, realizou-se a contagem de grãos de pólen germinados, segundo Pasqual et al. (1982), foram considerados como germinados aqueles que apresentassem tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen, num total de 100 polens/cavidade da placa e seis repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1984). Os dados, expressos em percentagem, foram transformados segundo arco seno da raiz quadrada de X/100, onde X representa o valor percentual obtido para cada variável.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios da germinação *in vitro* de grãos de pólen do híbrido Lara de acordo com os diferentes tratamentos de armazenamento nas referidas épocas de avaliação. Foi feita uma análise estatística para os tempos de armazenamento e comparada com os resultados para o pólen fresco.

Para pólen fresco houve diferença estatística altamente significativa entre a ausência e a presença de ácido bórico nas diferentes concentrações testadas ($p < 0,01$), onde as concentrações de boro provocaram um aumento no percentual de germinação quando comparados à ausência dessa substância.

Segundo Luza & Polito (1985), pequenas quantidades de boro adicionadas ao meio melhoram a germinação e o crescimento do tubo polínico e diminuem a probabilidade destes estourarem. Além disso, um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos (Galletta, 1983).

Quando avaliada a germinação do pólen nos diferentes meios, a interação de ambientes de armazenamento x tempo apresentou diferença estatística altamente significativa para os diferentes tratamentos com ácido bórico ($p < 0,01$).

Em programas de melhoramento genético, o armazenamento de pólen é de extrema importância, pois é necessário que este mantenha viabilidade até o momento em que será utilizado em hibridações. A manutenção da capacidade de germinação do pólen depende, além das características intrínsecas da espécie, das condições de armazenamento (Franzon et al., 2007).

Na ausência de ácido bórico, os polens provenientes de ambientes de armazenamento refrigerador e freezer, não apresentaram diferença estatística significativa entre si na germinação aos 15 e 30 dias, pois os polens se apresentaram totalmente inviáveis após este período diferindo dos resultados para pólen fresco cultivado no mesmo meio. Para aqueles mantidos no ultrafreezer, houve uma diminuição gradativa do percentual de germinação com o tempo de armazenamento, com infertilidade total aos 30 dias de conservação. No armazenamento com nitrogênio líquido, não houve diferença no porcentual germinação de polens frescos e armazenados, permanecendo constante aos 15 dias (em torno de 17%) e houve um decréscimo aos 30 dias, sem haver a infertilidade total do gameta masculino.

Tabela 1. Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen do híbrido Lara, conservados em diferentes ambientes de armazenamento. Pelotas, UFPel/2009.

ÁCIDO BÓRICO (mg.mL ⁻¹)	PÓLEN FRESCO*	AMBIENTES**	15 DIAS	30 DIAS
0	17,42 b	Refrigerador	1,00 A c	0,02 A b
		Freezer	0,44 A c	0,00 A b
		Ultrafreezer	4,43 A b	0,00 B b
		Nitrogênio Líquido	17,21 A a	4,08 B a
4	35,47 a	Refrigerador	1,63 A b	0,05 B b
		Freezer	0,02 A c	0,00 A b
		Ultrafreezer	0,16 A c	0,00 A b
		Nitrogênio Líquido	27,36 A a	3,78 B a
8	37,62 a	Refrigerador	4,06 A b	0,00 B b
		Freezer	0,02 A c	0,00 A b
		Ultrafreezer	0,00 A c	0,00 A b
		Nitrogênio Líquido	34,24 A a	4,45 B a
10	31,82 ab	Refrigerador	0,54 A b	0,00 A b
		Freezer	0,00 A b	0,00 A b
		Ultrafreezer	0,00 A b	0,00 A b
		Nitrogênio Líquido	19,48 A a	3,33 B a

*Médias seguidas de letras minúsculas diferem estatisticamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan.

**Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas diferem estatisticamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan e médias seguidas de letras minúsculas nas colunas diferem estatisticamente ao nível de 1% pelo teste de Duncan.

Em relação ao ácido bórico, tanto nos polens frescos quanto nos polens armazenados, a presença desta substância favoreceu o crescimento dos tubos polínicos, apresentando comportamentos semelhantes nos diferentes tratamentos.

Nas concentrações de 4 e 8 mg.L⁻¹, a germinação de polens armazenados no freezer e no ultrafreezer não apresentaram diferença estatística nas duas épocas analisadas, tornando-se totalmente inviáveis. Já nos ambientes de refrigerador e nitrogênio líquido, houve um decréscimo acentuado na viabilidade com o passar do

tempo, porém a criopreservação mostrou-se mais indicada no armazenamento de polens de mamona ao longo do período.

Na concentração de 10 mg.L⁻¹ de ácido bórico, os ambientes de refrigerador, freezer e ultrafreezer não apresentaram diferença estatística significativa durante as duas análises. Porém, corroborando com as demais concentrações de ácido bórico, o nitrogênio líquido mostrou-se mais eficaz na conservação de grãos de pólen desse híbrido, contudo apresentando uma drástica diminuição no percentual de germinação.

Essa redução no percentual de germinação deve-se ao metabolismo, pois o movimento molecular a baixas temperaturas é super reduzido, não havendo fase líquida na célula. A grande dificuldade do processo é a formação de cristais de gelo no interior das células, que podem causar ruptura das membranas resultando em colapso e morte, como consequência da perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular (Santos et al., 2002; Salomom, 2003).

4. CONCLUSÕES

O armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) é mais eficiente que os demais ambientes no período estudado (até 30 dias), porém com baixo percentual de germinação.

Otimização de processos de armazenamento de pólen em mamona devem continuar, principalmente no que diz respeito às novas condições de armazenamento, pois é necessário que o pólen se mantenha viável por períodos maiores do que aqueles aqui testados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. DE A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. Criopreservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 2002, v.6, n.2, p.295-302.
- FRANZON, R.C.; RASEIRA, M.C.B.; WAGNER JÚNIOR, A. Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Acta Sci. Agron.**, 2007, v. 29, n. 2, p. 251-255.
- GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. ED. Methods in fruit breeding. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.
- GOMES, P. R.; RASEIRA, M. DO C. B.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, 2003, v. 25, n.1, p 14-17.
- LUZA, J.G.; POLITO, V.S. *In vitro* germination and storage of english walnut pollen. **Sci. Horticul.**, 1985, v. 27, p. 303-316.
- PASQUAL, M.; PETRI, J. L.; MATTOS, C. S. Polinização da macieira III: cultivares BR-1 e Mollies Delicious. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 1982, v. 17, n. 10, p. 1477-1481.
- PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D. R.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e agrotecnologia**, 2007, v. 31, n. 1, p. 147-153.
- SALOMOM, M. V. **Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras**. 2003. 180f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SANTOS, I.R.I.; SALOMÃO, A.M.; MUNDIM, R.C.; RIBEIRO, F.N.S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2002. 4p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 69).

ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. 1984. **SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Registrado na Secretaria Especial de Informática sob nº 066060 - categoria A. Pelotas, RS: Universidade Federal de Pelotas.