

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**CONSERVAÇÃO À BAIXA TEMPERATURA E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE  
GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA**

**Cristina Copstein Cuchiara**

Pelotas, 2010.

**CRISTINA COPSTEIN CUCHIARA**

**CONSERVAÇÃO À BAIXA TEMPERATURA E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE  
GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob orientação da Profa. Dra. Vera Lucia Bobrowski, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

Orientador: Profa. Dra. Vera Lucia Bobrowski

Co-Orientador: Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Pelotas, 2010.



Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C963c      Cuchiara, Cristina Copstein  
                Conservação à baixa temperatura e avaliação da viabilidade de grãos de pólen de mamoneira / Cristina Copstein Cuchiara ; orientador Vera Lucia Bobrowski ; co-orientador Sérgio Delmar dos Anjos e Silva – Pelotas, 2010. – 100f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

                1.Fisiologia vegetal. 2.Armazenamento de pólen. 3.Tubo polínico. 4.Germinação *in vitro*. 5.Viabilidade polínica. 6.Melhoramento genético. I.Bobrowski, Vera Lucia. II.Silva, Sérgio Delmar dos Anjos e. III.Título.

CDD: 582.0463

**CRISTINA COPSTEIN CUCHIARA**

**Banca examinadora:**

Profª Drª Vera Lucia Bobrowski.....

Prof. Dr. Valmor João Bianchi.....

Drª Ilisandra Zanandrea.....

♥ *Dedico este trabalho aos meus pais  
que estiveram presentes em todos  
momentos com muito amor. ♥*

## **AGRADECIMENTOS**

♥ Ao meu pai, Paulo Renato, e à minha mãe, Debora, pessoas muito especiais, que nunca mediram esforços, incentivos e, que por inúmeras vezes, se doaram por completo a meu favor, abrindo mão de suas necessidades, desejos pessoais e sonhos em favor dos meus;

♥ A meu irmão Gustavo e a minha cunhada Mariana, pelo carinho, dedicação, paciência e ajuda nas traduções;

♥ À orientadora e amiga Vera Lucia Bobrowski, pela a orientação na construção deste trabalho, meus sinceros reconhecimentos;

♥ Ao Pesquisador, Sérgio Delmar dos Anjos e Silva pela ajuda na obtenção da matéria – prima;

♥ Em especial a amiga, Mirian de Farias Ribeiro pela a ajuda nos trabalhos, estudos e amizade;

♥ As amigas e colegas de laboratório Patrícia da Silva Justo Kleinhans, Clarissa de Souza Borges, Amanda Moreira Lopes e Letícia Neutzling Rickes pelas ajudas nas análises e pela amizade;

♥ Aos demais colegas de aula que puderam me ajudar de alguma forma;

♥ A UFPel, pela a oportunidade do conhecimento;

♥ Ao departamento de Zoologia e Genética, especialmente ao Laboratório de Genética, por receber-me e por ter possibilitado a realização desse trabalho;

♥ Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos científicos, acolhimento, confiança e seriedade;

♥ A CAPES, pela oportunidade e concessão da bolsa de estudo;

♥ Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

CUCHIARA, Cristina Copstein. **Conservação à baixa temperatura e avaliação da viabilidade de grãos de pólen de mamoneira**. 2010. 100f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é conhecida pela alta capacidade de adaptação às diferentes condições de clima e solo, características estas que a possibilita ser comercialmente cultivada em diferentes regiões do Brasil. Consequentemente, pesquisas sobre conservação e germinação do pólen são indispensáveis aos programas de melhoramento genético. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e a conservação de grãos de pólen de mamoneira. Para tanto, foram utilizados botões florais das cvs. IAC 80, AL Guarany 2002 e Lara. No 1º experimento, foram selecionados parâmetros adequados de pH (5, 6, 7 e 8), temperatura (15, 20, 25 e 30 °C), sacarose (0; 5; 10 e 20%) e combinações de 4, 8 e 10 mgL<sup>-1</sup> boro com sacarose. No 2º experimento, foi avaliado o armazenamento de pólen das cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002 em 4 ambientes (nitrogênio líquido (-196 °C); ultrafreezer (-72 °C); freezer (-18 °C) e refrigerador (4 °C)) sendo a análise realizada de semana em semana até completar 30 dias e aos 60 dias. No 3º experimento foi avaliado o efeito do tempo de descongelamento de pólen das cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002, submetidas aos mesmos ambientes e períodos de armazenamento (15, 30 e 60 dias) analisados de hora em hora até completar 6h e após 24h. O teste de viabilidade foi constituído do preparo do meio de cultura ideal para cada experimento, após depositado em placas de lâmina escavada, onde o pólen foi distribuído sobre a superfície do meio e após as placas foram colocadas em câmara úmida e levadas para incubação. Em delineamento inteiramente casualizado, foram analisados 100 polens/repetição num total de 4 repetições para o 1º experimento e 6 para os demais. No 1º experimento foi verificado que valores de pH acima de 6,0 provocam diminuição na quantidade de polens germinados. A temperatura de 20 °C com 5% e 10% de sacarose foram adequadas para a germinação. Sacarose com 4 e 8 mgL<sup>-1</sup> de boro aumentaram a germinação, porém 10 mgL<sup>-1</sup> não favoreceu. Observou-se no 2º experimento que o armazenamento em 4 e -18 °C não é eficiente, pois o número de polens germinados caíram rapidamente causando inviabilidade após a 5ª semana. Em -72 °C os polens da cv. IAC 80 permaneceram viáveis até a 4ª semana e os da cv. AL Guarany 2002 apresentaram viabilidade aos 60 dias e -196 °C foi muito eficiente até a 5ª semana. Com o 3º experimento foi possível verificar que para a cv. IAC 80, aos 15 e 30 dias de armazenamento, a temperatura de -72 °C apresentou em torno de 50% de germinação necessitando de 5 e 6h de incubação para o descongelamento, respectivamente; para a cv. AL Guarany 2002, o melhor porcentual foi alcançado a temperatura de -196 °C sendo observado aos 60 dias a ocorrência de inviabilidade. Portanto, as cultivares responderam de forma diferente a melhor metodologia de avaliação de viabilidade polínica e conservação, no entanto, o que sugere ser espécie-específico.

**Palavras-chave:** armazenamento de pólen; tubo polínico; germinação *in vitro*; viabilidade polínica; melhoramento genético.

## ABSTRACT

CUCHIARA, Cristina Copstein. **Conservation in low temperatures and avaluation of the viability of castor bean pollen grain.** 2010. 100f. Paper (Master of Science) Post Graduation Program in Plant Physiology of Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The castor bean (*Ricinus communis* L.) it is known by the high adaptation capacity to the different climate conditions and soil, characteristics these that it possible be her cultivated commercially in different areas of Brazil. Consequently, researches about conservation and germination of the pollen are indispensable to the programs of genetic improvement. The purpose is to evaluate the viability and conserve grains of castor bean pollen. For the study, were used floral buttons of the cultivars IAC 80, AL Guarany 2002 and Lara. In the first experiment, were selected appropriate parameters of pH (5, 6, 7 and 8), temperature (15, 20, 25 and 30 °C), sucrose (0; 5; 10 and 20%) and combinations of 4, 8 and 10 mgL<sup>-1</sup> boron with sucrose. In the second experiment, the storage of pollen was evaluated of the cultivars IAC 80 and AL Guarany 2002 in four places (liquid nitrogen (-196 °C); ultrafreezer (-72 °C); freezer (-18 °C) and refrigerator (4 °C)) being analyzed week after week to complete thirty days and in the sixty days. The third experiment was evaluated the effect about the time of defreezing of pollen cultivars IAC 80 and AL Guarany 2002, submitted to the same places and storage periods (15, 30 and 60 days) analyzed of hour after hour to complete six hours and after twenty-four hours. The viability test was constituted preparing ideal culture medium for each experiment, after that it was deposited in excavated plates, where the pollen was distributed on the surface of the medium, the plates were put in humid camera and taken for incubation. In random delineation, were analyzed a hundred pollens per repetitions in a total of four repetitions for the first experiment and six for the others. In the first experiment was observed that pH values above 6,0 cause decrease in the amount of germinated pollens. The temperature of 20 °C and 5% and 10% of sucrose were appropriate for the germination. Sucrose and 4 and 8 boron mgL<sup>-1</sup> increased the germination, however 10 mgL<sup>-1</sup> didn't favor. It was observed in the second experiment that the storage in 4 and -18 °C is not efficient, the number of germinated pollens falls quickly causing unviability after the fifth week, in -72°C the pollens of the cultivar IAC 80 stayed viable even the fourth week and the cultivar AL Guarany 2002 presented viability the sixty days and -196 °C was very efficient even to fifth week. With the third experiment can be verified that for the cultivars IAC 80, to the 15 and 30 days of storage, the temperature of the -72 °C presented around 50% of germination needing five and six hours of incubation for the defreezing, respectively; for the cultivar AL Guarany 2002, the best result was reached to -196 °C and the sixty days was occurred the unviability. Therefore, the cultivars answered in a different way the best methodology of evaluation of pollen viability and conservation, however, the one that suggests be species-specific.

**Key words:** pollen storage; pollen tubes; *in vitro* germination; pollen viability; improvement varieties.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 2.1 Análise de variância para variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes níveis de pH. Pelotas. UFPel, 2009..... 33
- Tabela 2.2 Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes temperaturas. Pelotas. UFPel, 2009..... 35
- Tabela 2.3 Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes níveis de sacarose. Pelotas. UFPel, 2009..... 37
- Tabela 2.4 Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes combinações de sacarose e ácido bórico. Pelotas. UFPel, 2009. 38

### CAPÍTULO 3

- Tabela 3.1 Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas a tratamentos de baixas temperaturas em diferentes épocas de avaliação. Pelotas. UFPel, 2009..... 51
- Tabela 3.2 Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar IAC 80, submetidos a diferentes temperaturas de armazenamento. Pelotas. UFPel, 2009..... 52
- Tabela 3.3 Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar AL Guarany 2002, submetidos a diferentes temperaturas de armazenamento. Pelotas. UFPel, 2009..... 52

### CAPÍTULO 4

- Tabela 4.1 Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de mamoneira cv. IAC 80 submetida a diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas e horas de descongelamento. Pelotas. UFPel, 2009..... 65
- Tabela 4.2 Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de mamoneira cv. AL Guarany 2002 submetida a diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas e horas de descongelamento. Pelotas. UFPel, 2009..... 65

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1.1	Esquema dos dois processos distintos da formação do grão de pólen.....	11
------------	--	----

### CAPÍTULO 2

Figura 2.1	Imagens das diferentes etapas da metodologia. A. Inflorescências de mamoneira coletadas; B. Inflorescências mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese; C. Placas de lâmina escavada de Kline com doze poros; D. Câmara úmida; E. Grãos de pólen distribuídos sob meio de cultura e F. Polens apresentando tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. Pelotas. UFPel, 2009.....	32
Figura 2.2	Porcentagem de grãos de pólen germinados de cultivares IAC 80, AL Guarany 2002 e Lara submetidas a diferentes níveis de pH (A), temperatura (B) e sacarose (C). Pelotas. UFPel, 2009....	34
Figura 2.3	Porcentagem de grãos de pólen germinados de cultivares IAC 80, AL Guarany 2002 e Lara submetidas a 4 mgL <sup>-1</sup> de ácido bórico (A), 8 mgL <sup>-1</sup> de ácido bórico (B) e 10 mgL <sup>-1</sup> de ácido bórico (C) e diferentes níveis de sacarose. Pelotas. UFPel, 2009.....	39

### CAPÍTULO 3

Figura 3.1	Imagens de etapas da metodologia. A. Inflorescências de mamoneira coletadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese; e B. Polens apresentando tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. Pelotas. UFPel, 2009.....	49
------------	--	----

### CAPÍTULO 4

Figura 4.1	Imagens das diferentes etapas da metodologia. A. Inflorescências de mamoneira coletadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese; B. Teste de germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen; C. Placas de lâmina escavada de Kline com doze poros; D. Câmara úmida e E. Polens apresentando tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. Pelotas. UFPel, 2009.....	63
------------	--	----



Figura 4.2	Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira da cv. IAC 80 submetidas a horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação e diferentes ambientes de armazenamento a baixas temperaturas: A. Refrigerador; B. Freezer; C. Ultrafreezer e D. Nitrogênio Líquido. Pelotas. UFPel, 2009.....	66
Figura 4.3	Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira da cv. AL Guarany 2002 submetidas a horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação e diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas: A. Refrigerador; B. Freezer; C. Ultrafreezer e D. Nitrogênio Líquido. Pelotas. UFPel, 2009.....	69
Figura 4.4	Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira das cvs. IAC 80 (A) e AL Guarany 2002 (B) submetidas a diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas avaliada aos 60 dias de conservação. Pelotas. UFPel, 2009.....	72

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
FORMAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN E TESTES DE AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE.....	5
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1.1 INTRODUÇÃO .....	8
1.2 MICROSPOROGENESE E MICROGAMETOGÊNESE .....	9
1.3 O GRÃO DE PÓLEN .....	13
1.4 VIABILIDADE DO PÓLEN .....	15
1.4.1 Testes colorimétricos .....	16
1.4.2 Testes de germinação <i>in vitro</i> .....	19
1.4.3. Teste de germinação <i>in vivo</i> .....	23
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	24
OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA ( <i>RICINUS COMMUNIS</i> L.) .....	25
RESUMO .....	26
ABSTRACT .....	27
2.1 INTRODUÇÃO .....	28
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.2.1 Ensaio com diferentes pH no meio de cultivo .....	30
2.2.2 Ensaio com diferentes temperaturas de incubação .....	30
2.2.3 Ensaio com diferentes concentrações de sacarose .....	31
2.2.4. Ensaio com diferentes concentrações de boro e sacarose .....	31
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
2.4 CONCLUSÕES .....	42
CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA ( <i>RICINUS COMMUNIS</i> L.) À BAIXA TEMPERATURA.....	43
RESUMO .....	44
ABSTRACT .....	45
3.1 INTRODUÇÃO .....	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
3.4 CONCLUSÃO .....	55
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE DESCONGELAMENTO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA SUBMETIDOS A DIFERENTES AMBIENTES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO EM FRIO .....	56
RESUMO .....	57
ABSTRACT .....	58
4.1 INTRODUÇÃO .....	59
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	61
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
4.4 CONCLUSÃO .....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

## INTRODUÇÃO GERAL

A mamoneira pertence à classe Dicotyledoneae, subclasse Archichlamydae, ordem Geraniales, família Euphorbiaceae, gênero *Ricinus* e espécie *Ricinus communis* L. (WEISS, 1983). Trata-se de uma xerófila de origem afro-asiática, bastante tolerante à escassez de água, porém não suporta excesso de umidade; sendo exigente em calor e luminosidade (COELHO, 1979). Porém essa espécie tem boa adaptação às condições edafoclimáticas do Rio Grande do Sul, mesmo onde não ocorrem temperaturas maiores que 40 °C, mas são comuns temperaturas inferiores a 10 °C no inverno. O período livre de geadas varia de 139 dias, nos Campos de Cima da Serra, a 243 dias, na Depressão Central (WREGGE et al., 2007). Considerando-se seus bons índices de desenvolvimento e produtividade em cultivos no estado, constitui-se em uma alternativa promissora para desenvolvimento econômico e social na Região Sul (SILVA et al., 2009).

Caracterizada por ser uma espécie perene que pode viver mais de 12 anos e atingir até 10 metros de altura, a planta tem hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas palmatilobadas e frutos tipo racemo (cachos), podendo possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos, geralmente, possuem espinhos, podendo as sementes apresentar diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração (MOREIRA et al., 1996; AZEVEDO et al., 1997; AMORIM NETO et al., 1999; AZEVEDO e LIMA, 2001; LORENZI e MATOS, 2002, SAVY FILHO et al., 1999a, 2005).

A mamoneira apresenta inflorescência do tipo panicular com flores dispostas em grupos sobre racemos terminais com 15 a 50 cm de comprimento, as femininas ocupando a parte superior e as masculinas a parte inferior do eixo da inflorescência, podendo ainda apresentar plantas com flores hermafroditas ou somente com flores

femininas (AZEVEDO e LIMA, 2001; LORENZI e MATOS, 2002). Os grãos de pólen de mamoneira são pequenos, considerados ovais, com 20 a 22µm de largura e 29 a 33µm de comprimento segundo Azevedo e Lima (2001).

Os teores de óleo das sementes variam de 35 a 55%, cujo padrão comercial é de 48% (CARNEIRO, 2003). Conhecido como óleo de rícino e, internacionalmente, como *castor oil*, tem a Índia como principal país produtor, contribuindo com 68,2% da produção mundial de óleo. A China encontra-se em segundo lugar, sendo responsável por 14,6%, totalmente destinada ao consumo próprio, e o Brasil vem em terceiro com 9,2%. Estes três países produzem 92% de toda mamona comercializada no mundo (SAVY FILHO et al., 1999b; CONAB, 2009).

No mercado internacional é o segundo óleo vegetal mais bem cotado visto ser superior ao diesel mineral. Seu elevado valor estratégico é reconhecido pelo fato de não haver bons substitutos em muitas de suas aplicações e devido, também, a sua versatilidade industrial (BELTRÃO, 2004).

O óleo de mamona possui utilização direta na confecção de cosméticos e produtos de toalete (SAVY FILHO et al., 1999b), ressaltando-se também seu uso na biomedicina para elaboração de próteses (BDMG, 2000). Em termos quantitativos, tem-se o maior uso na fabricação de tintas, vernizes, cosméticos e sabões, destacando-se os lubrificantes, devido ao seu poder de permitir a queima sem deixar resíduos nem perder viscosidade, superando os derivados de petróleo, ideal, portanto, para motores de alta rotação (COELHO, 1979).

Reconhecido como o petróleo verde, o óleo de mamona pode ser utilizado como fonte energética renovável, em substituição ao óleo diesel e, com base em pesquisas de desenvolvimento de novas tecnologias, o óleo é considerado, também, matéria-prima do futuro, uma vez que a mamoneira é uma planta adaptada ao solo brasileiro, podendo ser cultivada em qualquer parte do País (CHIERICE e CLARO NETO, 2001). Porém, sua utilização mais atual é na obtenção do biodiesel, visto ser o único óleo solúvel em álcool e não necessitar de calor e do conseqüente gasto de energia, que requerem outros óleos vegetais em sua transformação para o combustível (COSTA, 2006).

Existem várias cultivares de mamoneira disponíveis para o plantio em nosso País, variando em porte, deiscência dos frutos, tipo dos cachos e outras características. Conforme EMBRAPA (2004), a pesquisa com cultivares começou no Estado de São Paulo em 1937, com trabalhos desenvolvidos pelo Instituto

Agrônomo de Campinas (IAC). Em 1988, também no Estado de São Paulo, foi lançada a cultivar IAC 80, obtida pela seleção massal e polinização controlada de material coletado em Pirapozinho (SP), é recomendada para todas as áreas zoneadas o cultivo desta oleaginosa naquele Estado, sendo um material bastante produtivo, com 47% de óleo nas sementes, frutos deiscentes, porte alto e com sementes rajadas e pequenas (SAVY FILHO, 2009). Apresenta ciclo de 240 dias e o início da floração aos 60 dias após a semeadura (POLETINE et al., 2004; VERISSIMO et al., 2006).

Também desenvolvida para as condições climáticas do Estado de São Paulo, a cultivar AL Guarany 2002, pode ser plantada em diferentes regiões do país, apresentando características climáticas similares, as citadas para a IAC 80. Ela foi desenvolvida pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral do Estado de São Paulo (CATI) em 2002. Tem porte médio, caule roxo com cera, frutos indeiscentes, sementes de tamanho médio, cor marrom escura contendo estrias cinza-claras e possuindo 48% de óleo na semente (CATI, 2009). Originada pela seleção massal clássica de mamoneira cultivar Guarani oriunda da multiplicação própria de agricultores por várias gerações. Apresenta ciclo de 180 dias (até a colheita dos cachos terciários) e o início da floração ocorre aos 57 dias após a semeadura (POLETINE et al., 2004; VERISSIMO et al., 2006). Já os híbridos comerciais, como é o caso de Lara, apresentam alta porcentagem de flores femininas, precocidade, fruto indeiscente e porte baixo, possibilitando a colheita da primeira inflorescência após 34 dias de semeadura (POLETINE et al., 2004; VERISSIMO et al., 2006; SILVA et al., 2009).

A polinização e a fertilização são processos biológicos essenciais à frutificação e produção de sementes. Nesse contexto, as pesquisas sobre conservação e germinação do pólen são indispensáveis aos programas de melhoramento genético e, conseqüentemente, à própria evolução da cultura (BARBOSA et al., 1991).

Em trabalhos de polinizações controladas, há, normalmente, o requerimento de razoável quantidade de pólen viável para uso imediato ou em cruzamentos para obtenção de híbridos onde são requeridos cruzamentos entre materiais de ciclos distintos (FERREIRA et al., 2007). Porém, segundo Barbosa et al. (1991), nem sempre é possível devido à rápida inviabilização polínica, causada por inadequada armazenagem. Tal fato tem estimulado os melhoristas na procura de métodos

efetivos para a conservação do pólen por longos períodos em diferentes espécies. Este armazenamento é importante para a preservação de germoplasma, desenvolvimento de pesquisas com pólen, promoção de intercâmbio de germoplasma e melhoria da eficiência dos programas de melhoramento (GOMES et al., 2003).

Em decorrência da necessidade de estocagem de pólen, tomou-se como obrigatória a verificação periódica de sua viabilidade; assim, foram desenvolvidos diferentes testes (OBERLE e WATSON, 1953; MEDEIROS, 1979; WERNER e CHANG, 1981; PARFITT e GANESHAN, 1989) observando-se, no entanto, pouco consenso quanto a melhor metodologia de avaliação de viabilidade polínica, o que sugere ser espécie-específico e, portanto decorre a necessidade da realização de testes para cada espécie a ser estudada.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a viabilidade e a conservação à baixa temperatura de grãos de pólen de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) visando, em especial, o conhecimento e a manutenção das características polínicas desejáveis, de modo a caracterizar a fertilidade dos grãos de pólen para a utilização em trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético.

## **CAPÍTULO 1**

### **FORMAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN E TESTES DE AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE**

## RESUMO

A palinologia é a ciência que estuda os grãos de pólen e suas aplicações. Dentre elas destaca-se a utilização no melhoramento de plantas, em estudos de viabilidade de polens, aumentando a produção de sementes viáveis em várias culturas por meio da obtenção do índice máximo de fertilização. Dois processos distintos, a microsporogênese e a microgametogênese, levam à formação do pólen. A microsporogênese é a formação dos micrósporos dentro dos sacos polínicos da antera e a microgametogênese é o desenvolvimento do microgametófito dentro do grão de pólen maduro até o estágio de três células. O grão de pólen é uma estrutura microscópica de coloração amarelada que apresenta número haplóide de cromossomos e dará origem ao gameta masculino. É formado por duas membranas: a exina, que confere rigidez e a intina, na qual ocorre o processo de emissão, alongamento, desenvolvimento e formação do tubo polínico. Os estudos sobre viabilidade do pólen possibilitam evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura. Existem quatro métodos para se estimar a viabilidade de pólen: testes de germinação *in vitro*; uso de corantes; testes de germinação *in vivo* e a formação de sementes após polinização normal de um genitor feminino selecionado. O uso de corantes é o método mais rápido e mais usado para verificar a viabilidade, dentre eles destacam-se solução de Alexander, carmim acético, lugol, sudan IV, azul de anilina em lactofenol, azul de tripan e sais do tetrazólio (TTC). A germinação *in vitro* é o mais seguro método e revela o verdadeiro estado das reservas, a condição das membranas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar. Entretanto, é influenciado pela composição do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, pelo estágio de desenvolvimento da flor quando da coleta do pólen, pelas condições de armazenamento, entre outros. Já a germinação *in vivo* e a formação de sementes são testes precisos, que exigem um tempo maior até que se possa avaliar os resultados. Portanto, informações sobre viabilidade polínica são importantes para programas de melhoramento e na preservação de recursos genéticos.

**Palavras-chave:** microsporogênese; microgametogênese; tubo polínico; germinação *in vitro*; corantes; melhoramento genético.



## ABSTRACT

The palinology is the science that studies the pollen grains and their applications. Among them stands out the use in the improvement of plants, in studies about the viability of pollens, increasing the production of viable seeds in several cultures through the obtaining of the maximum index of fertilization. Two different processes, the microsporogenesis and the microgametogenesis, take the formation of the pollen. The microsporogenesis is the formation of the microspores inside of the anther pollen sacks and the microgametogenesis is the development of the microsporocyte inside the ripe grain pollen to the stage of three cells. The pollen grain is a microscopic structure of yellowish coloration that presents number haploid of chromosomes and it will create the male gamete. It is formed by two membranes: the exin, that checks rigidity and the intin, where happens the emission process, prolongation, development and formation of the pollen tube. With the studies about viability of the pollen it is possible to evidence the masculine reproductive potentiality of the species, supplying basic information for the practical application in the genetic conservation, as well in the agriculture. There are four methods to esteem the pollen viability: tests *in vitro* germination; use of pollen staining; tests *in vivo* germination and the formation of seeds after normal pollination of a selected feminine genitor. The use of pollen staining is the fastest method and it is more used to verify the viability, among them they stand out Alexander's stain, acetocarmine, iodine-potassium iodide, Sudan IV, aniline blue in lactophenol, tripan blue and salts of the tetrazolium (TTC). The *in vitro* germination is the most insurance method and it reveals the true state of the reservations, the condition of the membranes and the conversion of the reservations for the pollen grain to germinate. However, it is influenced by the composition of the culture medium, the temperature and the time of incubation, for the stadium of the flower development, during the collection of the pollen, for the storage conditions, among others. Already the *in vivo* germination and the formation of seeds are necessary tests, that they demand the larger time until than she can evaluate the results. Therefore, information on pollen viability are important for improvement programs and the preservation of genetic resources.

**Key words:** microsporogenesis; microgametogenesis; pollen tubes; *in vitro* germination; stain; improvement varieties.

## 1.1 INTRODUÇÃO

A palinologia é a ciência que estuda as características morfológicas externas de grãos de pólen e esporos (fosséis e atuais) e também sua dispersão e aplicações. Esta ciência possui íntima relação com outros ramos, como por exemplo, citologia, fisiologia, genética, física, química e matemática.

Dentre as inúmeras aplicações, destacam-se a utilização prática no melhoramento de plantas, notadamente nos estudos de viabilidade de polens, oferecendo perspectivas para o aumento da produção de sementes viáveis em várias culturas, através da obtenção do índice máximo de fertilização (NEVES et al., 1997; NUNES et al., 2001). Porém, alguns fatores estão associados a esse processo, destacando-se aqueles intrínsecos à própria natureza do pólen, relacionados a seu estado de maturação fisiológica, origem, características genéticas, nutrição de plantas e agentes químicos e ambientais, como temperatura e umidade (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999).

Desse modo, a determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (PEÑALOZA, 1995).

## 1.2 MICROSPOROGENESE E MICROGAMETOGENESE

A meiose é o processo de divisão celular que ocorre nos organismos de reprodução sexuada, no qual uma célula somática dá origem a quatro gametas haplóides. Todos os organismos de reprodução sexuada, independente de sua complexidade reprodutiva, ao final de um processo meiótico normal, têm seu número de cromossomos reduzidos à metade (GOLUBOVSKAYA, 1979; citado por PAGLIARINI, 2000).

Na meiose ocorrem duas divisões celulares sem que aconteça um período S (síntese) entre elas. Na primeira meiose (a chamada Meiose I) ocorre a redução do número de cromossomos pela separação dos homólogos e na Meiose II ocorre a conservação do número cromossômico, porém com a separação das cromátides (GUERRA, 1989; WEISS, 2000). Este fato favorece o balanço do número de cromossomos ao final da fertilização dos núcleos masculino e feminino, garantindo a manutenção do número de cromossomos na espécie ao longo das sucessivas gerações (GOLUBOVSKAYA, 1979; citado por PAGLIARINI, 2000).

A meiose em um organismo exerce papel decisivo em sua estabilidade evolutiva, devido à complexidade dos fenômenos mecânicos, bioquímicos e genéticos envolvido. A meiose é uma das fontes de variabilidade genética utilizadas pelos organismos para sua adaptação ao meio ambiente e, conseqüente perpetuação através da descendência (SINGH, 1993).

Segundo Pagliarini (2000), o grau de fertilidade das plantas é demonstrado pela meiose, sendo a formação de gametas funcionais controlada por genes que garantem um processo meiótico normal. Entretanto, os genes podem sofrer mutações, ocasionando irregularidades que comprometem a fertilidade dos indivíduos. As mutações que ocorrem durante a meiose que afetam o pareamento

cromossômico são importantes, pois podem levar à esterilidade total ou à formação de indivíduos poliplóides e aneuplóides e reversão de autoincompatibilidade.

Em vegetais, dois processos distintos, a microsporogênese e a microgametogênese, levam a formação do grão de pólen (Fig. 1.1). A microsporogênese é a formação dos micrósporos (grãos de pólen unicelulares) dentro dos sacos polínicos da antera. A microgametogênese é o desenvolvimento do microgametófito dentro do grão de pólen maduro até o estágio de três células. Este processo ocorre em todas as espécies pela via sexuada (SANTOS-KALTCHUK e BODANESE-ZANETTINI, 2002).

A formação do grão de pólen é consequência dessas duas divisões meióticas. Na fase final deste ciclo, na telófase II, ocorre a formação das células mãe de pólen, (CM) que formarão as tétrades que por sua vez darão origem às células haplóides (micrósporos), formando um tetraedro imaginário (MENDES, 1994).

A microsporogênese ocorre nos sacos polínicos dentro das anteras, resultando na formação dos grãos de pólen. No início do seu desenvolvimento, a antera consiste em uma massa de células uniforme, com exceção de uma camada parcialmente diferenciada da epiderme. Em seguida, quatro grupos de células férteis, ou esporógenas, começam a se diferenciar na antera. As células esporógenas se transformam em microsporócitos primários (células-mãe de grãos de pólen), que sofrem meiose produzindo dois microspórocitos secundários. Estes, após a segunda meiose, originam quatro micrósporos haplóides. A microsporogênese se completa com a formação dos micrósporos unicelulares (RAVEN et al., 2001).

O micrósporo jovem, após sua liberação da tétrade, possui um grande núcleo central, citoplasma rico em ribossomos e com numerosos pequenos vacúolos (SANGWAN e CAMEFORT, 1982). Ao longo do tempo ocorre a coalescência dos vacúolos resultando na formação de um único vacúolo grande e central e, conseqüentemente, no deslocamento do núcleo para junto da parede do micrósporo (SAX e EDMONDS, 1933).

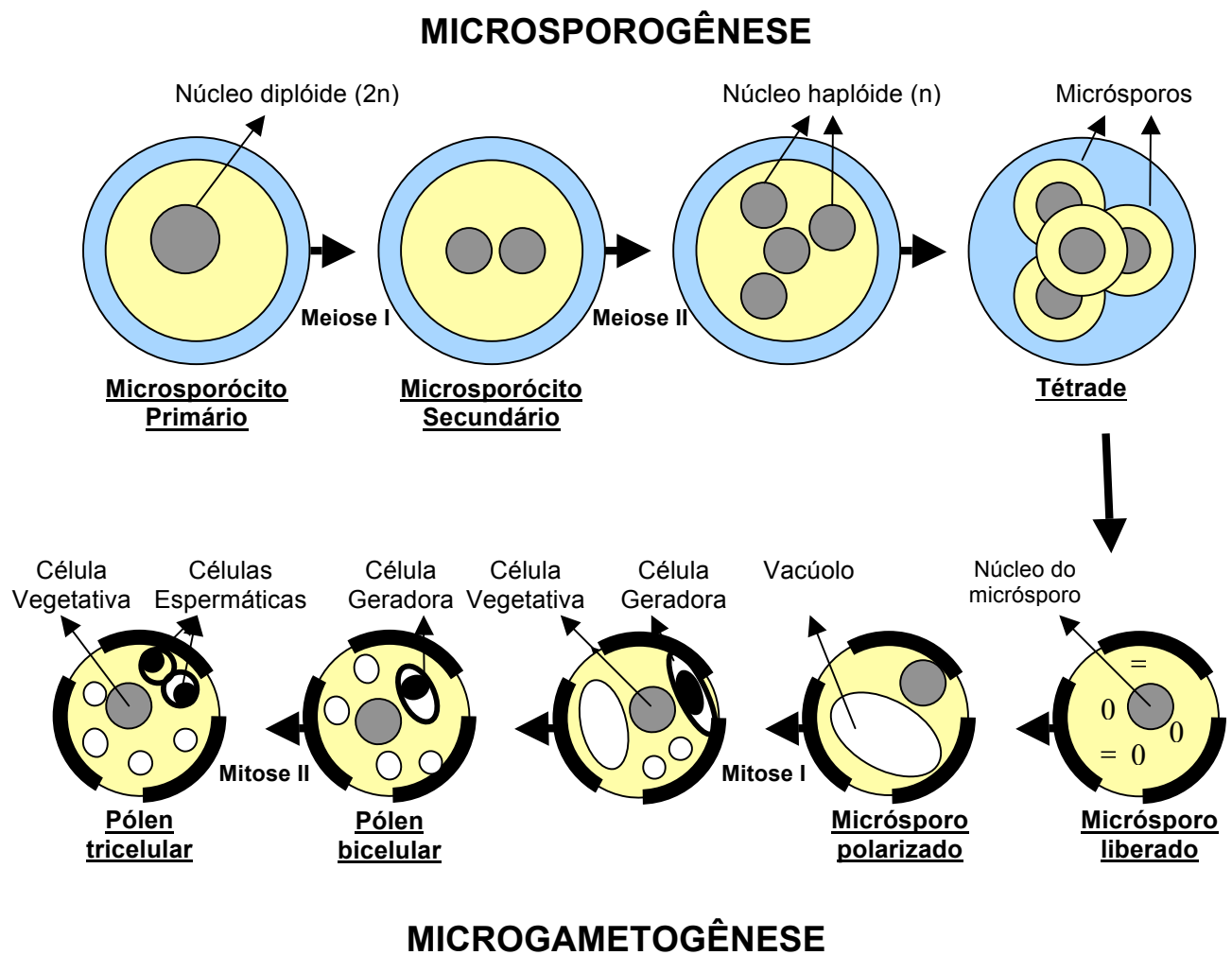


Figura 1. 1 - Esquema dos dois processos distintos da formação do grão de pólen.

Esta migração do núcleo constitui uma etapa chave da microgametogênese, uma vez que, em seguida se dá a primeira divisão mitótica, formando duas células dentro da parede original do micrósporo. A divisão forma uma grande célula vegetativa e uma célula geradora menor, que se desloca para o interior da célula vegetativa. Esse grão de pólen é bicelular e é o microgametófito imaturo, o microgametófito está neste estágio bicelular no momento que os grãos de pólen são liberados da antera.

A segunda mitose do pólen envolve apenas a célula geradora, enquanto a célula vegetativa permanece quiescente. Esta divisão dá origem a duas células alongadas e em forma de meia-lua, denominadas células espermáticas ou gametas masculinos. Portanto, o gametófito maduro é constituído por três células, a vegetativa e as duas gaméticas (RAVEN et al., 2001).

Segundo Souza e Pereira (2000), o desenvolvimento do pólen pode ser classificado em 10 fases: 1. massa esporogênica; 2. meiose; 3. díade; 4. tétrade; 5. micrósporo-jovem; 6. micrósporo-intermediário; 7. micrósporo maduro; 8. grão de pólen jovem; 9. grão de pólen intermediário, e 10. grão de pólen tardio. O microgametófito possui dois ou três núcleos de acordo com a espécie, as paredes celulares dos tecidos da antera engrossam e a antera começa a desidratar, causando a abertura e conseqüente liberação dos grãos de pólen.

### 1.3 O GRÃO DE PÓLEN

O grão de pólen é uma estrutura microscópica de coloração amarelada que apresenta número haplóide de cromossomos e dará origem ao gameta masculino (VIDAL e VIDAL, 2000). É formado por duas membranas: a externa, chamada exina, que confere rigidez ao grão de pólen e apresenta poros germinativos, e a interna, chamada intina, na qual ocorre o processo de emissão, alongamento, desenvolvimento e formação do tubo polínico (MELHEM e SALGADO-LABOURIAU, 1973). No seu interior, o grão de pólen apresenta dois núcleos: um menor, reprodutivo (célula geradora), que dará origem a dois microgametas, e o outro maior, nutritivo (célula vegetativa), que formará o tubo polínico (VIDAL e VIDAL, 2000).

É por meio da expansão e alongamento da intina, que se projeta através de um dos poros da exina, formando o tubo polínico, que ocorre a fertilização. É necessário que o pólen esteja em contato com o estigma para que germine, dando início ao processo de fecundação e posterior frutificação. O estigma exsuda uma secreção mucilaginosa altamente específica em lipídeos que evita sua desidratação e favorece a fixação dos grãos de pólen, garantindo ótimas condições para o alongamento da intina. Segundo Vidal e Vidal (2000), o núcleo vegetativo que dará origem ao tubo polínico desce através do estilete floral em direção ao ovário, atravessando o canal ou digerindo o tecido condutor do estilete. O núcleo reprodutivo do pólen dará origem a dois núcleos espermáticos, há penetração do tubo polínico no óvulo e desaparece o núcleo vegetativo.

O processo de emissão do tubo polínico é geralmente rápido (BREWBAKER e KWACK, 1963), iniciando-se através de estímulos de componentes químicos, como água destilada, ácido bórico, ácido nítrico, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, sacarose e nitrato de potássio (BREWBAKER e KWACK, 1963; PFAHLER, 1967). Segundo Carvalho e Nakagawa (1983), todo o período de formação do tubo polínico é controlado por substâncias naturais de crescimento, as

quais incluem tanto promotores quanto inibidores, sugerindo que os promotores de crescimento dirigem o tubo polínico por quimiotropismo, não necessitando de luz para ocorrer o processo.

Por meio de emissão, alongamento e formação de tubo polínico *in vitro*, pode-se verificar sua fertilidade, o que auxiliará em programas de melhoramento genético (SILVA, 1996).



#### **1.4 VIABILIDADE DO PÓLEN**

O emprego da polinização controlada, em cruzamentos inter e intraespecíficos, para ampliar a base genética da cultura e produção de novas variedades, defrontam-se com o problema de ocorrência de pólen viável em algumas espécies (TOMÉ, 2004).

Os estudos sobre viabilidade do pólen possibilitam indicar ao melhorista a habilidade do material disponível em produzir pólen viável e permitem mostrar a existência de diferenças intervarietais ou interespecíficas entre os genótipos empregados no programa de melhoramento. Além disso, irregularidades meióticas são eventos descritos como responsáveis pela menor porcentagem de polens viáveis (TOMÉ, 2004).

Por meio de dados sobre viabilidade de pólen, é possível obter correlações com anormalidades meióticas, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre os melhores cruzamentos, tornando-se uma ferramenta útil na condução de experimentos nas áreas agrícolas e biotecnológicas (TECHIO, 2002). Segundo Dafni (1992), a avaliação da viabilidade dos grãos de pólen é o primeiro passo no entendimento das chances que ele tem de germinar no estigma da flor, sendo esse um estágio crucial rumo à fertilização.

A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância pois além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura (ALEXANDER, 1980; ARROYO, 1981; GUINET, 1989).

De acordo com Loguercio e Battistin (2004), através de estudos sobre a viabilidade polínica pode-se estimar o potencial de reprodução de uma espécie,

cultivar ou população. Estes autores citam que muitas angiospermas produzem elevado percentual de pólen viável, muito embora nem todos possam ser utilizados na fertilização efetivamente. Considerando-se que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, isto é, aumento de variabilidade genética a qual é imprescindível para a seleção de novos cultivares com características agrônômicas desejáveis (SOUZA et al., 2002).

Segundo Galletta (1983), existem quatro métodos para se estimar a viabilidade de pólen, que são: testes de germinação *in vitro*; avaliação com o uso de corantes; testes de germinação *in vivo*, avaliando o crescimento do tubo polínico no estigma e/ou no pistilo e a formação de sementes após polinização normal de um genitor feminino selecionado. Dentre estes, considera-se que o método do corante superestima a porcentagem de germinação do pólen, enquanto o teste *in vitro* a subestima (GALETTA, 1983).

Segundo Stanley e Linskens (1974), nenhum teste de viabilidade é completamente satisfatório, principalmente após o pólen ter sido armazenado, pelas seguintes razões: os testes químicos usam corantes que reagem com constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar; amostras de grãos de pólen que germinam bem *in vitro*, podem não produzir suficiente elongação do tubo polínico para afetar a fertilização. Por outro lado, amostras de pólen que parecem não-viáveis quando testadas *in vitro*, podem produzir boa porcentagem de sementes *in vivo*; o pólen armazenado pode germinar diferentemente em amostragens repetidas ou em diferentes meios.

Técnicas de microscopia permitem analisar características associadas à germinação dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento, servindo também para analisar hibridações efetivas em programas de melhoramento genético e, assim, elucidar algumas formas de incompatibilidade (KEARS e INOUE, 1993).

#### **1.4.1 Testes colorimétricos**

O uso de corantes e contagem direta é o método mais rápido e geralmente mais usado para verificar a viabilidade de pólen segundo Kelly et al. (2002). Porém, este método pode superestimar viabilidade, pois, muitas vezes, grãos de pólen

inviáveis podem ainda corar, por possuírem quantidade suficiente de enzimas, amido ou, ainda, outras substâncias que reagem com estes corantes (GALLETTA, 1983).

Uma grande variedade de corantes tem sido usada para testar a viabilidade do pólen, mas poucos estudos testaram o risco potencial destes corantes em corar pólen morto e produzir falso positivo. Os corantes nucleares e vitais mais comumente utilizados são solução de Alexander, carmim acético, lugol, sudan IV, azul de anilina em lactofenol, azul de tripan e sais de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) (RODRIGUEZ-RIANO e DAFNI, 2000; KELLY et al., 2002; SOUZA et al., 2002).

O carmim acético indica a integridade cromossômica; a solução com lugol indica a presença de amido; a solução de sudan IV a de lipídios, a solução de Alexander contém fucsina ácida e verde de malaquita que reagem, respectivamente, com o protoplasma e a celulose da parede do pólen e o TTC a presença das enzimas desidrogenases ativas (MUNHOZ et al., 2008).

O teste colorimétrico de TTC reflete a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. Como a atividade enzimática do grão de pólen é associada à sua capacidade de germinação (DERIN e ETI, 1999), quando o TTC reage com o hidrogênio produzido pela respiração celular dá ao pólen uma coloração vermelha indicando viabilidade (HOEKSTRA e BRUINSMA, 1975).

Meios de cultivo ideais para pólen de *Carica papaya* foram utilizados como parâmetro para comparação entre os métodos germinativos e os colorimétricos (MUNHOZ et al., 2008). O teste com TTC foi o único método colorimétrico que forneceu resultados semelhantes à estimativa de viabilidade polínica dada pelos testes de germinação *in vitro*. Diversos autores argumentam que o teste do TTC é uma estimativa confiável de viabilidade polínica, sendo próxima àquela fornecida pelos testes de germinação *in vitro* (COHEN et al., 1989; MULUGETA et al., 1994; BOLAT e PIRLAK, 1999; HUANG et al. 2004). Além disso, o TTC é muito utilizado por ser relativamente rápido e simples, muito embora alguns autores façam ressalvas ao método, afirmando que ele pode fornecer resultados ambíguos, já que grãos de pólen abortados podem fornecer coloração semelhante àquela de grãos viáveis (HESLOP-HARRISON e HESLOP-HARRISON, 1970).

Testes com outros corantes como lugol e sudan IV são utilizados em alguns estudos como indicativos de viabilidade polínica dando ao pólen viável a coloração amarela e vermelha, respectivamente (SOUZA et al., 2002; HUANG et al., 2004). Entretanto, de acordo com outros autores, esses testes estão associados apenas à detecção de substâncias constituintes dos grãos de pólen, como amido e lipídios, que podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (KING, 1960; BEYHAUT, 1988; RODRIGUEZ-RIANO e DAFNI, 2000).

Corantes, como o carmim acético e a solução de Alexander, são também utilizados como indicativos de viabilidade polínica (MULUGETA et al., 1994; DOMINGUES et al., 1999; RIGAMOTO e TYAGI, 2002), porém para Báez et al. (2002) e Pline et al. (2002) estes testes refletem somente a integridade de estruturas celulares, como núcleo e membrana plasmática.

Os grãos de pólen corados com o carmim acético são analisados e classificados em normais/viáveis, com citoplasma corado e anormais/inviáveis, aqueles com pouco ou nenhum citoplasma evidenciado (GUERRA e SOUZA, 2002). De acordo com Souza et al. (2002), em maracujá, e Domingues et al. (1999), em laranja, valores acima de 70% representam alta viabilidade, de 31 a 69% média e até 30% baixos índices de viabilidade. Em cebola, pólen testado por carmin acético, como corante, apresentou-se como viável, enquanto em testes *in vitro* não germinou (LORENZON e ALMEIDA, 1997). Em mamoneira, o teste de viabilidade com carmim acético apresentou viabilidade acima de 98% enquanto que no teste de germinação *in vitro* apresentou 68,3% de grãos de pólen germinados (CUCHIARA et al., 2008a; 2008b). Como muitas vezes não existe outro parâmetro comparativo, a distinção entre viáveis e inviáveis torna-se duvidosa, devido a sua função de corar constituintes celulares.

Segundo Auler et al. (2006), o corante reativo de Alexander é o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen na carqueja, pois permitiu distinguir com mais segurança pólen viável do inviável. O viável apresenta parede celulósica de cor verde, pelo fato de ter afinidade com a corante verde-malaquita, que em reação química cora a celulose e hemicelulose presentes na parede da célula. O protoplasma celular do pólen reage quimicamente com a fucsina ácida dando cor púrpura. O pólen inviável apresenta a parede celulósica verde e o protoplasma, mal distribuído, pouco corado e não raramente ausente (ALEXANDER, 1980).

O corante azul de tripan é um corante de exclusão muito utilizado em diversos ramos da ciência, para ele são considerados viáveis os polens que não apresentam a coloração azul, sugerindo que o corante penetra em tecidos mortos (GOZLEKCI e KAYNAK, 2000). Em diferentes cultivares de mamoneira, o corante azul de tripan mostrou respostas variadas no percentual de viabilidade (em torno de 70%) (CUCHIARA et al., 2008a).

De acordo com a bibliografia, os testes com os corantes de Alexander, carmim acético, lugol e sudan IV, embora sejam técnicas muito atrativas pela simplicidade e rapidez, superestimam a viabilidade polínica quando comparados aos resultados obtidos com TTC, azul de tripan e germinação *in vitro* (KING, 1960; HESLOP-HARRISON e HESLOP-HARRISON, 1970; STANLEY e LINSKENS, 1974; RODRIGUEZ-RIANO e DAFNI, 2000).

#### **1.4.2 Testes de germinação *in vitro***

Segundo a literatura a germinação *in vitro* é o método mais conveniente e seguro para se testar a viabilidade de grãos de pólen e, segundo Marcellán e Camadro (1996), revela o verdadeiro estado das reservas, a condição das membranas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar.

O método geral consiste em germinar uma pequena amostra de pólen em meio de cultura apropriado e após incubação observar em microscópio o número de grãos que emitem tubo polínico (GALLETTA, 1983). Segundo Pasqual et al. (1982), são considerados como germinados aqueles que apresentam tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

Entretanto, a germinação de pólen *in vitro* é influenciada por diferentes fatores, dentre eles a composição do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, o estágio de desenvolvimento da flor quando da coleta do pólen, as condições de armazenamento (STANLEY e LINSKENS, 1974), além de existirem diferenças entre espécies e também entre cultivares da mesma espécie no que diz respeito às condições requeridas (ROSELL et al., 1999).

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar qualitativa e quantitativamente a melhor composição do meio de cultura para a germinação de grãos de pólen. O meio de cultura deve ser constituído basicamente por carboidratos e elementos estimulantes como ácido bórico, ácido cítrico, nitrato de cálcio,

reguladores de crescimento, dentre outros. Bombenc et al. (1999), estudando a germinação de grãos de pólen de kiwizeiro obtiveram melhores resultados com a utilização de meio de cultura composto por  $100 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $0,025 \text{ gL}^{-1}$  de ácido bórico e  $6 \text{ gL}^{-1}$  de ágar. Campos Andrada e Hill (1999) observaram em tremoço que o meio de cultura contendo  $200 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose,  $0,1 \text{ gL}^{-1}$  de ácido bórico e  $2,5 \text{ gL}^{-1}$  de ágar proporcionaram melhores resultados para germinação.

Scorza e Sherman (1995) consideram que um bom material deve apresentar 50 a 80% de grãos de pólen germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Ainda que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação.

O pH é um fator crítico e muito importante do meio de cultura, influenciando na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002). Se bem ajustado, o pH pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante, sendo que valores entre 5,0 e 6,5 proporcionam os melhores resultados na maioria das culturas *in vitro* (PIERIK, 1987; CHAGAS et al., 2006a). A importância da determinação do pH ideal nos processos fisiológicos que envolvem os grãos de pólen está associada a maior porcentagem de germinação que estes possam oferecer, garantindo maiores chances de fertilização (SALLES et al., 2006).

A temperatura é outro fator de significativa influência na germinação de pólen. Silva (1996) estudou diferentes temperaturas para germinação de pólen de maracujazeiro (20, 24, 25 e 28 °C), obtendo melhores resultados com 28 °C. Resultado similar também foi verificado para pereira (CHAGAS et al., 2006b) e pessegueiro (CHAGAS et al., 2006c). Vasilakakis e Porling (1985) e Chagas et al. (2006b), que obtiveram índices maiores de germinação e crescimento do tubo polínico na temperatura de 25 °C, em estudos realizados com pólen de laranjeira cv. Pêra e nectarineira, respectivamente.

Em relação à concentração do ágar utilizado para solidificar o meio de cultura, respostas na germinação de grãos de pólen variam também de acordo com a espécie. Algumas espécies germinam melhor em meio com maior concentração de ágar (FREITAS et al., 2006a), já outras, necessitam de quantidades menores

(CHAGAS et al., 2006b). A germinação do pólen tem sido bem sucedida na faixa de concentração entre 5 gL<sup>-1</sup> e 10 gL<sup>-1</sup>, para diversas espécies agrícolas e florestais. Por exemplo, Asif et al. (1983) usam ágar a 10 gL<sup>-1</sup> como concentração padronizada para a germinação do pólen de *Phoenix dactylifera* L.. Já Akoroda (1984) obteve boa germinação do pólen de *Dioscorea rotundata* Poir, empregando ágar a 7 gL<sup>-1</sup>.

O meio básico usado nos testes de germinação *in vitro* é constituído de açúcar e de ácido bórico (MIRANDA e CLEMENT, 1990), podendo variar ainda a combinação de outros nutrientes (GALLETTA, 1983). A adição de açúcar ao meio de cultura tem por objetivo o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, bem como fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY e LINSKENS, 1974). Já a presença de boro no meio estimula o crescimento do tubo polínico, sendo a resposta variável de acordo com a espécie. O boro interage com o açúcar formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (PFAHLER, 1967).

Aplicação de boro foliar em amendoeira reduziu a ruptura dos tubos polínicos durante a germinação e a adição de 0,1 gL<sup>-1</sup> de boro na cultura aumentou a germinação de grãos de pólen *in vitro* (NYOMORA et al., 2000). Segundo Luza e Polito (1985), pequenas quantidades de boro adicionado ao meio melhoram a germinação e o crescimento do tubo polínico e diminuem a probabilidade destes se romperem.

De todos os carboidratos, a sacarose e o mel são os mais freqüentemente adicionados no meio de germinação de grãos de pólen (GODDARD e MATHEWS, 1981). Segundo Goddard e Mathews (1981), é recomendada a concentração de 100 gL<sup>-1</sup> de sacarose, mas alguns polens de *Pinus* armazenados apresentam maior germinação na concentração de 200 gL<sup>-1</sup> de sacarose (SNYDER e CLAUSEN, 1974).

O cálcio adicionado ao meio de cultura propicia características fisiológicas como tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do mesmo com forma linear e aparência rígida (BHOJWANI e BHATNAGAR, 1974). Esta maior permeabilidade da membrana do tubo polínico na ausência de cálcio causa a liberação de metabólitos internos para o meio externo (STANLEY e LINSKENS, 1974). Oliveira Júnior (1996), pesquisando emissão de tubos polínicos em limoeiro cravo obteve bons resultados com concentração de 0,8 gL<sup>-1</sup> de cálcio. Beyoug

(1965) observou, em 46 espécies hortícolas, que a adição de cálcio promoveu a germinação de pólen e o crescimento do tubo polínico em todas as espécies estudadas.

Brewbaker e Kwack (1963), trabalhando com 86 espécies e 39 famílias, mostraram que adição de cálcio e boro atua como um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*. A necessidade de adição de cálcio e boro no meio de cultura para a germinação de grãos de pólen depende, entre outros fatores, da espécie e da variedade. Em nectarineira, a adição de cálcio e boro foi limitante para a germinação (CHAGAS et al., 2006a). Já para nespereira (CAVALLARI et al., 2006) e pereira (FREITAS et al., 2006b) constatou-se que o requerimento de cálcio e boro depende da variedade.

Parton et al. (2002), estudando a germinação de grãos de pólen em bromeliáceas concluiu que meio contendo 200 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 10 gL<sup>-1</sup> de ácido bórico e 5 gL<sup>-1</sup> de ágar, apresentaram os melhores resultados. Harikarunakar e Haripriya (2000) estudaram a germinação e a viabilidade de pólen de cebola e constataram que a germinação e o desenvolvimento do tubo polínico eram maiores em meio contendo 0,001 gL<sup>-1</sup> de ágar, 0,1 gL<sup>-1</sup> de ácido bórico e 0,005 gL<sup>-1</sup> de cinetina. Silva et al. (1999) constatou que o melhor meio para a germinação de pólen de maracujazeiro é composto por 50 gL<sup>-1</sup> de sacarose; 0,2 gL<sup>-1</sup> de ácido bórico e 1,0 gL<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio. Tuinstra e Wendel (2000), em experimentos com sorgo, observaram que em meio de cultura contendo 300 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 0,150 gL<sup>-1</sup> de ácido bórico e 0,350 gL<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio a germinação de grãos de pólen foi aumentada. Segundo Ramos et al. (2008), para a germinação *in vitro* de grãos de pólen das três variedades de laranja doce podem ser utilizados com sucesso 10 gL<sup>-1</sup> de sacarose, 0,8 gL<sup>-1</sup> de cálcio, 0,2 gL<sup>-1</sup> de ácido bórico e temperatura de 25 °C.

Porém, as condições e os meios de cultivo utilizados para determinadas espécies podem causar o rompimento dos grãos de pólen. Segundo Akamine e Girolami (1959), tubos polínicos se rompem devido, entre outros fatores, a alta umidade e a variação do meio, ocasionada pelo aumento da pressão osmótica e pela baixa resistência da parede celular. Conforme Galletta (1983), 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. Supõe-se que tal equilíbrio possa ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o



excesso ou deficiência de qualquer desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen.

#### **1.4.3. Teste de germinação *in vivo***

Existem também os testes de germinação *in vivo*, nos quais se deposita o grão de pólen no estigma receptivo e se analisa o desenvolvimento do tubo polínico no seu interior e/ou a formação de sementes após polinização normal de um genitor feminino selecionado, estes testes ocorrem por meio de autofecundações de plantas no campo. A metodologia de germinação *in vivo* apresenta algumas desvantagens, do ponto de vista prático, que podem refletir na avaliação da viabilidade, tais como a dificuldade de penetração do tubo polínico na superfície cuticular, a presença de água no estigma, podendo levar a ruptura do pólen, a não receptividade do estigma ou a incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; a aplicação de alta concentração de pólen que irá inibir a penetração do tubo polínico no estilete e a queda acentuada na temperatura, podendo modificar drasticamente a germinação do pólen *in vivo* (STANLEY e LINSKENS, 1974). Portanto, tanto a germinação *in vivo*, observada nos pistilos quanto a formação de sementes são testes bastante precisos, mas que exigem um tempo maior até que se possa avaliar os resultados.

## **1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Informações sobre viabilidade polínica são importantes, principalmente, para programas de melhoramento, nos quais são realizadas polinizações controladas e também na preservação de recursos genéticos.

Fatores como a duração do tempo de receptividade do estigma, longevidade do grão de pólen na planta, diferenças no período de florescimento entre plantas macho-férteis e macho-estéreis e conservação de recursos genéticos são alguns aspectos que reforçam a importância da preservação da viabilidade de grãos de pólen em condições controladas e de um método seguro de avaliação desta.

## **CAPÍTULO 2**

### **OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.)**

## RESUMO

Informações sobre germinação *in vitro* de polens são fundamentais para a biologia reprodutiva e melhoramento genético de diferentes espécies, diversos fatores como pH, sacarose, boro e temperatura, dentre outros, influenciam na viabilidade polínica. Objetivou-se selecionar parâmetros adequados de pH, temperatura, sacarose e ácido bórico para germinação *in vitro* de polens de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.), para tanto foram conduzidos quatro ensaios, onde cada ensaio serviu de suporte para definir a execução do ensaio seguinte. No primeiro, foi avaliado o efeito de diferentes valores de pH (5, 6, 7 e 8), no segundo, diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C), utilizando meio de cultura básico contendo 0,8% de ágar e 10% de sacarose. No terceiro, foram testadas diferentes concentrações de sacarose (0; 5; 10 e 20%) e no quarto ensaio, combinações de 4, 8 e 10 mgL<sup>-1</sup> boro com 0; 5; 10 e 20% de sacarose. O meio de cultura foi vertido em placas de lâmina escavada e o pólen distribuído sobre a superfície do meio. As placas foram colocadas em câmara úmida para incubação a 20 °C por 1h. No segundo ensaio, utilizou-se pH 6 e diferentes temperaturas de incubação. No terceiro e quarto, o pH e a temperatura foram ajustados para 6 e 20 °C, respectivamente e os meios foram modificados com concentrações de sacarose e boro. Em delineamento inteiramente casualizado, foram analisados 100 grãos de pólen em cada uma das 6 repetições de cada tratamento. De acordo com a análise de variância detectou-se que houve diferença estatística altamente significativa na interação dos fatores estudados ( $p < 0,01$ ). Portanto, quando se eleva o valor do pH acima de 6,0, houve diminuição na quantidade de polens germinados, exceto para a cv. Lara. Dentre as temperaturas, a de 20 °C foi a que permitiu maior germinação e a sacarose em concentrações entre 5% e 10% foi ótima para a germinação *in vitro*. Combinação de sacarose e 4 e 8 mgL<sup>-1</sup> de boro proporcionaram aumento da germinação. Porém a concentração de 10 mgL<sup>-1</sup> não favoreceu a germinação *in vitro*.

**Palavras-chave:** viabilidade polínica; meio de cultura; pH; temperatura; boro; sacarose.

## ABSTRACT

Informations about *in vitro* germination of pollens are fundamental for the reproductive biology and genetic improvement of different species, several factors as pH, sucrose, boron and temperature, among others, influence in the pollen viability. The main purpose of the work were to select appropriate parameters of pH, temperature, sucrose and boric acid for *in vitro* germination cultivars castor bean pollens (*Ricinus communis* L.), for that four tests were driven, where each test served as support to define the execution of the following test. In the first one, the effect of different pH values (5, 6, 7 and 8) was evaluated, in the second one, different temperatures (15, 20, 25 and 30 °C), using basic culture medium containing 0,8% of agar and 10% of sucrose. In the third, different sucrose concentrations were tested (0; 5; 10 and 20%) and in the fourth test combinations of 4, 8 and 10 mgL<sup>-1</sup> boron with 0; 5; 10 and 20% of sucrose. The culture medium was put in excavated plates and the pollen distributed on the surface of the medium. The plates were put in humid camera for incubation to 20 °C for one hour. In the second test, was used pH 6 and different incubation temperatures. In the third and fourth, the pH and the temperature were adjusted for 6 and 20 °C, respectively and the mediums were modified with the sucrose concentrations and boron. In random delineation, a hundred pollen grains were analyzed in each one of the four repetitions of each treatment. In agreement with the variance analysis it was detected a high significant statistics difference in the interaction of the studied factors ( $p < 0,01$ ). Therefore, when it rises the pH above 6,0, it decrease in the amount of germinated pollens, except for the hybrid Lara. Among the temperatures, the temperature of 20 °C was the one that allowed the largest germination and the sucrose in concentrations between 5% and 10% was great for the *in vitro* germination. Sucrose combination and 4 and 8 mgL<sup>-1</sup> boron increased the germination. However the concentration of 10 mgL<sup>-1</sup> didn't favor the *in vitro* germination.

**Key words:** pollen viability; culture medium; pH; temperature; boron; sucrose.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Dentre as matérias primas para a produção do biodiesel encontra-se a mamoneira (*Ricinus communis* L.), pertence à família Euphorbiaceae, que engloba vasto número de tipos de plantas nativas da região tropical (SAVY FILHO et al., 1999; SAVY FILHO, 2003). É uma planta com considerável potencial econômico visto que suas sementes, depois de industrializadas, dão origem a torta e ao óleo da mamona que, entre as diversas utilidades, é empregado na indústria de plástico, siderúrgica, saboaria, perfumaria, curtume, tintas e vernizes, além de ser excelente óleo lubrificante para motores de alta rotação e carburante de motores a diesel (AMORIM-NETO et al., 2001).

Embora a mamoneira tenha elevada plasticidade fenotípica e ampla adaptação a vários ambientes (WEISS, 2000), as variações ambientais influenciam o desempenho agrônômico da cultura. A produtividade da mamoneira está diretamente relacionada com a disponibilidade hídrica, temperatura, fotoperíodo e umidade relativa do ar, principalmente durante a fase reprodutiva, desde a floração dos racemos primários até a maturação dos terciários (MOSHKIN, 1986; KUMAR, 1997).

Diante da grande utilidade e conseqüente aumento do cultivo da mesma, dados sobre viabilidade e desenvolvimento de grãos de pólen através da germinação *in vitro* são fundamentais, sendo de grande importância em programas de melhoramento genético (GONÇALVES, 2008). Entretanto, este método é influenciado por diferentes fatores quanto às condições exigidas para a germinação do pólen, envolvendo, principalmente, os constituintes do meio de cultura, o pH, a temperatura e o tempo de incubação (STANLEY e LINSKENS, 1974; FRANZON et al., 2006). Várias pesquisas têm sido conduzidas a fim de estabelecer e padronizar

meios de cultura e condições adequadas para avaliar a viabilidade de pólen em diversas espécies (NUNES et al., 2001).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar condições adequadas de pH, temperatura, sacarose e ácido bórico para germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.).

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Departamento de Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas. Foram coletadas inflorescências de três cultivares de mamona: IAC 80 e AL Guarany 2002 e o Lara, do campo experimental da Embrapa Clima Temperado - CPACT, localizado no município de Pelotas-RS, na latitude 31°41'S e longitude 52°21'W e de altitude 60m.

As amostras foram coletadas no período da manhã entre 8 e 9h, em fevereiro, março e abril de 2008, de cinco inflorescências levadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a abertura floral (Fig. 2.1A), e posterior retirada dos grãos de pólen para análise (Fig. 2.1B).

### **2.2.1 Ensaio com diferentes pH no meio de cultivo**

O ensaio foi conduzido utilizando-se meio de cultivo contendo 0,8g de agar, 10g de sacarose em 100mL de água destilada de acordo com Gomes (1998). Os meios foram ajustados para os diferentes valores de pH 5, 6, 7 e 8. Após o ajuste de pH o meio foi aquecido para total dissolução do agar e depositado em lâmina escavada de Kline contendo doze cavidades (Fig. 2.1C). O pólen de cada cultivar foi inoculado sobre a superfície do meio com auxílio de um pincel de modo a promover uma distribuição uniforme do material (Fig. 2.1D). Estas lâminas foram colocadas dentro de placas de petri contendo papel germiteste umedecido simulando câmara úmida (Fig. 2.1E). Por fim foram incubados em estufa do tipo B.O.D. a 20 °C por uma hora.

### **2.2.2 Ensaio com diferentes temperaturas de incubação**



Este ensaio foi conduzido utilizando o meio de cultura básico citado anteriormente e com ajuste do pH 6,0. O procedimento utilizado foi o mesmo citado no item 2.2.1, sendo mantidos em estufa do tipo B.O.D. em diferentes temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C) por uma hora.

### **2.2.3 Ensaio com diferentes concentrações de sacarose**

Neste ensaio, utilizou-se o meio de cultura básico com pH 6,0 acrescido de diferentes concentrações de sacarose de 0, 5, 10 e 20% e após a inoculação do pólen estes foram incubados a temperatura de 20 °C. O procedimento de preparo de meio e inoculação do pólen foi o mesmo citado no item 2.2.1.

### **2.2.4. Ensaio com diferentes concentrações de boro e sacarose**

No quarto ensaio foram testadas as concentrações de 4, 8 e 10 mgL<sup>-1</sup> combinadas separadamente com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10 e 20%) sendo o pH ajustado para 6,0 e após a inoculação do pólen estes foram incubados a temperatura de 20 °C. O procedimento de preparo de meio e inoculação do pólen foi o mesmo citado no item 2.2.1.

Para todos os ensaios o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x4 (3 cultivar x 4 tratamento) . Cada cavidade da placa de Kline foi considerada uma repetição e avaliadas quatro repetições por tratamento, sendo as repetições constituídas de contagens de cem grãos de pólen germinados ou não, com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 10X onde foram considerados como germinados aqueles que apresentassem tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen (Fig. 2.1F) (PASQUAL et al., 1982).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan ( $\alpha = 1\%$ ), com auxílio do programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Os dados, expressos em percentagem, foram transformados segundo arco seno de  $(X/100)^{1/2}$ , onde X representa o valor percentual obtido para cada variável. Como forma de desdobrar os efeitos da interação dos fatores efetuou-se a análise de regressão polinomial, sendo representados na forma de gráficos individuais para cada ensaio.

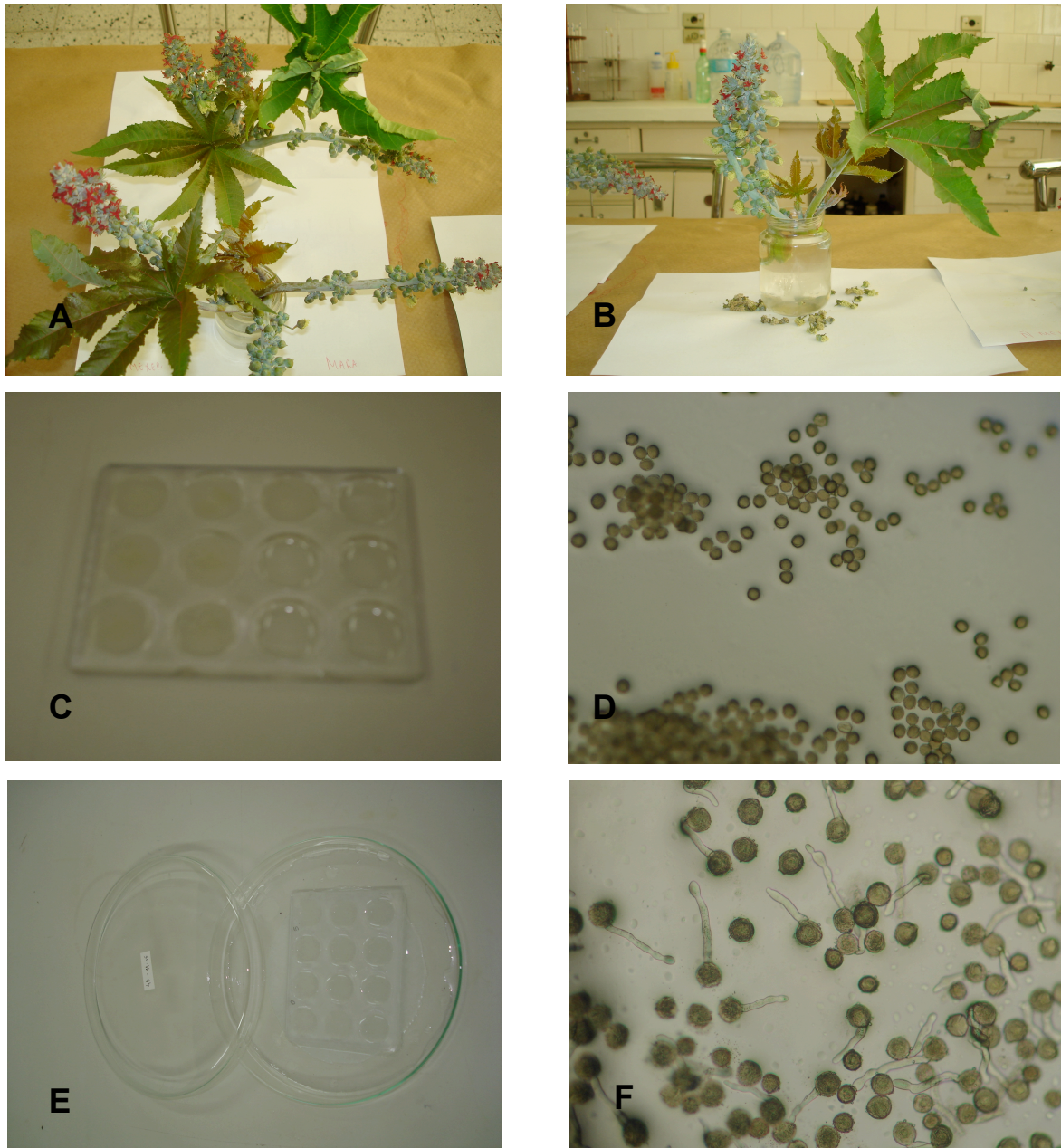


Figura 2.1 - Imagens das diferentes etapas da metodologia. A. Inflorescências de mamoneira coletadas; B. Inflorescências mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese; C. Placas de lâmina escavada de Kline com doze poros; D. Câmara úmida; E. Grãos de pólen distribuídos sob meio de cultura e F. Polens apresentando tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. Pelotas. UFPel, 2009.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a análise de variância na avaliação do pH, houve diferença estatística altamente significativa na interação dos fatores estudados ( $p < 0,01$ ), conforme tab. 2.1.

Tabela 2.1 - Análise de variância para variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes níveis de pH. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio
		Germinação (%)
Cultivares	2	788,824**
pH	3	1313,984**
Cultivar x pH	6	324,757**
Resíduo	36	48,321
C.V. (%)		14,326
Média Geral (%)		48,521

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Na Fig. 2.2A é possível observar que para as cultivares IAC 80 e AL Guarany 2002 há uma redução linear da germinação polínica à medida que o pH aumenta, apresentando maiores porcentagens de germinação (em torno de 80%) em pH 5 e havendo inibição da germinação em valores maiores. Entretanto, para a cv. Lara, não houve diferença estatística significativa na porcentagem de grãos de pólen germinados (em torno de 50%) nos diferentes pHs testados.

Com os resultados foi verificado que o nível de pH estimulou marcadamente o processo de germinação de pólen das duas cultivares, concordando com as observações de Brewbaker e Kwack (1963) e Stanley e Linskens (1974), os quais mostraram que o pH do meio de cultura influencia o processo da indução de germinação de pólen.

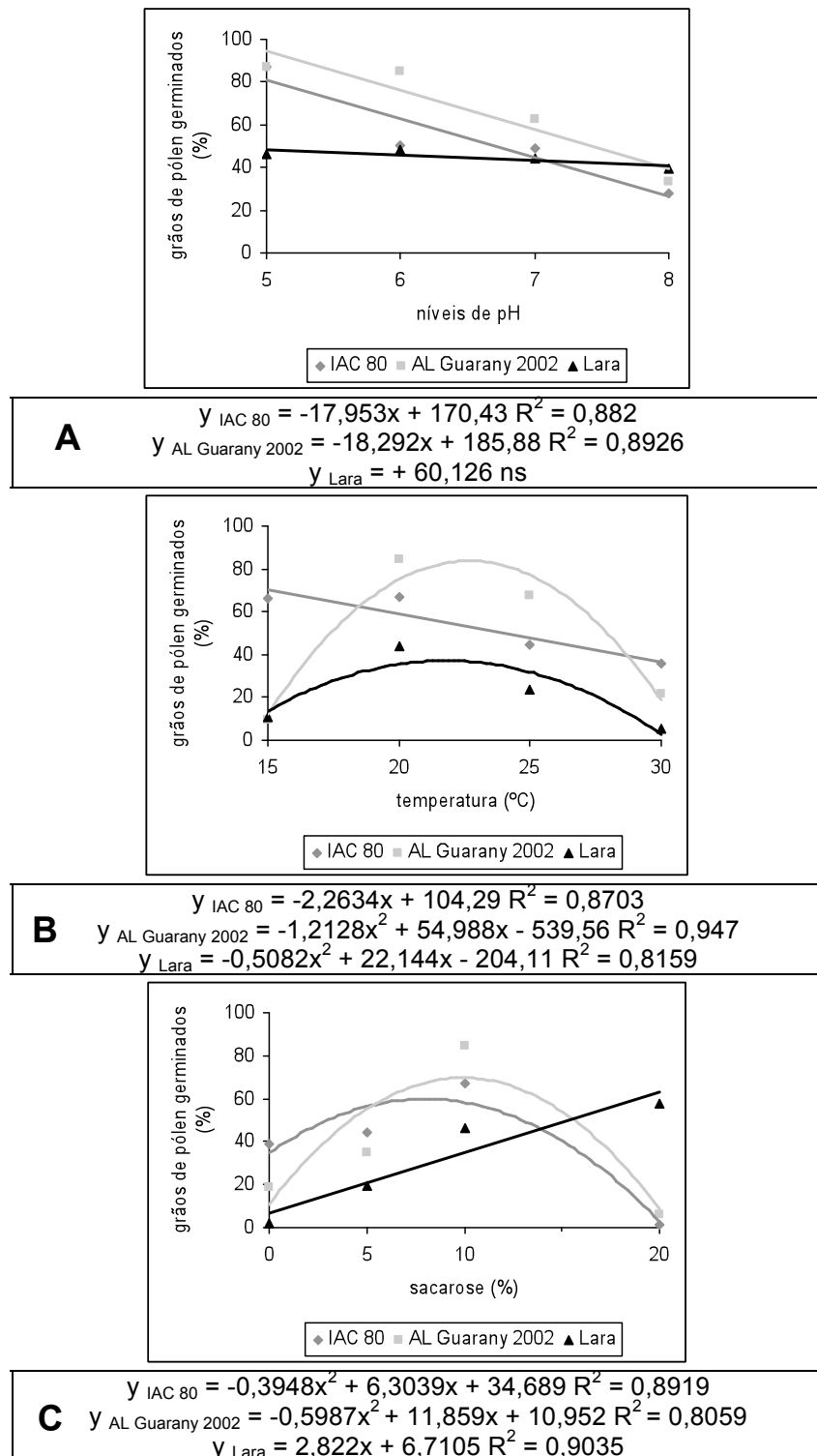


Figura 2. 2 - Porcentagem de grãos de pólen germinados de cultivares IAC 80, AL Guarany 2002 e Lara submetidas a diferentes níveis de pH (A), temperatura (B) e sacarose (C). Pelotas. UFPel, 2009.

O pH é um fator crítico e muito importante do meio de cultura, influenciando na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002). Quando ajustado adequadamente, o pH pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante, sendo que valores entre 5,0 e 6,5 proporcionam os melhores resultados na maioria das culturas *in vitro* (PIERIK, 1987; CHAGAS et al., 2006a).

Para o ensaio onde foram testadas diferentes temperaturas (tab.2.2), a análise de variância mostrou que houve diferença altamente significativa, na interação dos fatores estudados ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2.2 - Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes temperaturas. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio
		Germinação (%)
Cultivares	2	1944,450**
Temperatura	3	1949,207**
Cultivar x Temperatura	6	551,944**
Resíduo	36	18,818
C.V. (%)		11,336
Média Geral (%)		32,266

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

A temperatura é outro fator de significativa influência na germinação de pólen, sendo o estresse térmico o principal fator que limita a produtividade e adaptação das culturas, principalmente se as temperaturas extremas coincidem com os estádios críticos do desenvolvimento da planta (STEVENS e RUDICH, 1978). Observou-se uma oscilação no percentual de germinação do pólen entre diferentes temperaturas testadas, apresentando maiores valores entre as temperaturas de 20 e 25 °C para as cultivares, sendo possível estabelecer a temperatura de 20 °C como a ideal (Fig. 2.2B).

Diferente dos dados observados nesse ensaio, temperaturas ideais de incubação em torno de 25 °C são citadas na literatura para diversas espécies. Thompson e Batjer (1950) usaram 24 °C para pólen de ameixeira, pessegueiro (CHAGAS et al., 2009), damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira. Loupassaki et al. (1997) afirmam que 25 °C é a ideal para germinação de pólen de abacateiro, Nunes et al. (2001) utilizaram esta mesma temperatura para macieira,

Franzon e Raseira (2006) indicam que temperaturas de incubação entre 25 e 30 °C podem ser utilizadas para testes de germinação *in vitro* de pólen de cerejeira-do-rio-grande e Du et al. (2006) verificaram que a melhor temperatura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus mume* foi de 25 °C.

Devido a pouca informação na literatura sobre germinação de pólen de mamoneira, comparamos os resultados com outras espécies como, por exemplo, o trabalho de Ishihata (1983), que constatou uma faixa de temperatura excelente para germinação de grãos de pólen de maracujazeiro-roxo situada entre 25 e 30 °C, enquanto quase nenhuma germinação foi observada em 15 e 35 °C. Entretanto para as cvs. AL Guarany 2002 e Lara, a temperatura de 15 °C causou redução drástica de germinação (< 20% de grãos de pólen germinados) excetuando-se para a cv. IAC 80 que apresentou 70% de grãos de pólen germinados nessa temperatura, servindo como indicativo de tolerância ao frio, sendo assim considerado um resultado importante para as condições de temperatura do Estado do Rio Grande do Sul. Somente a cv. IAC 80 apresentou tendência de diminuição linear com o aumento da temperatura de incubação.

Os dados apresentados são similares aos resultados obtidos por Smith e Cochran (1935) em genótipos de tomateiro, onde observaram que a germinação de pólen e o comprimento do tubo polínico diminuíram significativamente com o aumento da temperatura. Resultados estes corroborados por Reghin (1996), que cita que temperaturas acima de 27 °C retardam tanto a germinação do pólen como o crescimento do tubo polínico.

De acordo com a tab. 2.3, pela análise de variância do ensaio, onde foram avaliadas diferentes concentrações de sacarose, houve efeito altamente significativo para a interação dos fatores estudados ( $p < 0,01$ ).

De todos os carboidratos, a sacarose e o mel são os mais freqüentemente adicionados no meio de germinação de grãos de pólen (GODDARD e MATHEWS, 1981). Segundo Goddard e Mathews (1981) é recomendada a concentração de 10% de sacarose, mas alguns polens de *Pinus* armazenados apresentaram maior germinação na concentração de 20% de sacarose (SNYDER e CLAUSEN, 1974).

Os resultados obtidos concordam com a afirmação de Miranda e Clement (1990), de que a sacarose é um dos componentes essenciais para a germinação de pólen, onde a adição desta ao meio de cultura proporciona equilíbrio osmótico entre grão de pólen e solução de germinação, fornecendo energia para o processo de

desenvolvimento do tubo polínico (ASKIN et al., 1990). Diferentes tipos de açúcares em concentrações variadas tem sido um dos principais componentes do meio de cultura que viabiliza a emissão do tubo polínico (SALLES et al., 2006).

Tabela 2.3 - Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes níveis de sacarose. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio
		Germinação (%)
Cultivares	2	84,481*
Sacarose	3	2590,149**
Cultivar x Sacarose	6	1252,088**
Resíduo	36	25,507
C.V. (%)		14,698
Média Geral (%)		34,362

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Conforme a Fig. 2.2C, os grãos de pólen das cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002, em relação à concentração de sacarose, apresentaram um comportamento semelhante, sendo que o melhor resultado foi obtido na concentração de 10%, a partir da qual e na ausência da mesma houve um decréscimo na porcentagem de grãos de pólen germinados. Dados semelhantes foram obtidos por Derin e Eti (2001) utilizando pólen de romã onde observaram que maiores taxas para germinação foram obtidas em meio de cultura contendo  $10 \text{ gL}^{-1}$  de sacarose.

Já para a cv. Lara houve um aumento linear da porcentagem de grãos de pólen germinados com o aumento da concentração de sacarose do meio, sendo a concentração de 20% ideal para essa cultivar.

Estes resultados concordam com a maioria dos autores, que afirmam que a sacarose é um dos componentes necessários para a germinação de pólen e também exerce a função de equilíbrio osmótico da solução, além de fornecer energia necessária para o crescimento do tubo polínico (STANLEY e LINSKENS, 1974; GALLETTA, 1983).

Segundo Akamine e Girolami (1959), tubos polínicos se rompem devido, entre outros fatores, à alta umidade e à variação do meio, ocasionada pelo aumento da pressão osmótica e pela baixa resistência da parede celular, evidenciando a necessidade do ajuste da concentração de sacarose para a germinação *in vitro* de pólen de diferentes espécies.

De acordo com a tab. 2.4, para o ensaio onde testou-se 4, 8 e 10 mgL<sup>-1</sup> de ácido bórico e diferentes concentrações de sacarose, a análise de variância mostrou que houve diferença altamente significativa para a interações dos fatores ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2.4 - Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de cultivares de mamoneira submetidas a diferentes combinações de sacarose e ácido bórico. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio		
		Germinação (%)		
		4 mgL <sup>-1</sup> ácido bórico	8 mgL <sup>-1</sup> ácido bórico	10 mgL <sup>-1</sup> ácido bórico
Cultivares	2	90,451*	370,703**	2978,251**
Sacarose	3	2097,545**	1556,253**	1403,183**
Cultivar x Sacarose	6	1797,972**	902,175**	1124,259**
Resíduo	36	29,526	28,296	13,659
C.V. (%)		11,992	12,961	14,493
Média Geral (%)		45,312	41,041	25,502

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Segundo Pfahler (1967), a adição de boro tem importância para germinação polínica e suas respostas são variáveis conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. Thompson e Batjer (1950) e Chagas et al. (2007), verificaram que a adição de boro ao meio aumentou marcadamente a porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico de várias espécies.

A Fig. 2.3A apresenta os resultados obtidos no ensaio de germinação de grãos de pólen das cultivares de mamoneira submetidas a 4 mgL<sup>-1</sup> de ácido bórico e diferentes níveis de sacarose.

As cvs. IAC 80 e Lara apresentaram um comportamento semelhante, onde a porcentagem de grãos de pólen germinados foi crescente com o aumento da concentração de sacarose, sendo o melhor resultado obtido na concentração testada de 10%. Para a cv. IAC 80 a concentração de 20% foi tóxica ocorrendo uma drástica redução na germinação *in vitro*. Já para a cv. Lara a ausência de sacarose inibiu a emissão do tubo polínico e o incremento gradativo da mesma aumenta a quantidade de grãos de pólen germinados, se mantendo constante (em torno de 70%) nas concentrações de 10 e 20% (Fig. 2.3A).



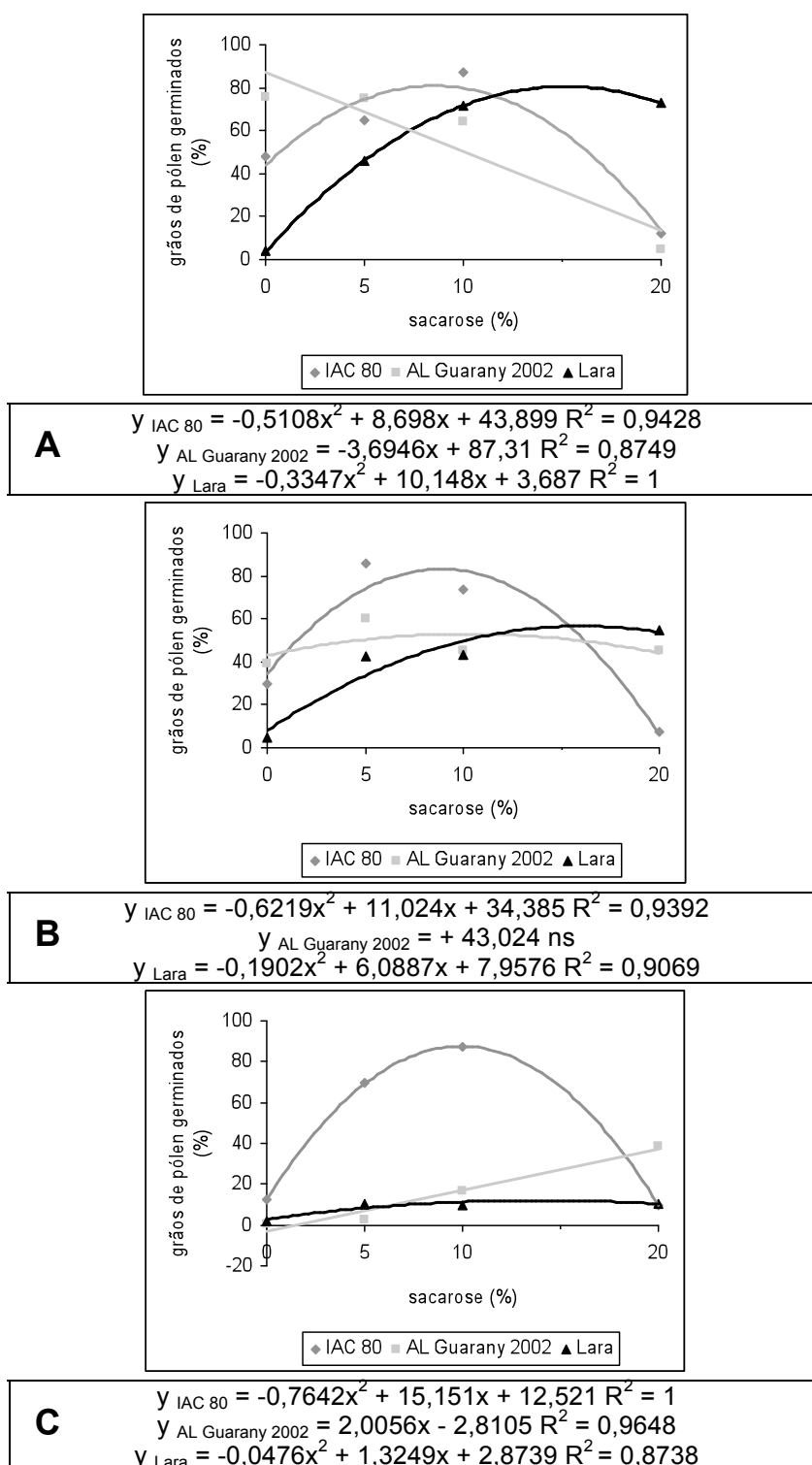


Figura 2.3- Porcentagem de grãos de pólen germinados de cultivares IAC 80, AL Guarany 2002 e Lara submetidas a  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico (A),  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico (B) e  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico (C) e diferentes níveis de sacarose. Pelotas. UFPel, 2009.

Ao contrário das demais cultivares, a cv. AL Guarany 2002 apresenta diminuição linear da germinação com o aumento da concentração de sacarose, sendo os melhores resultados obtidos na ausência e na concentração de 5%, acima destes valores ocorreu uma acentuada diminuição do poder germinativo (Fig. 2.3A).

A necessidade de adição de boro no meio de cultura para a germinação de grãos de pólen depende, entre outros fatores, da espécie e da variedade. Em nectarineira, a adição do boro foi limitante para a germinação (CHAGAS et al., 2006b). Já para nespereira (CAVALLARI et al., 2006) e pereira (FREITAS et al., 2006b) foi constatado que o requerimento de boro depende da variedade.

Em geral, a concentração de  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico causa um aumento satisfatório na emissão e no crescimento do tubo polínico, sendo que para a cv. IAC 80 a adição de 10% de sacarose causou 87% de emissão de tubo polínico, para a cv. AL Guarany 2002 na ausência e na concentração de 5% observou-se 75% de germinação e para a cv. Lara, 10 ou 20% de sacarose foram necessários para a germinação *in vitro*.

A Fig. 2.3B apresenta os resultados obtidos no ensaio de germinação de grãos de pólen das cultivares de mamoneira submetidas a diferentes combinações de sacarose com  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico. Para a cv. IAC 80, concentrações de sacarose acima de 5% quando combinadas com  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de boro, provocaram uma redução gradativa no poder germinativo. O maior percentual de germinação de polens desta cultivar foi observado no tratamento com 5% de sacarose (85%).

Os resultados estatísticos para a cv. AL Guarany 2002 mostraram que todas as concentrações de sacarose combinadas a  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico foram satisfatórias para o desenvolvimento do tubo polínico, no entanto a concentração de 5%, assim como na cv. IAC 80, provocou um maior percentual de germinação e emissão de tubo polínico (60%) (Fig. 2.3B).

Para a cv. Lara observou-se que um incremento gradativo da quantidade do carboidrato aumenta a quantidade de grãos de pólen germinados, sendo o melhor tratamento aquele com 20% de sacarose onde germinaram 54% dos grãos de pólen, semelhante a concentração de  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de boro. Resultados semelhantes foram observados em grãos de pólen do porta-enxerto M9 de macieira apresentando aumento gradativo na germinação até a concentração de 20% de sacarose

(DANTAS et al., 2005). Esses resultados foram também similares àqueles observados por Raseira e Raseira (1996) em grãos de pólen de araçazeiro.

A Fig. 2.3C apresenta os resultados obtidos no ensaio de germinação de grãos de pólen das cultivares de mamoneira submetidas a combinações de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico e diferentes níveis de sacarose.

Os resultados obtidos com as concentrações de 4 e  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de boro estão de acordo com as informações de Brewbaker e Kwack (1963), onde sugerem que o boro é um elemento essencial para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro*. No entanto a concentração de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de boro não favoreceu o desenvolvimento do tubo polínico, exceto para a cv. IAC 80 combinada com 10% de sacarose.

O meio sem sacarose com  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de boro inibiu a germinação de grãos de pólen de mamoneira nas três cultivares analisadas, em média somente 10% de polens emitiram tubo polínico (Fig. 2.3C).

A cv. IAC 80 apresentou 69% de germinação quando utilizado 5% de sacarose, aumentando para 10% de sacarose mostrou um alto percentual de germinação (87%), porém com o aumento da concentração de carboidrato para 20% observou-se uma drástica redução para 9% de germinação *in vitro* (Fig. 2.3C).

De acordo com a Fig. 2.3C, é possível verificar que para os polens das cvs. AL Guarany 2002 e Lara a concentração de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de boro teve um efeito inibidor mais pronunciado do que para a cv. IAC 80. Na cv. AL Guarany houve um efeito linear crescente com o aumento da concentração de sacarose alcançando 38% de germinação quando utilizado 20% de sacarose. Para a cv. Lara, resultados inibitórios foram marcantes onde todas as concentrações de sacarose apresentaram em média 10% de emissão de tubos polínicos.

Dados obtidos da combinação de sacarose e concentrações de 4 e  $8 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido bórico corroboram com resultados obtidos no terceiro ensaio deste trabalho, onde foram utilizadas somente concentrações de sacarose sem a adição de boro, porém observou-se que o boro aumenta o número de tubos polínicos emitidos. Segundo Almeida et al. (1987), a adição de ácido bórico, de um modo geral, aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico. O mesmo não pode ser verificado na concentração de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de boro onde não houve o favorecimento de emissão e crescimento de tubo polínico.

## 2.4 CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado, são permitidas as seguintes conclusões:

- Valor de pH do meio acima de 6,0 diminui a quantidade de grãos de pólen germinados para as cultivares IAC 80 e AL Guarany 2002;
- Dentre as temperaturas estudadas a de 20 °C é a mais adequada, para a germinação e crescimento no tubo polínico;
- A sacarose em concentrações de 5 e 10% podem ser empregadas na germinação *in vitro* de grãos de pólen de mamoneira cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002. Para a cv. Lara concentração de 20% apresenta melhor resultado;
- Para todas as cultivares, a melhor concentração de ácido bórico foi 4 mgL<sup>-1</sup>, combinada com 10% de sacarose para a cv. IAC 80, 5% de sacarose para a cv. AL-Guarany e 10% para a cv. Lara.

### **CAPÍTULO 3**

#### **CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) À BAIXA TEMPERATURA**

## RESUMO

Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas e na conservação genética, é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade. O armazenamento do pólen consiste em conservar material para futura utilização e também proporcionar condições ótimas de forma que retenha seu poder germinativo, vigor e integridade genética originais. O objetivo desse trabalho foi desenvolver técnicas adequadas para o armazenamento de grãos de pólen de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) à baixas temperaturas. Para tanto, botões florais das cultivares IAC 80 e AL Guarany 2002 foram coletados, colocados em recipientes plásticos e mantidos em 4 ambientes: nitrogênio líquido (-196 °C); ultrafreezer (-72 °C); freezer (-18 °C) e refrigerador (4 °C) durante um período de 60 dias. A avaliação da viabilidade dos polens armazenados foi realizada de semana em semana até completar cinco semanas e depois na oitava semana e constou de teste de germinação *in vitro*. Meio de cultura contendo 1g de ágar, 10g de sacarose, 100mL de água destilada, 4 mgL<sup>-1</sup> de ácido bórico e pH 6 foi preparado, após depositado em placas de lâmina escavada, onde o pólen foi distribuído sobre a superfície do meio, as placas foram colocadas em câmara úmida e levadas para incubação a 20 °C. Em delineamento inteiramente casualizado, foram analisados 100 grãos de pólen em cada uma das 6 repetições de cada tratamento. Houve diferença significativa entre os tratamentos e para a interação na quinta semana de observação ( $p < 0,05$ ). Demais interações foram altamente significativas em todas as épocas de observação ( $p < 0,01$ ). O armazenamento em 4 e -18 °C não foi eficiente, o percentual de grãos de pólen germinados cai rapidamente causando inviabilidade na quinta semana. À -72 °C os polens da cv. IAC 80 permaneceram viáveis até a quinta semana e a cv. AL Guarany 2002 apresentou viabilidade até a oitava semana. Armazenar em -196 °C foi muito eficiente até a quinta semana, permitindo a manutenção de um alto percentual de germinação *in vitro* durante este período. Portanto, com o passar do tempo observou-se redução significativa da viabilidade dos grãos de pólen armazenados e a decisão do método empregado dependerá do objetivo do armazenamento, bem como da característica da espécie trabalhada.

**Palavras-chave:** armazenamento de pólen; viabilidade polínica; germinação *in vitro*; criopreservação; mamona.

## ABSTRACT

To assure the success in the controlled hybridizations and in the genetic conservation, it is important that the pollen used has good viability. The storage of the pollen consists of conserving material for utilization and also to provide great conditions to keep his power germinated, energy and original genetic integrity. The objective of this work was to develop appropriate techniques for the storage castor beans cultivars pollen grains (*Ricinus communis* L.). For the study, floral buttons of the cultivars IAC 80 and AL Guarany 2002 were collected, put in plastic containers and maintained in four places: liquid nitrogen (-196 °C); ultrafreezer (-72 °C); freezer (-18 °C) and refrigerator (4 °C) during a period of eight week. The evaluation of the viability of the stored pollens was realized week to week until complete five weeks and after to the eight week and it consisted of *in vitro* germination test. Culture medium containing 1g of agar, 10g of sucrose, 100mL of distilled water, 4 mgL<sup>-1</sup> of boric acid and pH 6 was prepared, after having deposited in excavated plates, where the pollen was distributed on the surface of the medium, the plates were put in humid camera and taken for incubation to 20 °C. In random delineation, a hundred pollen grains were analyzed in each one of the six repetitions of each treatment. There was significant difference among the treatments and for the interaction in the fifth week of observation ( $p<0,05$ ). Other interactions were highly significant in all of the observation times ( $p<0,01$ ). The storage in 4 and -18 °C was not efficient, the percentage of pollen grains germinated falls quickly causing total unviability in the fifth week. In -72 °C the pollens of the cultivar IAC 80 stayed viable until the fourth week and the cultivar AL Guarany 2002 presented viability to eighth week. To store in -196 °C was very efficient until the fifth week, allowing the maintenance of a high percentage of *in vitro* germination during this period. Therefore, in the course of time was observed significant reduction of the viability of the pollen grains stored and the decision of the method to be used will depend on the objective the storage, as well of the characteristic of the worked species.

**Key words:** pollen storage; pollen viability; *in vitro* germination; cryopreservation; castor bean.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Para assegurar o sucesso nas hibridações controladas, é importante que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade. Esta pode ser determinada através de um grande número de técnicas. Sendo a mais utilizada a germinação *in vitro* (SOARES et al., 2008), chamado de método direto (DAFNI, 1992; KEARNS e INOUE, 1993; OLIVEIRA et al., 2001; NAVA, 2007). Esse método consiste em germinar uma pequena amostra em meio apropriado e observar em microscópio, depois de determinado período, o número de grãos que produzem tubo polínico (GALLETTA, 1983).

O armazenamento de pólen para uso nos programas de melhoramento é requerido por várias situações como não coincidência de floração, intercâmbio com outros países ou outras regiões do país ou apenas para ser utilizado posteriormente. Neste caso, é recomendável testar a viabilidade do mesmo, antes, durante e após a sua utilização (EINHARDT et al., 2006). Segundo Dafni (1992), a avaliação da viabilidade dos grãos de pólen é o primeiro passo no entendimento das chances que ele tem de germinar no estigma da flor, sendo esse um estágio crucial rumo à fertilização.

O armazenamento do pólen, com o objetivo de conservação genética, consiste em conservar material para futura utilização e também proporcionar ao material condições ótimas de forma que retenha seu poder germinativo, vigor e integridade genética originais. O armazenamento de pólen é um procedimento válido para a conservação a curto, médio e longo prazo (WANG, 1975).

Segundo Souza et al. (2002), a viabilidade e a germinabilidade polínica constituem fatores importantes para o melhoramento de plantas, pois em algumas espécies cada grão de pólen leva consigo os materiais genéticos resultantes da recombinação, fazendo com que estas plantas transmitam à próxima geração



genótipos amplamente diversificados, tamanha a probabilidade de diferentes combinações entre os alelos que ocorre na meiose.

A mamoneira, conhecida cientificamente como *Ricinus communis* L., é uma xerófila caracterizada por ser tolerante a escassez de água e exigente em calor e luminosidade. Reconhecido como o petróleo verde, o óleo de mamona pode ser utilizado como fonte energética renovável, em substituição ao óleo diesel e, com base em pesquisas de desenvolvimento de novas tecnologias, o óleo é considerado, também, matéria-prima do futuro, já que a mamoneira é uma planta adaptada ao solo brasileiro podendo ser cultivada em qualquer parte do País (CHIERICE e CLARO NETO, 2001).

Apesar da importância do óleo da mamona como produto estratégico, há carência de informações fisiológicas, metabólicas e bioquímicas sobre a mamoneira. Tendo em vista a diversidade da utilização do material vegetal desta oleaginosa, objetivou-se com este trabalho avaliar a melhor técnica para o armazenamento à baixa temperatura de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.), visando sua utilização em programas de melhoramento.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, no ano de 2009 durante o período de floração, março e abril, das cultivares IAC 80 e AL Guarany 2002. Essas cultivares estão localizadas no campo experimental da Embrapa Clima Temperado - CPACT, no município de Pelotas – RS, na latitude 31°41'S e longitude 52°21'W e de altitude 60m.

Para a realização do trabalho, foram selecionadas dez inflorescências de cada cultivar, coletadas aleatoriamente, em todas as partes da planta, no período da manhã, próximo às 8 horas, levadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese e retirada dos grãos de pólen (Fig. 3.1A). Estes foram colocados em tubo tipo *ependorf* e criotubos para armazenamento.

Os tratamentos de conservação utilizados neste experimento foram nitrogênio líquido (-196 °C); ultrafreezer (-72 °C); freezer (-18 °C) e refrigerador (4 °C) durante um período de 8 semanas. A avaliação da viabilidade dos polens armazenados através de teste de germinação *in vitro* foi realizada semana a semana até completar 5 semanas e depois a 8ª semana.

A avaliação da viabilidade do pólen pelo teste de germinação *in vitro* foi realizado utilizando meio de cultura constituído de 10g de açúcar cristal, 1g de ágar para 100ml de água destilada e 4 mgL<sup>-1</sup> de ácido bórico, com pH ajustado para 6, os quais foram aquecidos para total diluição do ágar. Ainda quente, o meio foi distribuído em lâmina escavada de Kline com doze poros. 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 B.O.D com temperatura controlada de 20 °C.

Após 24h, realizou-se a contagem de grãos de pólen germinados em microscópio óptico com aumento de 40x, onde segundo Pasqual et al. (1982), foram considerados como germinados aqueles que apresentassem tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen (Fig. 3.1B), num total de 100 polens/cavidade da placa. Cada cavidade foi considerada uma repetição e utilizada seis repetições por tratamento.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x4 (2 cultivares x 4 ambientes de armazenamento) para cada época de avaliação (7 tempos de armazenamento). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan ( $\alpha = 1\%$ ), com auxílio do programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Os dados, expressos em porcentagem, foram transformados segundo arco seno de  $(X/100)^{1/2}$ , onde X representa o valor percentual obtido para cada variável. As análises foram realizadas procurando-se verificar o efeito das diferentes técnicas de armazenamento dentro de cada cultivar estudada.

Foi feita uma análise estatística para cada ambiente de armazenamento, para cada cultivar e comparada com o pólen fresco de acordo com Pio et al. (2007). O tratamento considerado como testemunha (pólen fresco) não foi submetido ao armazenamento sendo avaliado logo após a antese.

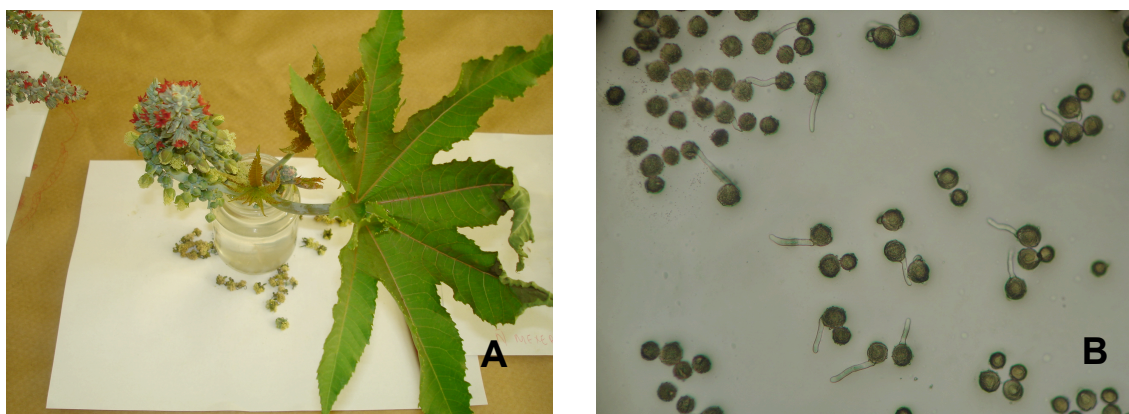


Figura 3.1 - Imagens de etapas da metodologia. A. Inflorescências de mamoneira coletadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese; e B. Polens apresentando tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. Pelotas. UFPel, 2009.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tomando por base a análise de variação realizada, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade para a interação cultivar x ambiente na quinta semana de observação. Demais interações foram altamente significativas ao nível de 1% de probabilidade em todas as épocas de observação, conforme se observa na tab. 3.1. Esses resultados confirmam que a porcentagem de germinação é dependente de alguns fatores, principalmente aqueles relacionados ao armazenamento.

Conforme tab. 3.1, os coeficientes de variação obtidos para os períodos avaliados foram baixos, levando a crer que os fatores externos tenham exercido pouca influência sobre os ambientes de armazenamento. Evidencia-se que somente na 8ª semana de armazenamento o coeficiente de variação foi relativamente alto devido ao aparecimento de grãos de pólen germinados da cv. AL Guarany 2002 conservados em ultrafreezer, enquanto os outros tratamentos a frio causaram a inviabilidade na mesma época analisada.

Nas tabs. 3.2 e 3.3 são apresentados os valores médios de germinação de grãos de pólen obtidos para as cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002, respectivamente, de acordo com os diferentes ambientes de armazenamento nas referidas épocas de avaliação.

Tabela 3.1 - Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas a tratamentos de baixas temperaturas em diferentes épocas de avaliação. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio			
		Pólen Fresco	GL	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana
Cultivar	1	116,5*	1	1259,7**	16,5 ns
Ambiente	-	-	3	499,2**	140,5**
Cultivar X Ambiente	-	-	3	97,6**	285,3**
Resíduo	10	12,9	40	19,4	10,9
C.V. (%)		8,84		11,92	11,89
Média Geral (%)		40,73		36,94	27,81

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio			
		3 <sup>a</sup> semana	4 <sup>a</sup> semana	5 <sup>a</sup> semana	8 <sup>a</sup> semana
Cultivar	1	22,3 ns	45,1 ns	165,9**	346,7**
Ambiente	3	575,0**	627,1**	1811,5**	194,8**
Cultivar X Ambiente	3	164,2**	395,4**	37,0*	198,7**
Resíduo	40	11,8	16,6	9,6	11,5
C.V. (%)		11,93	14,65	14,00	90,50
Média Geral (%)		28,85	27,87	22,17	3,75

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Conforme resultados descritos nas tabs. 3.2 e 3.3, o armazenamento do pólen de ambas as cultivares em refrigerador (4 °C) não foi eficiente, pois foi observada uma redução drástica na viabilidade polínica. Estes resultados discordam dos apresentados por Gomez et al. (2000) e Siregar e Sweet (2000) que mantiveram o pólen de amendoeira e *Pinus*, respectivamente, armazenado em refrigerador por vários meses, embora com um decréscimo de viabilidade em função do tempo de armazenamento.

No entanto, os grãos de pólen da cv. IAC 80 mantiveram um percentual de germinação maior que os polens da cv. AL Guarany 2002 durante o período do experimento, evidenciando que os grãos de pólen da cv. IAC 80 foram menos sensíveis aos danos causados pelo ambiente refrigerador (tab. 3.2).

Tabela 3.2 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar IAC 80, submetidos a diferentes temperaturas de armazenamento. Pelotas. UFPel, 2009.

TRATAMENTO	Pólen Fresco	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana	4 <sup>a</sup> semana	5 <sup>a</sup> semana	8 <sup>a</sup> semana
Refrigerador (4 °C)	<b>47,99</b>	31,99 b	25,48 a	15,36 b	13,72 b	0,94 c	0,00 a
Freezer (-18 °C)	<b>47,99</b>	54,40 a	23,84 a	24,92 a	14,99 b	7,93 b	0,17 a
Ultrafreezer (-72 °C)	<b>47,99</b>	44,81 a	25,57 a	30,94 a	41,62 a	24,77 a	0,02 a
Nitrogênio Líquido (-196 °C)	<b>47,99</b>	53,01 a	10,58 b	27,02 a	15,17 b	24,21 a	0,02 a

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

Tabela 3.3 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira (*Ricinus communis* L.) cultivar AL Guarany 2002, submetidos a diferentes temperaturas de armazenamento. Pelotas. UFPel, 2009.

TRATAMENTO	Pólen Fresco	1 <sup>a</sup> semana	2 <sup>a</sup> semana	3 <sup>a</sup> semana	4 <sup>a</sup> semana	5 <sup>a</sup> semana	8 <sup>a</sup> semana
Refrigerador (4 °C)	<b>37,25</b>	20,6 bc	10,58 b	8,22 c	11,39 c	1,62 d	0,00 c
Freezer (-18 °C)	<b>37,25</b>	30,35 b	29,64 a	18,29 b	15,26 c	12,62 c	0,05 c
Ultrafreezer (-72 °C)	<b>37,25</b>	19,03 c	25,70 a	24,62 b	27,35 b	25,29 b	9,23 a
Nitrogênio Líquido (-196 °C)	<b>37,25</b>	43,04 a	26,78 a	42,96 a	43,28 a	37,56 a	1,37 b

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

Os grãos de pólen armazenados em freezer apresentaram maior porcentagem de germinação que aqueles armazenados em refrigerador durante a execução do experimento, porém na quinta semana de conservação apresentaram 7,93% de viabilidade para a cv. IAC 80 e 12,62% para a cv. AL Guarany 2002 (tabs. 3.2 e 3.3). Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2001) que enfatizam a maior longevidade do pólen congelado de pessegueiro.

Em geral, no que diz respeito à viabilidade do pólen em cada época de armazenamento, nota-se que o pólen armazenado em refrigerador perdeu sua viabilidade muito rapidamente e o pólen armazenado em freezer permaneceu viável pelo mesmo período de tempo, porém com um percentual mais elevado, mas ainda assim foi possível verificar que houve uma redução da viabilidade com o tempo de

conservação. No entanto, na 8ª semana de armazenamento houve inviabilidade total dos grãos de pólen armazenados tanto a 4 quanto a -18 °C (tabs. 3.2 e 3.3). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho com conservação de pólen de mamoeiro (DAMASCENO JÚNIOR et al., 2008), onde os ambientes geladeira e freezer não apresentaram diferenças significativas para os grãos de pólen armazenados no botão floral, e com o passar do tempo foi observada redução significativa da viabilidade dos grãos de pólen armazenados nestes ambientes.

A viabilidade dos grãos de pólen estocados em ultrafreezer (-80 °C) decresceram lentamente com o passar do tempo. Para a cv. IAC 80, o percentual de tubos polínicos germinados permaneceu alto até a quarta semana, decaindo após a quinta semana. Já para a cv. AL Guarany 2002 também houve um decréscimo gradativo com o passar do tempo, porém na 8ª semana de armazenamento foi observado 9,23% de grãos de pólen germinados. O mesmo pode ser visto por Vargas (2009), onde entre os tratamentos à baixa temperatura testados aquele que manteve melhor índice de germinação de pólen ocorreu quando foi utilizado o ultrafreezer, podendo desta forma ser considerado o mais eficiente entre os sistemas testados pelo autor.

Esta maior eficiência na conservação à ultra baixas temperaturas pode estar relacionada à maior velocidade de congelamento, que causa menores danos à célula devido à menor desidratação e rompimento das membranas (DUMONT et al., 2004; FELLOWS, 2006).

Segundo Almeida et al. (2002), a técnica da crioconservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C), proporciona 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. Porém, para as cultivares de mamoneira estudadas nesse trabalho, a técnica de criopreservação foi muito eficiente até a quinta semana de estudo, permitindo a manutenção do poder germinativo durante este período, principalmente para a cv. AL Guarany 2002.

Resultados contraditórios foram apresentados em trabalhos com anonas, onde a utilização do nitrogênio líquido não foi eficiente pois seu uso, quando comparado à geladeira, não implica aumento da longevidade do pólen das anonas estudadas (BETTIOL NETO et al., 2009).

No entanto nenhum dos ambientes de conservação estudados proporcionou mais de 8 semanas de conservação, evidenciando que os grãos de pólen de mamoneira são muito sensíveis a mudanças de temperaturas. No metabolismo do grão de pólen, o movimento molecular a baixas temperaturas é super reduzido, não havendo fase líquida na célula. A grande dificuldade do processo de armazenamento 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). A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar-se, e a formação dos cristais de gelo (SANTOS, 2001).

Outra explicação seria que as alterações fisiológicas ocasionalmente ocorridas durante o armazenamento do pólen podem concorrer para o decréscimo da viabilidade. Alteração na velocidade de respiração e conversão de açúcares e ácidos orgânicos, acúmulo de produtos metabólicos secundários, alteração dos lipídeos da exina do pólen são exemplos de tais transformações (STANLEY e LINSKENS, 1974).

As diferenças observadas quanto à germinabilidade do pólen dentro do mesmo ambiente mas em tempos diferentes podem ter ocorrido devido as amostragens individualizadas, o mesmo pode ser explicado em Oliveira et al. (2001), que enfatizam que a diminuição na porcentagem de polens viáveis pode estar relacionada a vários fatores, tais como as condições de armazenamento, o recipiente usado no acondicionamento do pólen e a manipulação dos recipientes.

De acordo com Baéz et al. (2002), Gibernau et al. (2003) e Khan e Perveen (2006), em grãos de pólen armazenados não se observa aumento de viabilidade polínica com o passar do período de armazenamento, mas sim decréscimo. Portanto, os resultados mencionados estão de acordo com a literatura, ou seja, com o passar do tempo observou-se redução significativa da viabilidade dos grãos de pólen armazenados e a decisão com respeito ao método a ser empregado no armazenamento dependerá do objetivo e do tempo exigido para tais, a longo ou a médio prazo (PIO, 2003).



### **3.4 CONCLUSÃO**

Nas condições em que o trabalho foi realizado, é permitido concluir que a utilização de ultra baixas temperaturas permite a manutenção da viabilidade de grãos de pólen de mamoneira cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002 até a quinta semana de conservação.

## **CAPÍTULO 4**

### **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE DESCONGELAMENTO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONEIRA SUBMETIDOS A DIFERENTES AMBIENTES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO EM FRIO**

## RESUMO

O armazenamento de pólen é necessário quando se pretende realizar o cruzamento em períodos distintos de floração, transporte de material biológico e preservação da variabilidade. Para isso, fatores como umidade, temperatura de armazenamento e tempo de resfriamento devem ser controlados. O objetivo foi avaliar o efeito do tempo de descongelamento de grãos de pólen de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas a diferentes ambientes à baixa temperatura e períodos de armazenamento. Para isto, botões florais das cultivares IAC 80 e AL Guarany 2002 foram coletados, colocados em recipientes plásticos e mantidos em 4 ambientes, geladeira (4 °C), freezer (-18 °C), ultrafreezer (-72 °C) e nitrogênio líquido (-196 °C) por 60 dias. Para avaliar a viabilidade foi realizada a germinação *in vitro* em três contagens: 15 dias, 30 dias e 60 dias, onde foram analisados grãos de pólen germinados no intervalo de hora em hora até completar 6 horas e após 24 horas. Meio de cultura contendo 0,8% de ágar, 10% de sacarose e 100mL de água destilada, pH 6, foi preparado, após depositado em placas de lâmina escavada, onde o pólen foi distribuído sobre a superfície do meio, as placas foram colocadas em câmara úmida e levadas para incubação a 20 °C. Em delineamento inteiramente casualizado, foram analisados 100 grãos de pólen em cada uma das 6 repetições de cada tratamento. Para a cv. IAC 80 tanto em 15 quanto em 30 dias de armazenamento em ultrafreezer obteve-se em torno de 50% de grãos de pólen germinados necessitando de 5 e 6h de incubação para a retomada do metabolismo, respectivamente. Para a cv. AL Guarany 2002, o ultrafreezer apresentou maior uniformidade na técnica, porém a melhor germinação foi alcançada na criopreservação. Aos 60 dias houve uma drástica redução na viabilidade em todos os ambientes. Dependendo da temperatura utilizada para conservação de material biológico há necessidade de um tempo maior de resfriamento para ocorrer a retomada das atividades fisiológicas.

**Palavras-chave:** *Ricinus communis* L.; germinação *in vitro*; baixa temperatura; conservação de pólen; tubo polínico.

## ABSTRACT

The pollen storage is necessary to accomplish the crossing in different periods from floration, biological transport material and preservation of the variability. For that, factors as humidity, storage temperature and time of defreezing should be controlled. The objective of this work was to evaluate the effect of the defreezing time of castor bean cultivars pollen grains (*Ricinus communis* L.) submitted to different places and periods of storage. For this, floral buttons of the cultivates IAC 80 and AL Guarany 2002 were collected, put in plastic containers and maintained in four places, refrigerator (4 °C), freezer (-18 °C), ultrafreezer (-72 °C) and liquid nitrogen (-196 °C) for 60 days. For to evaluate the viability was accomplished *in vitro* germination in three countings: 15, 30 and 60 days, wich were analyzed pollens grains germinated hour by hour interval to complete six hours and after twenty-four hours. Culture medium containing 0,8% of agar, 10% of sucrose and 100mL of distilled water, pH 6, was prepared, after having deposited in excavated plates, where the pollen was distributed on the surface of the medium, the plates were put in humid camera and taken for incubation to 20 °C. In random delineation, a hundred pollen grains were analyzed in each one of the six repetitions of each treatment. For the cultivar IAC 80 fifteen or thirty days of storage in the ultrafreezer presents around 50% of germination needing five and six hour of incubation for the retaking of the metabolism, respectively. For the cultivar AL Guarany 2002, the ultrafreezer presented larger uniformity in the technique, however the best germination was reached in the criopreservation. When te experiment gets in the sixty days there was a drastic reduction in the viability in all the places. Depending on the temperature used for conservation of biological material it needs a larger time of defreezing to happen the retaking of the physiologic activities.

**Key words:** *Ricinus communis* L.; *in vitro* germination; low temperature; pollen conservation; pollen tubes.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil, pela sua imensa extensão territorial associada às excelentes condições edafoclimáticas, é considerado um paraíso para a produção de biomassa para fins alimentares, químicos e energéticos. Devido a essas características, encontra-se em destaque o cultivo de mamoneira (*Ricinus communis* L.), uma oleaginosa considerada de grande importância socioeconômica, pois seu óleo, extraído pela prensagem das sementes, contém cerca de 90% de ácido graxo ricinoléico com uma ampla gama de utilização industrial (SAVY FILHO, 1999).

O óleo de mamona possui utilização direta na confecção de cosméticos e produtos de toalete, na elaboração de próteses, com destaque em cirurgias ósseas, de mama e de próstata e na fabricação de tintas, vernizes, cosméticos e sabão (COELHO, 1979; SAVY FILHO, 1999; BDMG, 2000). Ele tem 30% a mais de lubricidade que os outros óleos, podendo reduzir a emissão de diversos gases causadores do efeito estufa, tratando-se assim de um óleo especial e com mercado garantido no mundo moderno (BELTRÃO, 2003). Portanto, a conservação do germoplasma e o melhoramento genético desta espécie podem proporcionar uma melhor exploração destes recursos.

O armazenamento de pólen é um processo imprescindível quando se pretende realizar o cruzamento de espécies com períodos distintos de floração, transporte de material biológico e/ou preservação da variabilidade genética (GOMES et al., 2003). Para que o mesmo tenha sucesso, fatores como a sua umidade, temperatura de armazenamento e tempo de descongelamento devem ser controlados. Estes estão diretamente relacionados ao metabolismo do pólen, à contaminação por microorganismos e a reativação dos processos metabólicos pós-

conservação. A redução dessas atividades tende a aumentar a longevidade do pólen armazenado (SOUSA, 1990).

O método de armazenamento a longo prazo mais promissor descrito na literatura é em nitrogênio líquido (-196 °C), onde metabolismo do pólen reduz-se a praticamente zero, permitindo, teoricamente, a manutenção de sua viabilidade por um período indefinido (KARTHA, 1985). Os outros métodos de conservação somente adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico, de acordo com o material e a espécie em questão.

Com a finalidade de identificar o intervalo de tempo necessário para a reativação dos processos metabólicos após a conservação de material biológico, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tempo de descongelamento de grãos de pólen de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas a diferentes ambientes à baixa temperatura e períodos de armazenamento.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética do Departamento de Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas, UFPel. Foram coletadas inflorescências de duas variedades de mamoneira: IAC 80 e AL Guarany 2002, da Embrapa Clima Temperado - CPACT, localizado no município de Pelotas-RS, na latitude 31°41'S e longitude 52°21'W e de altitude 60m.

As amostras das duas variedades de mamoneira foram coletadas de inflorescências, no período da manhã entre 8 e 9h em abril de 2009, levadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese e retirada dos grãos de pólen (Fig. 4.1A). Estes foram acondicionados em tubo tipo *eppendorf* e criotubos para armazenamento, sendo retirada uma amostra para análise de viabilidade inicial onde observou-se 48 e 37% de germinação *in vitro* para as cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002, respectivamente.

Os tratamentos de conservação utilizados neste experimento foram nitrogênio líquido (-196 °C); ultrafreezer (-72 °C); freezer (-18 °C) e refrigerador (4 °C) durante 15, 30 e 60 dias. A avaliação do intervalo de tempo de descongelamento necessário para a reativação dos processos metabólicos consistiu na análise da viabilidade polínica pelo teste de germinação *in vitro* de grãos de pólen armazenados (Fig. 4.1B).

A avaliação pelo teste de germinação *in vitro* foi realizada utilizando meio de cultura constituído de 10g de açúcar cristal e 1g de ágar para 100mL de água destilada com pH ajustado para 6, onde foram aquecidos para total diluição do ágar. Ainda quente, o meio foi distribuído em placas de lâmina escavada de Kline (Fig. 4.1C) com doze poros. 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) (Fig. 4.1D), e levadas para incubação em câmara de germinação tipo B.O.D com temperatura controlada de 20 °C.

Nos tempos de 15, 30 e 60 dias foram realizadas contagens de grãos de pólen germinados no intervalo de hora em hora até completar 6 horas e após 24 horas nos diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas. Segundo Pasqual et al. (1982), foram considerados como germinados os polens que apresentaram tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen (Fig. 4.1E), foram analisados um total de 100 polens/cavidade da placa. Cada cavidade foi considerada uma repetição e utilizada seis repetições por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas utilizando o teste de Duncan ( $\alpha = 1\%$ ), com auxílio do programa estatístico SANEST (ZONTA e MACHADO, 1984). Os dados, expressos em porcentagem, foram transformados segundo arco seno de  $(X/100)^{1/2}$ , onde X representa o valor percentual obtido para cada variável. Como forma de desdobrar os efeitos da interação dos fatores efetuou-se a análise de regressão polinomial, sendo representados na forma de gráficos individuais para cada variedade de mamoneira e ambiente de armazenamento à baixas temperaturas.



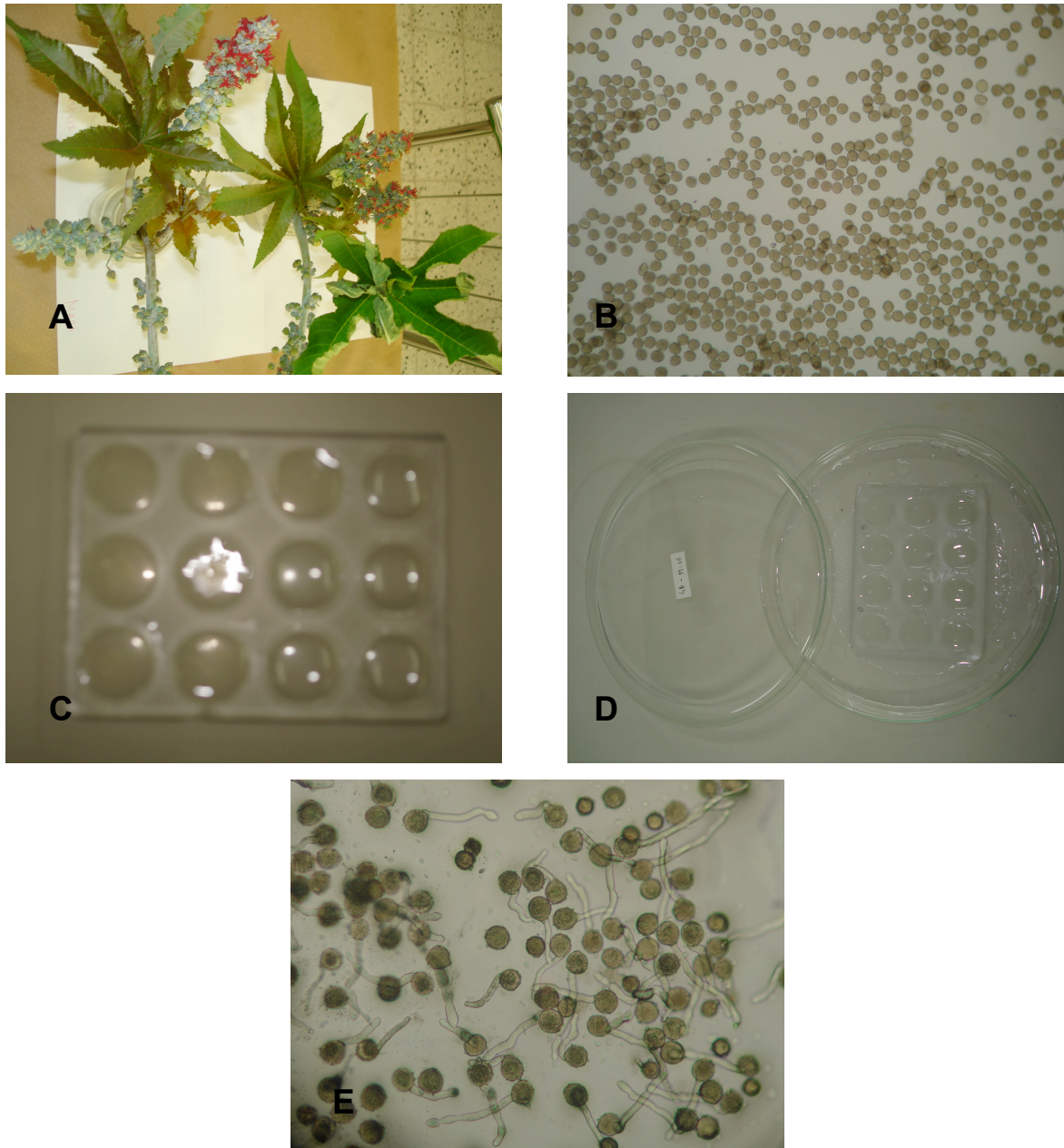


Figura 4.1 - Imagens das diferentes etapas da metodologia. A. Inflorescências de mamoneira coletadas e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente até a antese; B. Teste de germinação *in vitro* de grãos de pólen; C. Placas de lâmina escavada de Kline com doze poros; D. Câmara úmida e E. Polens apresentando tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen. Pelotas. UFPel, 2009.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o resumo da análise de variância para as cvs. IAC 80 e AL Guarany 2002 (tabs 4.1 e 4.2, respectivamente) houve diferença estatística altamente significativa na interação dos fatores estudados ( $p < 0,01$ ), nos experimentos realizados aos 15 e 30 dias. Já para o experimento realizado aos 60 dias de conservação, houve diferença estatística significativa somente para o fator ambiente de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

Com base em estudos realizados em diferentes espécies, evidencia-se que dependendo do ambiente e da temperatura utilizada para conservação de pólen há necessidade de um tempo maior de descongelamento para ocorrer a retomada das atividades metabólicas, ou seja, cada espécie e a condição em que ela está submetida determina o tempo de incubação necessário para que haja germinação *in vitro* (SANTOS, 2000).

Para o araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine), uma mirtácea frutífera nativa do sul do Brasil, há diferenças no que se refere à condição ideal para avaliar a germinação *in vitro* de pólen. Verificou-se que houve períodos de incubação de 4 a 6 horas a 25 °C (RASEIRA e RASEIRA, 1996), bem como relato de que o tubo polínico desta mesma espécie apareceu 13 horas após a inoculação no meio de cultura (TEAOTIA et al., 1970). Um período mais prolongado também foi utilizado por Hirano e Nakasone (1969), que avaliaram a germinação do pólen de diferentes espécies do gênero *Psidium*, aproximadamente 12 horas após a inoculação no meio.

Tabela 4.1 - Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de mamoneira cv. IAC 80 submetida a diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas e horas de descongelamento. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio Germinação (%)		
		15 dias	30 dias	60 dias
Ambiente	3	13525,472**	8579,176**	0,176*
Horas	6	587,684**	1180,825**	0,575 ns
Ambiente x Horas	18	160,372**	187,801**	0,059 ns
Resíduo	140	12,120	10,134	0,049
C.V. (%)		15,473	12,670	20,063
Média Geral (%)		22,500	25,125	1,104

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

Tabela 4.2 - Análise de variância para a variável grãos de pólen germinados de mamoneira cv. AL Guarany 2002 submetida a diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas e horas de descongelamento. Pelotas. UFPel, 2009.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio Germinação (%)		
		15 dias	30 dias	60 dias
Ambiente	3	11335,444**	13352,239**	0,118*
Horas	6	982,636**	1414,117**	0,044 ns
Ambiente x Horas	18	244,529**	171,160**	0,030 ns
Resíduo	140	12,899	13,182	0,043
C.V. (%)		16,931	14,900	19,224
Média Geral (%)		21,213	24,366	1,084

\* e \*\* significativos aos níveis de 5 e 1% de probabilidade respectivamente.

A Fig. 4.2A representa o número de grãos de pólen germinados da cv. IAC 80 em diferentes horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação em refrigerador, sendo possível notar que o ambiente refrigerador em relação ao número de grãos de pólen germinados não foi significativa para os dois períodos de conservação. É constatada uma porcentagem inferior a 3% com o aumento do tempo de descongelamento, porém houve um aumento crescente no percentual de germinação até 3h de reativação do metabolismo (3%) aos 15 dias de experimento e, aos 30 dias de experimento, o número de grãos de pólen germinados aumentou (2,45%) até 6h de descongelamento e decaiu após esse período. Nesse caso já é percebido um atraso na reativação do metabolismo do pólen depois de 30 dias de conservação, mesmo com um pequeno número de grãos de pólen germinados. Estes resultados não concordam com trabalhos de conservação de amendoieira

(GOMEZ et al., 2000) e *Pinus radiata* (SIREGAR e SWEET, 2000) que mantiveram o pólen armazenado em refrigerador por vários meses, embora com um decréscimo de viabilidade em função do tempo de armazenamento.

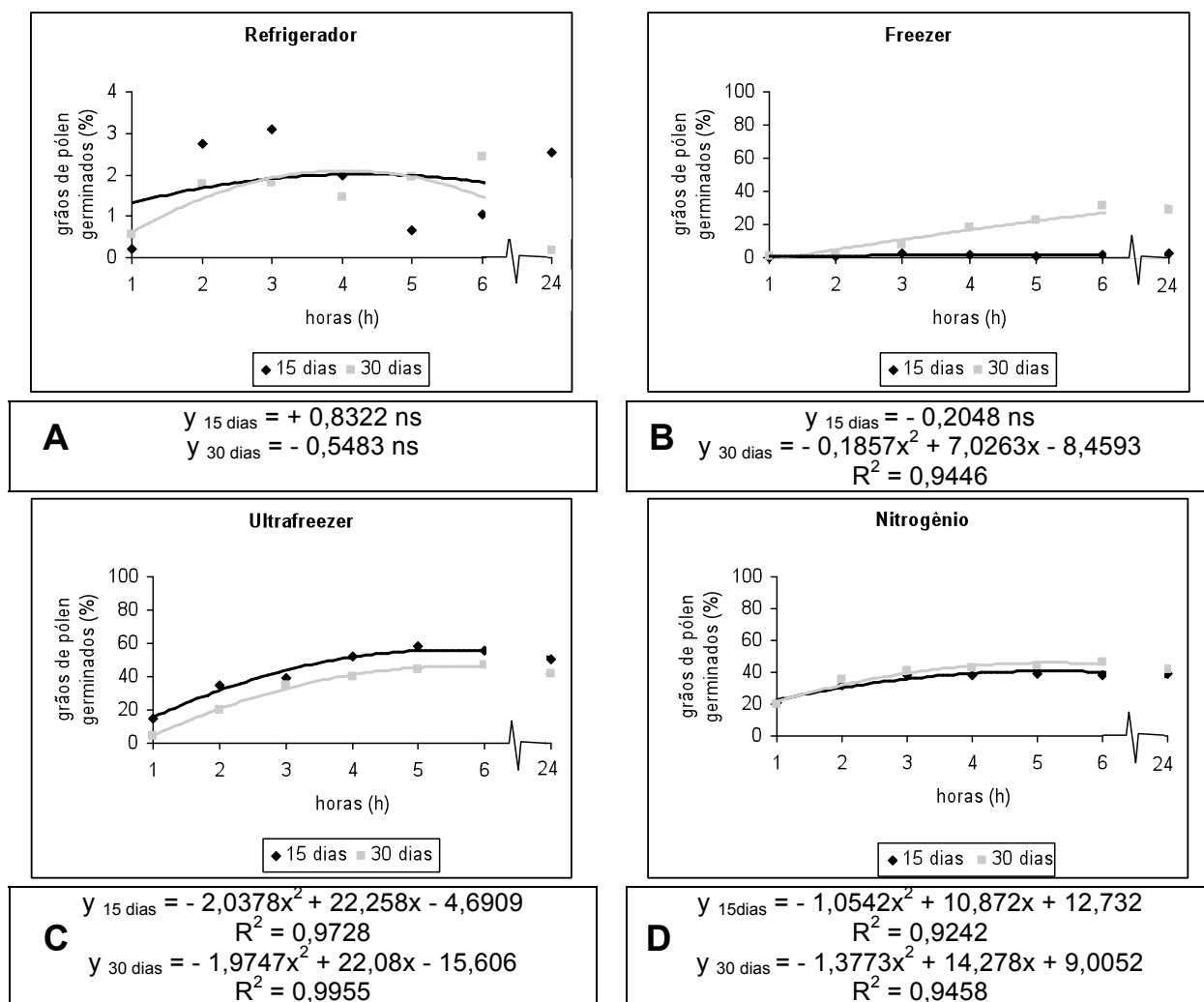


Figura 4.2 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira da cv. IAC 80 submetidas a horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação e diferentes ambientes de armazenamento a baixas temperaturas: A. Refrigerador; B. Freezer; C. Ultrafreezer e D. Nitrogênio Líquido. Pelotas. UFPel, 2009.

Para a mesma cultivar foi observado que a regressão do ambiente freezer em relação ao número de grãos de pólen germinados não foi significativa aos 15 dias de conservação, o número de micrósporos com emissão de tubo polínico aumentou (2,86%) até 3h de reativação do metabolismo (Fig. 4.2B). Já, depois de 30 dias de armazenagem, é possível notar uma tendência de crescimento linear à medida que aumenta o tempo de descongelamento alcançando 31,29% de polens germinados em 6h de para a retomada do metabolismo e se mantendo constante até 24 horas.

Os grãos de pólen armazenados em freezer apresentam maior porcentagem de germinação que aquele em refrigerador. O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2001) que enfatizam a maior longevidade do pólen congelado de pessegueiro.

O fato do aparecimento de maior número de polens germinados em 30 dias do que em 15 dias de experimento pode ser explicado por Oliveira et al. (2001), onde enfatizam que a diminuição na porcentagem de polens viáveis pode estar relacionada a vários fatores, tais como as condições de armazenamento, o recipiente usado no acondicionamento do pólen, a manipulação dos recipientes bem como a qualidade da amostra utilizada. Em vários trabalhos, a viabilidade do pólen armazenado é mantida se os grãos de pólen estiverem secos (SOUSA, 1988) e conservados em baixas temperaturas (ROGNON e NUCÉ DE LAMONTHE, 1973; AKIHAMA et al., 1979; MIRANDA, 1993)

O baixo índice de viabilidade aos 15 dias de experimento também pode ser uma consequência das anormalidades da própria meiose nesta espécie, tais como a presença de univalentes, bivalentes, e alterações como a presença de cromossomos retardatários na placa metafásica e pontes anafásicas, que são fatores considerados causadores de grãos de pólen imperfeitos, e conseqüentemente, inviáveis, ou também esta baixa viabilidade pode ser decorrente da técnica utilizada na análise (VARGAS, 2006).

O mesmo pode também ser explicado pela grande dificuldade do processo armazenamento em freezer que 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, em consequência disso, as células entram em colapso e morrem (SANTOS et al., 2002; SALOMOM, 2003). A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar-se, e a formação dos cristais de gelo (SANTOS, 2001).

A Fig. 4.2C representa o número de grãos de pólen germinados da cultivar em estudo em diferentes horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação em ultrafreezer, podendo-se notar a manutenção da viabilidade com a emissão de 50% de tubos polínicos utilizando essa temperatura no armazenamento. Para 15 dias de experimento ocorreu um aumento constante no número de grãos

pólen germinados até 5h de descongelamento a partir desse horário houve um pequeno decréscimo. Já para 30 dias de armazenamento, ocorreu um atraso na germinação de grãos de pólen em relação a 15 dias onde a emissão do tubo polínico foi crescente até 6h de incubação. Como visto anteriormente no ambiente refrigerador, o aumento de tempo de conservação provoca atraso de reativação de processos metabólicos.

Na Fig. 4.2D foi observado um comportamento semelhante nos dois tempos de armazenagem dessa cultivar, ocorrendo um aumento crescente de grãos de pólen germinados com o aumento do tempo de incubação. Para 15 dias de conservação o maior percentual de germinação foi de 39,02% com 5h de incubação e para 30 dias de experimento a máxima porcentagem foi de 46,31% com 6h de sucessivas contagens. No entanto para os dois estudos, o aumento do tempo de incubação ocasionou o aumento do potencial germinativo. Estes resultados concordam com Ganeshan (1986) e Kanazawa et al. (1992), onde uma alta percentagem de germinação foi verificada para o pólen de espécies do gênero *Allium*, após o armazenamento em nitrogênio líquido, por um ano, tendo os autores, sugerido que o pólen poderia continuar viável, por período superior.

A melhor eficiência esperada na preservação à ultra baixas temperaturas está relacionada à maior velocidade de congelamento, que causa menores danos à célula devido a menor desidratação e rompimento das membranas (DUMONT et al., 2004; FELLOWS, 2006).

A Fig. 4.3A representa o número de grãos de pólen germinados da cv. AL Guarany 2002 em diferentes horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação em refrigerador, igualmente como para a cv. IAC 80 foi constatada uma porcentagem inferior a 3% tendendo a zero com o aumento do tempo nos dois experimentos. Para 15 dias de conservação, ocorreu um aumento gradativo na porcentagem de grãos de pólen germinados com o incremento das horas, alcançando 2,16% com 6h de incubação a 20 °C. Já para 30 dias de armazenamento é possível notar que a regressão do ambiente refrigerador em relação ao número de grãos de pólen germinados não foi significativa, onde a porcentagem de grãos de pólen germinados não alcançou 1%.

Visser (1955) relatou que a longevidade dos grãos de pólen armazenados depende da redução da sua atividade fisiológica. Nesse experimento utilizando o

refrigerador como ambiente de armazenamento, os grãos de pólen das cultivares de mamoneira utilizadas nesse estudo, não sobreviveram a 15 dias de conservação.

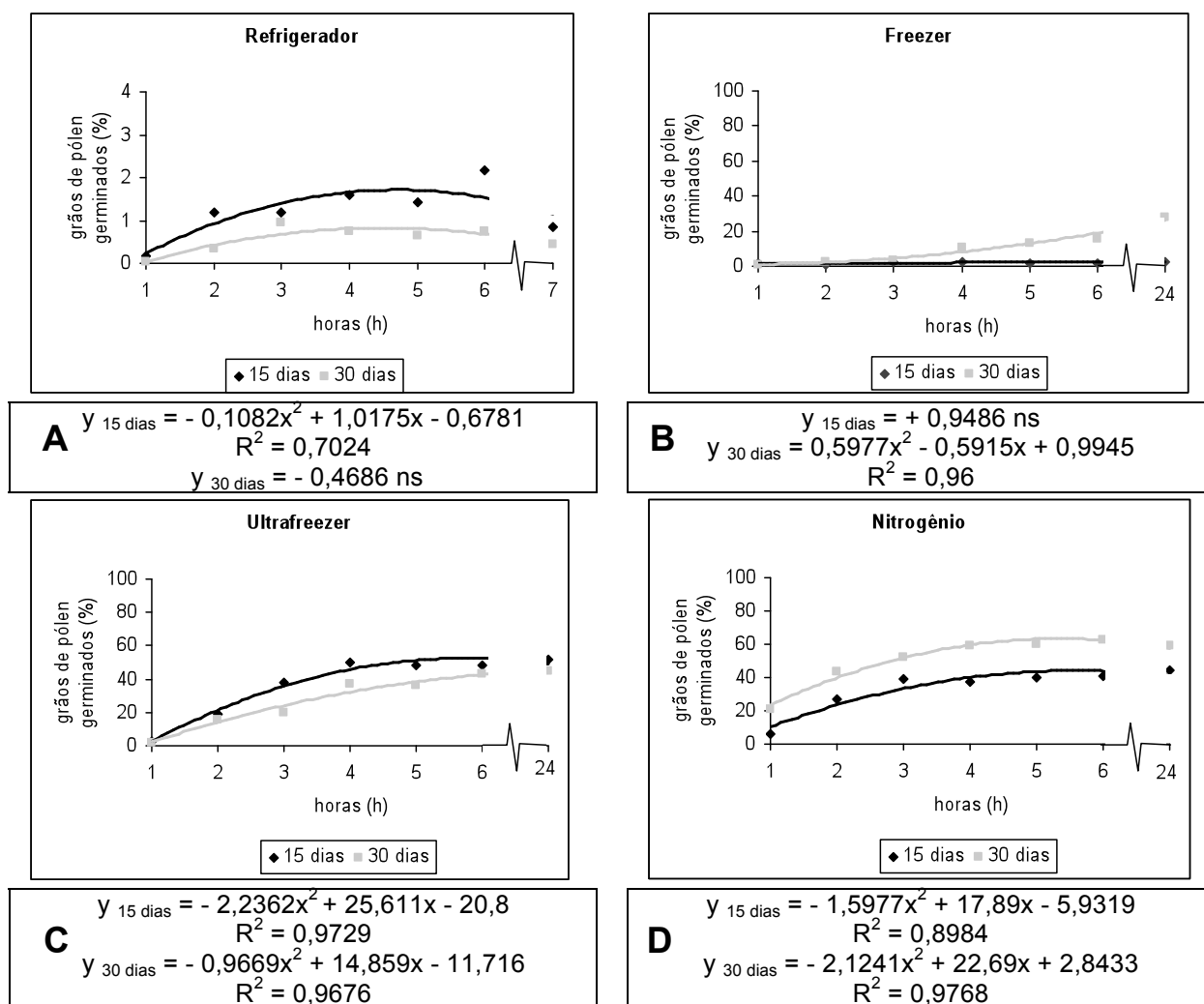


Figura 4.3 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira da cv. AL Guarany 2002 submetidas a horas de descongelamento em 15 e 30 dias de conservação e diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas: A. Refrigerador; B. Freezer; C. Ultrafreezer e D. Nitrogênio Líquido. Pelotas. UFPel, 2009.

A inviabilidade polínica pode ocorrer durante a microsporogênese, em que falhas no comportamento meiótico resultam em gametas com cromossomos desbalanceados ou anucleados, ou ainda durante a microgametogênese, resultando em grãos de pólen com citoplasma retraído (TWELL, 1995). A interferência do efeito do ambiente no comportamento meiótico, e conseqüentemente na viabilidade dos grãos de pólen, foi observada em *Bougainvillea* sp., quando foram comparadas variedades de várias regiões do Brasil (ADAMOWSKI et al., 1995).

Na Fig. 4.3B utilizando o freezer como ambiente de armazenamento, foi possível constatar uma resposta semelhante ao descrito anteriormente para a cv. IAC 80, onde a germinação *in vitro* de polens armazenados durante 30 dias foi maior que os polens armazenados durante 15 dias. Esse problema pode ser explicado pela qualidade da amostra, manipulação do material ou da técnica utilizada para análise. Para 15 dias de experimento foi observado que a regressão do ambiente em relação ao número de tubos polínicos emitidos não foi significativa. No entanto, para 30 dias de conservação, ocorreu um aumento gradativo na porcentagem de grãos de pólen germinados com o incremento das horas de descongelamento até 24h após o início do período de incubação, com 27,83% de tubos polínicos emitidos.

Após um período de 24h de incubação, foi muito visível a liberação de exudato pelo grão de pólen. Em cultivares de maracujazeiro o pólen parece ser pegajoso, por ser recoberto por uma substância chamada *pollenkit* que, dentre outras funções, atua como protetor, minimizando a desidratação e conseqüentemente a perda de viabilidade nesta espécie (SOUZA et al., 2002). Nas cultivares de mamoneira, foi observado a liberação de uma substância que parece exercer o mesmo papel. Resultados semelhantes foram encontrados por Vargas et al. (2009) em mamoneira.

Para a mesma cultivar, na conservação em ultrafreezer (Fig. 4.3C) ocorreu um comportamento semelhante nos dois períodos de armazenamento, porém os grãos de pólen com 15 dias de armazenamento apresentaram maior porcentagem de germinação *in vitro* que aqueles com 30 dias. A retomada dos processos metabólicos ocorreu com 24h de incubação onde foi visualizada a estabilidade do número de grãos de pólen germinados, no qual para 15 dias de armazenagem foram contados 51,67% de emissão de tubos polínicos e para 30 dias foram analisados 44,81%.

A Fig. 4.3D mostra um comportamento semelhante nos dois tempos de armazenagem, ocorrendo um aumento crescente de grãos de pólen germinados com o aumento do tempo de incubação. Como visto para a cv. IAC 80 no mesmo ambiente de armazenamento ocorreu uma porcentagem maior de grãos de pólen germinados em 30 dias de armazenamento do que em 15 dias. Porém para 15 dias de armazenamento foram necessárias 24h de incubação para serem alcançados 44,48% de germinação *in vitro*, já para 30 dias foram 6h para se alcançar 62,51% de grãos de pólen com emissão de tubos polínicos.



Resultados obtidos da conservação em nitrogênio líquido elucidaram a necessidade de estudos complementares da técnica utilizada e dos problemas observados. Apesar da criopreservação ter sido testada preliminarmente em diversas espécies, ainda não existe uma rotina de laboratório que possa garantir a conservação de germoplasma vegetal. Isto se deve à complexidade, tanto técnica como biológica, que envolve os processos de congelamento e descongelamento. Além disso, diferentes espécies reagem de maneira diversa a criopreservação, de forma que se torna necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam as exigências de cada espécie (WILLIAMS, 1990).

Para o experimento realizado aos 60 dias de conservação do material biológico, a análise de variância mostrou que houve diferença estatística significativa somente para o fator ambiente de armazenamento ( $p < 0,05$ ) apresentando uma porcentagem de germinação inferior ( $< 1\%$ ) a aquelas encontradas aos 15 e 30 dias de armazenamento. Para a cv. IAC 80 (Fig. 4.4A) houve diferença estatística do freezer em relação aos demais ambientes de conservação, estes apresentando uma porcentagem maior de grãos de pólen germinados. Já para a cv. AL Guarany 2002 (Fig. 4.4B) respostas diversificadas foram observadas, onde o nitrogênio líquido apresentou uma maior porcentagem de germinação, este não diferindo do freezer, mas diferindo dos demais ambientes estudados. Em geral, as cultivares estudadas apresentaram comportamento semelhante aos 60 dias de armazenamento, mostrando uma drástica redução na viabilidade polínica em todos os ambientes analisados. De acordo com Baéz et al. (2002), Gibernau et al. (2003) e Khan e Perveen (2006), em grãos de pólen armazenados não se observa aumento de viabilidade polínica com o passar do período de armazenamento, mas sim decréscimo.

Apesar das cultivares terem exibido taxas de viabilidade variáveis nos períodos de armazenagem, é possível considerar que os resultados obtidos para o pólen possam subsidiar programas de melhoramento em mamoneira, viabilizando cruzamentos entre indivíduos com potencial econômico que apresentem barreiras temporais de floração, ou estejam geograficamente separados (PIO, 2003). Portanto, os resultados mencionados no presente trabalho estão de acordo com a literatura, ou seja, com o passar do tempo observou-se redução significativa da viabilidade dos grãos de pólen armazenados.

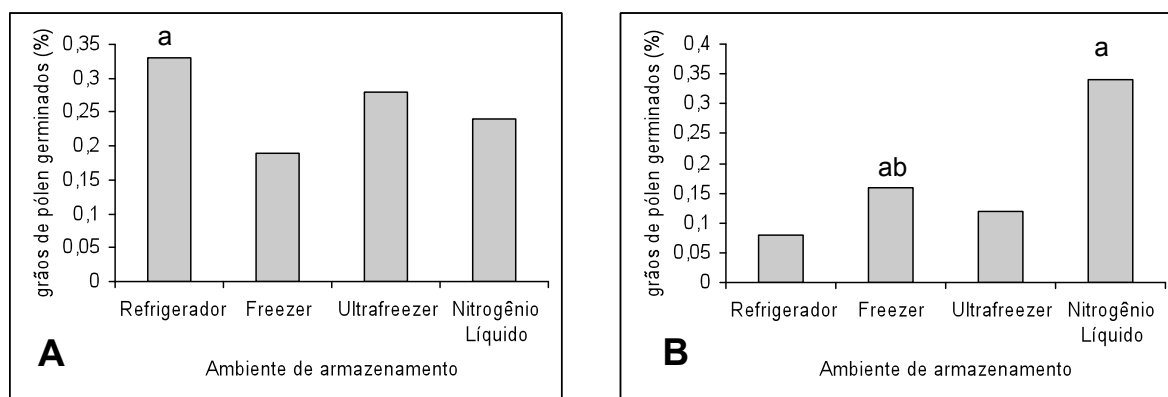


Figura 4.4 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de mamoneira das cvs. IAC 80 (A) e AL Guarany 2002 (B) submetidas a diferentes ambientes de armazenamento à baixas temperaturas avaliada aos 60 dias de conservação. Pelotas. UFPel, 2009.

#### **4.4 CONCLUSÃO**

Nas condições em que o trabalho foi realizado, é permitido as seguintes conclusões:

- O ambiente de ultrafreezer apresenta melhores resultados necessitando de 5 e 6h de incubação para a retomada do metabolismo do pólen da cv. IAC 80 tanto em 15 quanto em 30 dias de armazenamento, respectivamente;
- Para a retomada dos processos metabólicos após 15 dias de conservação foram necessárias 24h de incubação e para 30 dias foram necessárias 6h, para polens da cv. AL Guarany 2002 conservados em ultrafreezer.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as alternativas de plantas oleaginosas visando a produção de biodiesel, a mamoneira hoje é colocada como uma planta de excelente potencial, dentre outras utilidades. A sustentabilidade de um programa de produção de mamoneira exigirá fortalecimento substancial da base agrícola tecnológica, de suporte para o desenvolvimento e indicação de novas cultivares.

É de fundamental importância disponibilizar informações atualizadas sobre a mamoneira e avanços tecnológicos que contribuam para a melhoria do conhecimento da comunidade científica e da sociedade a respeito desta oleaginosa.

A grande diversidade genética observada no germoplasma de mamoneira, contribui significativamente para o desenvolvimento dos programas de melhoramento, uma vez que a variabilidade é a base para geração de genótipos superiores. A pesquisa com a cultura da mamoneira ainda é incipiente no Brasil e todo o trabalho realizado neste sentido contribui no fornecimento de informação para o desenvolvimento e aproveitamento do grande potencial que oferece esta cultura.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é permitido afirmar que a determinação das condições ideais para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de mamoneira, ou seja, obtenção de um protocolo preferencial para cada cultivar é um processo importante no início das avaliações, pois influencia o potencial reprodutor masculino da espécie fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo.

Através dos estudos realizados sobre o armazenamento de grãos de pólen em diferentes ambientes de conservação foi possível verificar que polens de cultivares de mamoneira não sobrevivem mais que 30 dias de estocagem e que o

tempo de resfriamento necessário para a retomada das atividades fisiológicas dependem do ambiente em que o material biológico é submetido. Porém os resultados deste trabalho sugerem que o armazenamento de pólen à baixas temperaturas de mamoneira requer mais estudos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; VALVA, F. D. A. Estudo comparativo do comportamento meiótico de variedades de *Bougainvillea* sp. cultivadas em diferentes regiões do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41, 1995, Caxambu. **Programa e Resumos do congresso nacional de genética**. Caxambu: SBG, 1995. p. 433.

AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Honolulu: University of Hawaii, 1959. 44 p. (Boletim técnico, 39).

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**, Melbourne, v. 13, n. 4, p. 238-241, 1979.

AKORODA, M. O. Estimating pollen viability for controlled hybridization in white yam. **Crop Research**, Edinburgh, v. 24, p. 11-22, 1984.

ALEXANDER, M. P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, Baltimore, v. 1, n. 5, p. 13-8, 1980.

ALMEIDA, F. DE A. C.; MORAIS, A. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; GOUVEIA, J. P. G. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 295-302, 2002.

ALMEIDA, F. C. G.; SILVA, J. F. da; ALVES, J. F.; SILVA, F. P. da; ALMEIDA, F. A. G. Estudo da germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*. II - efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 18, n. 1, p. 117-123, 1987.

AMORIM NETO, M. DA S.; ARAÚJO, A. E. DE; BELTRÃO, N. E. DE M. CLIMA E SOLO. IN: AZEVEDO, D. M. P. DE; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1999. p. 63-76.

AMORIM-NETO, M. da S.; ARAÚJO, A. E. de; BELTRÃO, N. E. de M. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 63-76.

ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: POLHILL, M.; RAVEN, P. H. (eds) **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.723-69.

ASIF, M. I.; AL-TAHIR, O. A.; FARAH, A. F. The effects of some chemicals and growth substances on pollen germination and tube growth of date palm. **HortScience**, St. Joseph, v. 18, n. 4, p. 479-480, 1983.

ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Univ. Zirat Fakult**, Dergise, v. 27, p. 105-116, 1990.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 350p.

AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M.; BATISTA, F. A. S.; LIMA, E. F. **Arranjo de fileiras no consórcio mamona/milho**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1997. p. 21. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 70).

BAÉZ, P.; RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. **Journal of Botany**, New Zealand, v. 40, p. 671-678, 2002.

BANCO DE DESENVOLVIMENTO DE MINAS GERAIS. **Aspectos de mercado para o óleo de mamona “castor oil”**. Belo Horizonte, 15p. 2000.

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; MARTINS, F. P.; BOAVENTURA, Y. M. S. Conservação e germinação do pólen, polinização e frutificação efetiva em pessegueiros e nectarineiras subtropicais. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 17-28, 1991.

BELTRÃO, N. E. de M.; **O biodiesel do óleo da mamona e a produção de fitomassa: considerações gerais e singularidade**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2004. 2p.

BETTIOL NETO, J. E.; DEL NERO, M.; KAVATI, R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. Viabilidade e conservação de pólen de três anonas comerciais. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p.825-837, 2009.

BEYHAUT, R. **Estúdio comparado de dos técnicas para viabilidad de polen en Vitis vinifera**. Notas Técnicas, 5. Facultad de Agronomía, Montevideo, 1988.

BEYOUNG, H. K. The effects of calcium on pollen germination. **American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 86, p. 818-823, 1965.

BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264 p.

BOLAT, I.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, Ankara, v. 23, p. 383-388, 1999.

BOMBENC, D.; MALOSSINIC, P. M.; CIPRIANIG, H.; TESTOLIN, R.; RETAMALES, J. Long term storage of kiwifruit pollen. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 498, p. 105-108, 1999.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

CAMPOS ANDRADA, M. P.; HILL, G. D. Storage and longevity of *Lupinus luteus* L. pollen. **Towards the 21st century**, Oeiras, v. 11, n. 16, p. 321-326, 1999.

CARNEIRO, R. A. F. **A produção do biodiesel na Bahia**. Conjuntura e planejamento Salvador: SEI, 2003. n. 112, p. 35-43.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção**. 2 ed. rev. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 429p.

CATI, Departamento de Sementes, Mudas e Matrizes. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/Cati/produtos/SementesMudas/cultivares/MAMONA-ALGUARANY2002.pdf> Acesso em: 20 dez. 2009, 14:32.

CAVALLARI, L. L.; PIO, L. A. S.; CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M. Germinação de grãos de pólen de nêspira utilizando nitrato de cálcio e ácido bórico em diferentes níveis de pH. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. CD-ROM.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; FRACAROLLI, B. B. C.; MENDONCA, V.; ONO, T. K. Efeito da adição de nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação *in vitro* de polens de nectarineira. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006a. CD-ROM.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; MENDONCA, V.; SIGNORINI, G.; SCHIAVINATO, Y.O. Ajuste da concentração de ágar e sacarose para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarina. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006b. CD-ROM.

CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; NEDER, D. G.; CAVALLARI, L. L.; PASQUAL, M.; MENDONCA, L.; CHAGAS, P. C. Efeito da temperatura na germinação de grãos de pólen de dois porta-enxertos de pereira. In: CONGRESSO



DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006c. CD-ROM.

CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; SAITO, A.; CHAGAS, P.C. *In vitro* germination of *Pyrus calleryana* Decne. pollen: adjusting a protocol. In: Internacional Pear Symposium, 10., 2007. Peniche. **Anais...** Peniche: ISHS, 2007. p.48.

CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; DALL'ORTO, F. A. C.; TIZATO, L. H. G.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; SCARPARE FILHO, J. A. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus persica* (L.) BATSCH *vulgaris*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 8-14, 2009.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Org.) **O Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologias, 2001. p. 89- 120.

COELHO, I. **Avaliação das exportações tradicionais baianas: caso de sisal e mamona**. 1979. 174p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

COHEN, E.; LAVI, U.; SPIEGEL-ROY, P. Papaya pollen viability and storage. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 40, p. 317-324, 1989.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, Mamona 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/MamonaJanerio2009.pdf> Acesso em: 20 dez. 2009, 14:30.

COSTA, T. L. **Características físicas e físicoquímicas do óleo de duas cultivares de Mamona**. 2006. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Recursos Naturais, Campina Grande.

CUCHIARA, C. C.; JUSTO, P. C.; BORGES, C. S.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Uso de corantes na análise da viabilidade polínica de genótipos de mamoneira expostos em condições adversas. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA, 2., 2008a, Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: EMBRAPA, 2008a. CD-ROM

CUCHIARA, C. C.; JUSTO, P. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Influência da temperatura e do pH sobre germinação *in vitro* de variedades de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008b, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: EMBRAPA, 2008b. CD-ROM

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992. 250p.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F. Conservação de grão de pólen de mamoeiro. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, p. 433-438, 2008.

DANTAS, A. C. DE M.; PEIXOTO, M. L.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 356-359, 2005.

DERIN, K.; ETI, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Adana, v. 25, p. 169-173, 1999.

DOMINGUES, E. T.; NETO, A. T.; SOBRINHO, J. T. Viabilidade do pólen em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 265-272, 1999.

DU, Y.; ZHANG, S.; J., X.; WU, J. Characteristics of pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume* *in vitro*. **Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica**, Beijing, v. 26, n. 9, p. 1846-1852, 2006.

DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 268-272, 2004.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB). **O biodiesel do óleo da mamona e a produção de fitomassa: Considerações gerais e singularidades**. Campina Grande, 2004. Folder.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, C. A.; PINHO, E. V. R. V.; ALVIM, P. O.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2006.

FREITAS, D. A. F.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; MENDONCA, V.; NETO, J. E. B.; TIZATO, L. H. G. Avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Pyrus calleriana* Dcne. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006a. CD-ROM.

FREITAS, D. A. F.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; NETO, J. E. B.; MENDONCA, V.; CHAGAS, P. C. Germinação de grãos de pólen de pereira sob diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico do meio de cultura. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006b. CD-ROM.

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.

GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196° C). **Tropical Agricultural**, Índia, v. 63, n. 1, p. 46-48, 1986.

GIBERNAU, M.; MARQUART, D.; DIAZ, A. Pollen viability and longevity in two species of Arum. **Aroideana**, v. 26, p. 58-62, 2003.

GODDARD, R. E.; MATHEWS, F. R. Pollen testing. In: FRANKLIN, C.E. (ed.) **Pollen management handbook**. Washington: USDA. Forest Service, 1981. 98p. (Agriculture Handbook, 587).

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**, Brasília, v. 25, n. 1, p.14-17, 2003.

GOMES, P. R. **Viabilidade e conservação do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.)**. 1998. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de sementes) – Faculdade de Agronomia "Elizeu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GOMEZ, P.; GRADZIEL, T. M.; ORTEGA, E.; DICENTA, F. Short term storage of almond pollen. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 6, p. 151-152, 2000.

GONÇALVES, C. X. **Viabilidade e compatibilidade de pólen de diferentes genótipos de pereira no Rio Grande do Sul**. 151 P. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia)– Faculdade de Agronomia "Elizeu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GOZLEKCI S.; KAYNAK L. Investigations on pollen production and quality in some standard pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. In: MELGAREJO-MORENO P.; MARTÍNEZ-NICOLÁS J.J.; MARTÍNEZ-TOMÉ J. (eds) **Production, processing and marketing of pomegranate in the Mediterranean region: Advances in research and technology**. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2000. p. 71-77.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. 1989. 142p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002. 131p.

GUINET, P. H. **Advances in legume biology: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842p.

HARIKARUNAKAR D.; HARIPRIYA K. Floral biology of aggregatum onion (*Allium cepa* var. aggregatum). **Madras Agricultural Journal**, Chidambaram, v. 86, n. 1-3, p. 166-169, 2000.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, Baltimore, v. 45, p.115-120, 1970.

HIRANO, R. T.; NAKASONE, H. Y. Chromosome numbers of ten species and clones in the genus *Psidium*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount-Vernon, v. 94, p. 83-86, 1969.

HOEKSTRA, F. A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 34, p. 221-225, 1975.

HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, USA, v. 93, p. 295-301, 2004.

ISHIHATA, K. On the pollen germination of purple passion fruit, *Passiflora edulis* Sims. **Bulletin of Faculty of Agriculture Kagoshima University**, Kagoshima, v. 33, n. 2, p. 7-11, 1983.

KANAZAWA, T.; KOBAYASHI, S.; YAKUWA, T. Flowering process, germination and storage of pollen in *Allium victorialis* L. spp. *platyphyllum* Hult. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japan, v.60, n.4, p. 947-953, 1992.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. (ed.). **Cryopresevation of plant cells and organs**. Boca Roton: CRS Press. 1985, p.115-134.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 89, n.6, p.1021-1023, 2002.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 1993. 583 p.

KHAN, S. A.; PERVEEN, A. Germination capacity of stored pollen of *Abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) and their maintenance. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 38, p. 233-236, 2006.

KING, J. R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain technology**, Baltimore, v. 35, p.225-7, 1960.

KUMAR, P. V. et al. Influence of moisture, thermal and photoperiodic regimes on the productivity of castor beans (*Ricinus communis* L.). **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 88, n. 4, p. 279-289, 1997.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul- Brasil. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 11, n. 1, p. 192-205, 2004.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas medicinais no Brasil / Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LORENZON, M. C. A.; ALMEIDA, E. C. Viabilidade e germinação do pólen de linhagens parentais de cebola híbrida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 345-349, 1997.

LOUPASSAKI, M.; VASILAKAKIS, M.; ANDROULAKIS, I. Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the *in vitro* germination of avocado pollen grains. **Euphytica**, Wageningen, v. 94, p. 247-251, 1997.

LUZA, J. G.; POLITO, V. S. *In vitro* germination and storage of english walnut pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 27, p. 303-316, 1985.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 67, p. 101-104, 1996.

MEDEIROS, A. R. M. Efeito da temperatura controlada na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais... Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura**, 1979. v. 2, p. 407-416.

MELHEM, T. S.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Pollen grains of plants of the "Cerrado" V- Leguminosae – Caesolpinodae. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 23, n. 4, p. 369-387, 1973.

MENDES, M. DA S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum spp.*** 1994. 75f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MIRANDA, I. P. A. A importância da conservação *in vitro* do pólen da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) Arecaceae para o melhoramento genético. In: FERREIRA, E. J. G; SANTOS, G. M.; LEÃO, E. L. M.; OLIVEIRA, L. A. (eds.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia**. Manaus: SCT/INPA, v. 2, 1993. p. 361-171.

MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San Jose, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.

MOREIRA, J. de A.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVEDO, D. M. P. de; **Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1996. p. 29.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. Moskow: Kolos Publisher, 1986. 315 p.

MULUGETA, D.; MAXWELL, B. D.; FAY, P. K.; DYER, W. E. *Kochia (Kochia scoparia)* pollen dispersion, viability and germination. **Weed Science**, Champaign, v.42, p.548-552, 1994.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P. ; MEISSNER FILHO, O. E. ; BARTH, O. M. ; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, p. 209-214, 2008.

NAVA, G.A. **Desenvolvimento floral e frutificação de pessegueiros [*Prunus persica* (L.) Batsch] cv. Granada, submetidos a distintas condições térmicas durante o período de prefloração e floração** 175p. 2007. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NEVES, T. S.; MACHADO, G. M. E.; OLIVEIRA, R. P. Efeito de diferentes concentrações de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 140-144, 1997.

NUNES, J. C. O.; DANTAS, A. C. de M.; PEDROTTI, E. L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.

NYOMORA, M. S.; BROWN, P. H.; PINNEY, K.; POLITO, V. S. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Davis, v. 125, n. 2, p. 265-270, 2000.

OBERLE, G. D.; WATSON, R. The use of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride in viability tests of fruit pollens. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Ithaca, v. 61, p. 299-303, 1953.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F.; RAMOS, J. D.; SANÁBIO, D.; RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M. Efeito do cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996. Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBF, 1996. p.419. CD-ROM

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. **Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos fisiológicos da germinação de grãos de pólen do pessegueiro diamante (*Prunus persicae* L. Bastch)**. 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, M. DO S.; PADILHA, M. M. M.; KALUME, M. A. de. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açazeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v. 15. n. 1, p. 27-33, 2001.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açazeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v. 15, n. 1, p. 63-67, 2001.

PAGLIARINI, M. Q. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 997-1002, 2000.

PARFITT, D. E.; ALMEHDI, A. A. Liquid nitrogen storage of pollen from five cultivated *Prunus* species. **Hort Science**, Alexandria, v. 19, n. 1, p. 69-70, 1984.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; DEROOSE, R.; DE PROFT, M. P. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.

PASQUAL, M.; PETRI, J. L.; MATTOS, C. S. Polinização da macieira III: cultivares BR-1 e Molliés Delicious. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 10, p. 1477-1481, 1982.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. DE O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 8, p. 199-202, 2002.

PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pinto* (Leguminosae)**. 1995. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília.

PFAHLER, P. L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium and boron effects. **Canadian Journal of Botany**, Toronto, v. 45, p. 839-845, 1967.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyjhoff, 1987. 344 p.

PIO, L. A. S. **Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de armazenamento**. 2003. 45 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

PIO, L. A. S. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 147-153, 2007.

PLINE, W. A.; EDMISTEN K. L.; OLIVER, T.; WILCUT, J. W.; WELLS, R.; ALLEN, N. S. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Manhattan, v. 42, p. 2193-2200, 2002.

POLETINE, J. P., et al. Avaliação de Cultivares de Mamona (*Ricinus communis* L.) para o Estado de São Paulo Safra 2003/2004. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1CD-ROM.

RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; APARECIDA SALLES, L.; CHAGAS, E. A.; PIO, R. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **INCI**, Caracas, v. 33, n. 1, p. 51-55, 2008.

RASEIRA, M. C. B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattayanum***. Pelotas: Embrapa/CPACT, 1996. p. 33-45.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. 906p.

REGHIN, M. Y. **Fisiologia do desenvolvimento das hortaliças em ambiente protegido**. Botucatu: Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 1996. 12p.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island. **The South Pacific Journal Natural Science**, Fiji, v. 20, p. 30-33, 2002.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 12, p. 241-244, 2000.

ROGNON, F.; NUCE DE LAMONTHE, M. Action du froid sur la conservation du pollen de cocotier. **Oléagineux**, Paris, v. 28, n. 12, p. 565-566, 1973.

ROSELL, P.; HERRERO, M.; GALAN-SAUCO, V. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *In vivo* characterization and optimization of *in vitro* germination. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, p. 251-265, 1999.

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

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.

SANGWAN, R. S.; CAMEFORT, H. Microsporogenesis in *Datura metel* L. **Ver Cytol Biol Végét Bot**, v. 5, p. 265-282, 1982.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 20, p. 60, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12(Edição Especial), p. 70-84, 2000.

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).

SANTOS-KALTCHUK, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.1, p. 165-173, 2002.

SAVY-FILHO, A. **Mamona: Tecnologia agrícola**. Campinas: EMOPI, 2005. 105p.



SAVY FILHO, A.; PAULO, E. M.; MARTINS, A. L. M.; GERIN, M. A. N. **Variedades de mamona do Instituto Agrônômico**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999a. p. 12. (Boletim Técnico, 183).

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; BARBOZA, M. Z. Mamoneira. In: CATI (Campinas, SP). **Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico**. Campinas, 1999b. p. 29.

SAVY FILHO, A. Cultura da Mamoneira. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Cultivares/Folders/Mamona/IAC80.htm>. Acessado em: 20 dez. 2009, 14:40.

SAX, K.; EDMONDS, H. W. Development of male gametophyte in *Tradescantia*. **Botanical Gazette**, v.95, p.156-163, 1933.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. (ed.) In: JANIK J.; MOORE, J. N. **Fruit breeding**. New York: John & Sons, 1995. p. 325-440.

SILVA, M. M. da. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólen do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Deg.)**. 1996. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, M. M.; BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C. D. Fatores que afetam a germinação de grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 347-352, 1999.

SILVA, S. D. A.; CASAGRANDE JR., J. G.; AIRES, R. F. Sistema de Produção da Mamona. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/cultivares.htm#hibridos>. Acessado em: 20 dez. 2009, 14:45.

SILVA, S. D. A. e; EICHOLZ, E. D.; CASAGRANDE JR, J. G.; AIRES, R. F. **Produção de mamona na serra do sudeste, RS**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 36 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim técnico, 99).

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 391p.

SIREGAR, I. Z.; SWEET, G. B. The impact of extraction and storage conditions on the viability of radiata pine pollen. **Silvae Genetica**, Bogor, v. 49, n. 1, p. 10-14, 2000.

SMITH, O.; COCHRAN, H. L. **Temperature and pollen germination in the tomato**. Cornell: Agricultural Experiment Station, 1935. v. 175. 11p.

SNYDER, E. B.; CLAUSEN, K. E. Pollen handling. In: SCHOPMEYER, C.S. (ed.) **Seeds of woody plants in the United States**. Washington: USDA, 1974. 883p. (USDA. Agriculture handbook, 450).

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and

viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, p. 111-118, 2008.

SOUSA, V. A. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 21, p. 15-19, 1990.

SOUSA, V. A. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus***. 1988. 155p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de concentração em Engenharia Florestal) – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. Development of pollen grain in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, 469-473, 2000.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1209-1217, 2002.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen - biology, biochemistry and management**. New York: Springer-Verlag, 1974. 172p.

STEVENS, M.A., RUDICH, J. Genetic potencial for overcoming physiological limitations on adaptability, yield, and quality in the tomato. **HortScience**, Alexandria, v.13, p.673-78, 1978.

TEAOTIA, S. S.; PHOGOT, K. P. S.; SRISVATAVA, V. S. Blosson biology studies in *Psidium* species. **Progressive Horticulture**, Uttar Pradesh, v. 2, p. 101-112, 1970.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

THOMPSON, A.H.; BATJER, L.P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.56, p.227-230, 1950.

TOMÉ, L. G. O. **Meiose e viabilidade do pólen de *Solanum commersonii* ssp. e *Solanum tuberosum* L.** 2004. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TUINSTRA, M. R.; WEDEL, J. Estimation of pollen viability in grain sorghum. **Crop Science**, Manhattan, v. 40, n. 4, p. 968-970, 2000.

TWELL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. **Protoplasma**, New York, v. 187, p. 144-154, 1995.

VARGAS, D. P.; SOUZA S. A. M.; SILVA, S. D. A. e; BOBROWSKI, V.L. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L., EUPHORBIACEAE): conservação e viabilidade. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 115-120, 2009.

VARGAS, D. P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. 2006. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

VASILAKAKIS, M.; PORLING, I. C. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. **Horticultural Science**, St. Joseph, v. 20, p. 733-735, 1985.

VERISSIMO, M. A. A.; GUIDOLIN, A. F.; SILVA, S. D. dos A. e.. Potencial produtivo de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.), Lages SC, safra 2005/2006. In: SEMINÁRIO REGIONAL DOS PÓS-GRADUANDOS EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 1., 2006, Lages. **Anais...** Lages: UDESC, 2006. CD-ROM.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica organográfica**. 4 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2000. 124p.

VISSER, T. Germination and storage of pollen. **Meded Landb. Hogesch**, Wageningen, v. 55, p. 1-68, 1955.

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.

WANG, B. S. P. **Metodologia de la conservacion de los recursos geneticos forestales**. FAO: Roma, 1975. p. 93-103.

WEISS, E. A. **Oil seed crops**. London: Longman, 1983. 659p.

WERNER, D. J.; CHANG, S. Stain testing viability in stored peach pollen. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 4, p. 522-523, 1981.

WILLIAMS, J. T. Germplasm conservation *in vitro* and cryopreservation. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds.). **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de planta**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 267-286.

WREGE, M. S.; SILVA, S. D. A. e; GARRASTAZU, M. C.; STEINMETZ, S.; REISSER JÚNIOR, C.; HERTER, F. G.; MATZENAUER, R. **Zoneamento agroclimático para mamona no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 30 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 192).