



IPEF: FILOSOFIA DE TRABALHO DE UMA ELITE DE EMPRESAS FLORESTAIS BRASILEIRAS

ISSN 0100-3453

CIRCULAR TÉCNICA Nº 128

Fevereiro/1981

PBP/2.7.2

MANEJO DE PÓLEN DE *Pinus* PARA FINS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

Maria Eugenia Martins*
Leonel Estuardo Herrera Prera*
Paulo Yoshio Kageyama**

I. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento do programa de melhoramento genético de *Pinus* spp em nossas condições, a partir da seleção de árvores superiores e a instalação de pomares de sementes, vem surgindo a necessidade de avaliação do valor genotípico dessas áreas, para continuidade do programa, através dos testes de progênie.

Para a geração de progênie, tanto pelo cruzamento intra-específico como pelo interespecífico, é de primordial importância o desenvolvimento de técnicas de manejo de pólen e de polinização controlada.

O presente trabalho aborda a experiência obtida nesse campo, através de revisão bibliográfica e de ensaios conduzidos pelo setor de melhoramento e produção de sementes, com o gênero *Pinus*.

II. COLETA E SECAGEM DOS ESTRÓBILOS MASCULINOS E EXTRAÇÃO DO PÓLEN. (a, e, d)

Para se fazer uma coleta adequada dos estróbilos masculinos deve-se levar em conta vários fatores, tais como pessoas disponível e qualificado, período do dia, variação na

* Acadêmico do C.E.F. – ESALQ/USP

** Professor Assistente do Depto. Silvicultura – C.E.F. – ESALQ-USP – Setor de Produção de Sementes

produção dos estróbilos, porém, o mais importante seja, talvez, a determinação do ponto ideal de maturação para a coleta dos estróbilos, o qual nos permitirá obter pólen viável e em boa quantidade. Assim, tem sido determinado que estróbilos ditos verdes não produzem, ou produzem pouca quantidade de pólen pois o grão ainda não está no estágio ideal. Os estróbilos ditos maduros, quando coletados liberam a maior parte dos grãos pois os estróbilos já estão abertos, podendo causar grandes perdas de pólen.

Um estágio adequado que vem proporcionando bons resultados, é quando após uma dobra dos estróbilos, suas escamas se separam e não liberam o pólen: é o chamado estágio intermediário.

Outro parâmetro para a determinação da maturação é dada pela cor do estróbilo nos estágios intermediário e maduro. Assim temos que para *P. elliotii* var. *elliotii* e *P. caribaea* var. *hondurensis* o estágio intermediário é visualizado pela mudança para uma intensa cor púrpura, ficando o estágio maduro de cor amarelada, como ocorre para as diversas outras espécies quando maduras.

Pode-se, ainda, retardar a maturação dos estróbilos no estágio intermediário colocando-os num ambiente a 5°C, coletados com os ramos e colocados em vasilhame com água por um período de até 10 dias, caso seja necessário.

Os estróbilos maduros (abertos) e previamente secos são colocados em funis com peneira fina de meio milímetro de malha, os quais são mexidos constantemente até soltarem o pólen, que deve ser identificado quanto ao número da árvore, área e data da coleta. Também pode ser utilizado para a extração uma mesa vibratória, através de um jogo de peneiras acopladas a um vibrador mecânico.

Vale mencionar que após a troca de lotes durante a extração, tem que ser feita uma limpeza nas peneiras, com água, detergente e/ou álcool para se evitarem contaminações desses lotes.

III. TESTE DE VIABILIDADE DO PÓLEN (a, c, d, e)

O teste de germinação visa a avaliação do máximo potencial de viabilidade que um lote de pólen pode alcançar nas melhores condições ideais de temperatura, umidade e substrato, num período necessário para essa germinação.

Para os testes realizados, segundo a literatura, a umidade foi de 100%, a temperatura de 25°C constante e o tempo necessário para a contagem foi de 72 horas. Em teste de substrato realizado, foram consideradas 4 condições, isoladas e interligadas, envolvendo 12 tratamentos, com água, agár, sacarose e ferro nas proporções a seguir, e foram obtidos os resultados:

água:	50 ml
sacarose:	10% - 5 g/50 ml água
agar:	0,75% - 325 mg/50 ml água
ferro:	EDTA (F2) ₂ - 1,75 ml – (10 ppm de ferro) - 0,875 ml – (5 ppm de ferro)

Tabela 1. Resultado de teste de germinação envolvendo diferentes substratos

Tratamento	Substrato				Resultado G%
	água	agár	sacarose	ferro	
1	+	-	-	-	42,5
2	+	+	+	-	77,5
3	+	+	-	-	71,0
4	+	-	+	-	8,0
5	+	-	-	5	11,0
6	+	-	-	10	1,5
7	+	-	+	5	25,0
8	+	-	+	10	29,5
9	+	+	-	5	69,5
10	+	+	-	10	49,5
11	+	+	+	5	45,5
12	+	+	+	10	47,5

Os tratamentos 1, 4, 5, 6, 7 e 8 foram preparados em vidros envolvidos com papel alumínio e os demais, por possuírem agár, foram preparados sobre lâminas de microscópios, espalhando-se a solução de agár ainda quente com o uso de uma pipeta. Após a solução esfriar, o pólen foi espalhado na melhor densidade possível, para se evitarem aglomerados na lâmina. Para esse processo é utilizado um pincel, o qual assegura a quantidade necessária de pólen quando este é colocado no lote, batendo-se levemente para retirar o excesso, e depois espalha-se levemente sobre a lâmina preparada onde o pólen cai facilmente.

Após prontas as duas lâminas por lote, são colocadas dentro de ger-boxes sobre papel hidrófilo úmido, e o conjunto dentro do germinador em condições controladas de temperatura e umidade relativa.

O teste de germinação é realizado utilizando-se de duas lâminas que representam as repetições para cada lote. Com o microscópio no menor aumento (10 x 1) escolhe-se dois campos ao acaso em cada lâmina, e em cada campo contam-se 50 grãos de pólen. Somando-se os grãos germinados nos dois campos obtém-se a porcentagem de germinação de uma lâmina e fazendo-se o mesmo com a segunda obtém-se nova porcentagem de germinação. A porcentagem resultante é a média aritmética das duas porcentagens encontradas.

Nos tratamentos preparados em vidro deve-se homogeneizar a solução, pois o pólen tende a ficar na superfície, e espalhar a solução sobre uma lâmina de microscópio para a contagem. O pólen é considerado germinado quando seu tubo polínico é maior ou igual a seu maior diâmetro.

Na tabela 1, procedendo da maneira citada, conclui-se que o tratamento nº 2, envolvendo 325 mg de agár, 50 ml de água e 5 g de sacarose foi o de melhor resultado e foi escolhido para os futuros testes, por ser simples e prático.

O número de repetições, ou a quantidade de pólen que deve ser contada no teste de germinação, é função da qualidade do lote de pólen. Para lotes muito bons ou muito ruins, um pequeno número de repetições é suficiente; para lotes médios um número maior de repetições é necessário. Existe uma tendência para se usar um total de 400 grãos de pólen no teste de

germinação, para se garantir uma boa avaliação do lote. Estudos vêm sendo realizados para se determinar o número ideal de repetições para diferentes níveis de viabilidade do pólen.

É comum a ocorrência de contaminações por microorganismos nos testes de germinação, principalmente em lotes com alta umidade, ou acima de 20%. Em casos de lotes muito contaminados deve-se usar fungicida no pólen, por ocasião da instalação do teste. A contaminação pode estar presente no lote de pólen ou na instalação do teste de germinação

IV. SECAGEM E ARMAZENAMENTO DO PÓLEN (a, c, e)

É, sem dúvida, o tópico mais importante no manejo do pólen, pois em condições naturais o pólen perde sua viabilidade rapidamente. Assim, através de um adequado armazenamento consegue-se aumentar a longevidade do pólen por tempo maior permitindo a sua utilização.

No armazenamento são importantes a temperatura ambiental e a umidade do lote, que devem ser controladas adequadamente para que estas diminuam o metabolismo do pólen e a proliferação de microorganismos, e conseqüentemente sua deterioração. Assim temos que temperaturas baixas (em torno de -12°C ou menos) têm-se mostrado favoráveis à conservação do pólen.

A umidade do lote de pólen é altamente importante na conservação do mesmo. Quanto maior o período de armazenamento menor deve ser a umidade do lote. Para curtos períodos de armazenamento (algumas semanas), baixando-se e conservando-se a umidade do pólen para abaixo de 20% e conservando-se em refrigerador comum (3-5°C), obtém-se bons resultados. Para períodos maiores (1 ano) a conservação deve ser em “freezer” (-12°C a -20°C) e a baixas umidades (menor que 15%). Para longos períodos de armazenamento (vários anos), o pólen deve estar a uma umidade muito baixa, em torno de 5%, e em temperatura também muito baixa (-15 a -20°C).

É, portanto, muito importante o controle da umidade do pólen para sua conservação adequada. A determinação da umidade do pólen é portanto a principal ferramenta para a decisão das medidas que devem ser tomadas com o lote de pólen.

A secagem do pólen pode ser efetuada durante o período de extração, ainda no estróbilo, a pleno sol ou em estufa. O pólen, após sua extração, pode ser secado em estufa ou pelo processo do dessecador, como à base de sílica-gel.

A importância da umidade do lote de pólen no armazenamento é mostrado a seguir para pólen de *Pinus kesiya* coletado em julho de 1980 no teste de armazenamento iniciado em agosto de 1980.

Tabela 2. Resultados de germinação (G) de um lote de pólen de *Pinus kesiya* armazenado a diferentes umidades (U) iniciais.

U% inicial	Setembro		Novembro		Janeiro-81	
	G%	U%	G%	U%	G%	U%
5,0	92	5,0	74	75	5,28	
14,7	86	13,9	94	82	13,7	
26,26	18	26,6	2	5	24,5	

Com esses resultados verifica-se a necessidade da secagem prévia do pólen para o armazenamento, pois, umidades altas (acima de 20%), são prejudiciais ao pólen, visto que

com apenas 1 mês de armazenamento a germinação abaixou para 18%. A essa umidade, foi sempre constante a presença de fungo até o último teste.

A determinação a porcentagem de umidade é obtida utilizando-se meio grama de pólen, um cadinho e uma estufa; após o período de uma hora é pesado novamente obtendo-se o peso seco do pólen. A umidade perdida dividida por 0,50 e multiplicando-se por 100 nos dá a porcentagem de umidade. São necessárias, a determinação de umidade, duas repetições.

V. POLINIZAÇÃO CONTROLADA E SUPLEMENTAR (a, b, d, e)

A polinização controlada é uma ferramenta muito útil ao melhorista pois possibilita a obtenção de progênes de pais conhecidos. Isso possibilita o estudo de progênes de irmãos germanos e a obtenção de híbridos, auxílio valioso no melhoramento e na estimação de parâmetros genéticos.

Para se realizar a polinização controlada é necessário o isolamento do estróbilo feminino quando ele se encontra ainda na fase de primórdio. Este isolamento se faz com saquinhos de tecido não tramado, celofane, etc., o qual deve ter uma parte transparente para visualização do estróbilo e o acompanhamento de seu desenvolvimento até o momento da aplicação do pólen, através de uma seringa e agulha. Normalmente são necessárias de 2 a 3 aplicações para se garantir a polinização perfeita.

Os saquinhos só podem ser retirados após as escamas de estróbilo feminino se fecharem, caso contrário poderá ocorrer contaminação com pólen estranho.

A polinização suplementar é realizada quando por diversas razões há falta de pólen em relação à quantidade de estróbilos femininos. Consiste na polinização artificial através de polvilhamento com pólen diluído em material inerte, para aumentar o volume do material polinizante.

Foram realizados testes utilizando-se talco neutro como material inerte e os resultados obtidos seguem-se na tabela abaixo:

Tabela 3. Resultados de germinação de pólen diluído em talco neutro em diversas proporções e após diferentes períodos.

Tratamento	Diluição pólen: talco	Tempo (horas)	G%
a	1:0	-	89
b	1:1	2	81
c	1:1	1	71
d	1:1	½	84
e	1:2	2	45
f	1:2	1	51
g	1:2	½	61
h	1:5	2	31
i	1:5	1	38
j	1:5	½	54
l	1:10	2	baixa germinação, difícil contagem
m	1:10	1	35
n	1:10	½	baixa germinação, difícil contagem

Observa-se que a viabilidade do pólen, com a utilização da diluição em talco, cai conforme aumenta a proporção de talco, sendo viável a utilização somente de altas relações de pólen-talco. A polinização suplementar deve ser efetuada o mais rapidamente possível após a diluição.

Outros materiais inertes podem ser utilizados na diluição, tais como pólen morto do mesmo gênero ou outro. Devem ser testados outros materiais inertes que não prejudiquem a viabilidade do pólen.

VI. RESUMO E CONCLUSÕES

1. Na coleta do pólen o ponto mais importante é a determinação do ponto de maturação ideal para a coleta do estróbilo. Nessa coleta deve ser considerada a variação existente tanto entre espécies como entre indivíduos dentro das espécies.

2. Na extração do pólen, a partir dos estróbilos, o cuidado com a contaminação do pólen extraído é imprescindível para a obtenção de lotes puros.

3. Para a avaliação da viabilidade do pólen são importantes a assepsia na instalação do teste de germinação e a amostragem representativa na contagem de pólen viável.

4. Para o armazenamento adequado do lote de pólen os pontos mais importantes seriam o controle da umidade do pólen e a temperatura do ambiente de armazenamento, que irão definir sua conservação a longo e a curto prazo.

5. Para a polinização controlada a determinação dos estágios adequados do estróbilo feminino para o seu isolamento e de sua receptividade para a polinização são os pontos críticos que devem ser considerados.

6. Na polinização suplementar, a frequência de aplicações, em função da variação de florescimento entre árvores, aliada à diluição do pólen a ser aplicado, são os pontos mais importantes.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- a. DORNAN, K.W. – The genetics and breeding of southern pines. Washington, USDA. Forest Service, 1976. 407p.
- b. FAULKNER, R. – Seed orchards. London, Her Majesty's Stationery Office, 1975. 149p.
- c. SHORT COURSE ON GENETICS AND TREE IMPROVEMENT, Raleigh, October-November, 1980 (não publicado).
- d. STANLEY, R.G. – Pollen: Biology, biochemistry, management. Berlin, Springer-Verlag, 1974. 307p.
- e. USDA. FORESTRY SERVICE – Seed of woody plant in the United States. Washington, 1974. 883p.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CIA AGRO FLORESTAL MONTE ALEGRE pelo suporte técnico-financeiro que possibilitou a realização dessa pesquisa.

Esta publicação é editada pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, convênio Departamento de Silvicultura da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

É proibida a reprodução total ou parcial dos artigos publicados nesta circular, sem autorização da comissão editorial.

Periodicidade – irregular

Permuta com publicações florestais

Endereço:

IPEF – Biblioteca
ESALQ-USP
Caixa Postal, 9
Fone: 33-2080
13.400 – Piracicaba – SP
Brasil

Comissão Editorial da publicação do IPEF:

Marialice Metzker Poggiani – Bibliotecária
Walter Sales Jacob
Comissão de Pesquisa do Departamento de Silvicultura – ESALQ-USP
Prof. Luiz Ernesto George Barrichelo
Prof. Fábio Poggiani
Prof. Mário Ferreira

Diretoria do IPEF:

Diretor Científico – Prof. João Walter Simões
Diretor Técnico – Prof. Helládio do Amaral Mello
Diretor Administrativo – Prof. Ricardo Berger

Responsável por Divulgação e Integração – IPEF

José Elidney Pinto Junior