

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL**

ANDRESA FERNANDA DILL

MANEJO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Pinus* spp.

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

**DOIS VIZINHOS
2016**

ANDRESA FERNANDA DILL

MANEJO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Pinus* spp.

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia Florestal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira Florestal.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Neumann Wendt.

Co-orientadora: Dra. Valderês Aparecida de Sousa.

DOIS VIZINHOS

2016

D578m Dill, Andresa Fernanda
Manejo e viabilidade do pólen de *Pinus spp.* /
Andresa Fernanda Dill – Dois Vizinhos: [s.n], 2016.
50f.:il.

Orientadora: Simone Neumann Wendt
Coorientadora: Valderês Aparecida de Sousa
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de
Engenharia Florestal, Dois Vizinhos, 2016.
Bibliografia p. 44-50

1. Pólen 2. Fertilização de plantas 3. Germinação I.
Wendt, Simone Neumann, orient. II. Sousa, Valderês
Aparecida de, coorient. III. Universidade Tecnológica
Federal do Paraná – Dois Vizinhos. IV. Título
CDD: 631.53

Ficha catalográfica elaborada por Rosana Oliveira da Silva CRB: 9/1745

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Curso de Engenharia Florestal



TERMO DE APROVAÇÃO

Título MANEJO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Pinus spp.*

por

Andresa Fernanda Dill

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 09 de Dezembro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Simone Neumann Wendt
Orientadora

Profa. Dra. Daniela Aparecida Estevan
Membro titular (UTFPR)

Prof. Dr. Mauricio Romero Gorenstein
Membro titular (UTFPR)

Doutorando Carlos Kosera Neto
Membro titular (UTFPR)

Dedico o presente trabalho para as pessoas mais importantes de minha vida, que me amparam todos os dias ao lado de nosso Senhor. Meu nono Casemiro Szczepkowski e minha nona Praxedes Szczepkowski. Eternas saudades. Dedico também a nossa pequena Yasmin, luz e amor infinitos para nossas vidas! Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser fôlego de vida em mim, me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Agradeço infinitas vezes a minha família por tudo. Por acreditar, incentivar, amar e compreender os dias de angustia. Obrigada por serem família! Amo vocês.

Agradeço à Profa. Dra. Simone Neumann Wendt pela orientação, paciência e amizade.

Agradeço com todo meu coração à minha coorientadora Dra. Valderês Aparecida de Sousa. Obrigada por ser um exemplo de profissional e pessoa. Obrigada pelo acolhimento, ensinamentos, carinho, dedicação, preocupação, incentivo e adoção por 7 semanas. Devo a você cada resultado alcançado.

Obrigada professor Ramiro Faria França pelo auxílio nas análises finais, compreensão e parceria.

A Marianne Bernardes e Daiane Rigoni Kestring pela infinita paciência, ensinamentos, apoio e, principalmente, pelas consultas psicológicas. Obrigada por amenizarem as pedras no caminho!

Não posso deixar de agradecer a Gianna Lang, pelo carinho, conversas, amizade, apoio, noites frias de brigadeiro e pão de queijo perto da lareira.

Obrigada Flávia Rafaela Reffatti pela ajuda e amizade. Por me tirar dos dias tristes e ser minha fiel escudeira sempre.

Agradeço a minha companheira de aventura Ana Claudia Schillemer dos Santos, pelos sorrisos e lágrimas, pelo ombro amigo, pelos dias de angustia e vitória regados à café, chá e muita força de vontade! Foram dias árduos que sozinha eu não conseguiria. Obrigada pela ajuda e companheirismo.

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo estabelecer um protocolo de manuseio eficiente do pólen das seguintes espécies de *Pinus*: *P. taeda* L., *P. elliottii* Engelm. e *P. maximinoi* H.E. Moore, além da variedade *P. caribaea* var. *caribaea*. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pólen da Embrapa Florestas, Colombo/PR, na Universidade Federal do Paraná - UFPR, no Setor de Ciências Agrárias, Curitiba/PR e no Laboratório de Tecnologia da Madeira da UTFPR, Dois Vizinhos/PR. A extração do pólen dos amentilhos foi realizada com o auxílio de peneiras. Para a secagem do pólen foram utilizados três métodos: a) secagem a vácuo com sílica-gel, b) secagem em estufa (máximo 30 °C), e c) liofilização. Para os testes de germinação *in vitro* foram utilizados diferentes meios de cultura considerando diferentes açúcares (10%), sendo eles, sacarose (padrão), glicose, galactose e xilose, empregando o meio padrão Brewbaker & Kwack e ágar 8 g.L⁻¹. Os ensaios de germinação foram conduzidos no delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições e a contagem de 300 grãos por repetição. A análise de variância considerou os dados de germinação transformados em $\text{arc sen}\sqrt{P}/100$. O teste Tukey (1%) de comparação de médias foi utilizado na análise dos dados. Verificou-se que o meio de cultura contendo xilose, não é indicado para o teste de germinação *in vitro* de pólen de *Pinus*. A sacarose (meio padrão), proporciona maiores porcentagens de germinação, sendo a mais adequada para as três espécies testadas. Os maiores índices foram de 59% e 58% alcançados para as espécies *P. elliottii* e *P. taeda*, respectivamente. O mesmo acontece para o desenvolvimento do tubo polínico dos grãos de pólen, para as espécies *P. maximinoi* com média de 77µm e *P. elliottii* com média de 75µm de comprimento total do tubo. Os métodos de secagem em estufa e a vácuo são eficientes e indicados para auxílio na criopreservação. Entretanto, a secagem em liofilizador não foi possível pela característica do pólen (alado). O pólen apresentou um comportamento distinto do habitual, não estando descrito em nenhuma literatura. Portanto, é necessário ainda que se aprofunde os estudos de germinação, viabilidade e comportamento do pólen em diversas condições e concentrações.

Palavras-chave: Polinização controlada, Híbridos, Germinação.

ABSTRACT

The objective of this work is to establish a protocol for the efficient management of *Pinus* species: *P. taeda* L., *P. elliottii* Engelm. E *P. maximinoi* H.E. Moore, in addition to the variety *P. caribaea* var. *Caribaea* UFPR, no Agrarian Sciences Sector, Curitiba/PR and UTFPR Madeira Technology Laboratory, Dois Vizinhos/PR. An extraction of the pollen from the food was carried out using sieves. A) vacuum drying with silica gel, b) oven drying (maximum 30°C), and c) lyophilization. For the in vitro germination tests, different culture media considered different (10%) were used, such as sucrose (standard), glucose, galactose and xylose, using the Brewbaker & Kwack and agar 8 g.L⁻¹. The germination tests were conducted without experimental design in randomized blocks with four replicates and a count of 300 grams per replicate. The analysis of variance considers the germination data transformed into $\text{arc sen}\sqrt{P}/100$. The Tukey test (1%) of means data were used in the data analysis. It has been found that the culture medium contains xylose, it is not indicated for the in vitro germination test of *Pinus* pollen. Sucrose (standard medium), which offers higher percentages of germination, being more suitable for three quality trials. The highest indices were 59% and 58% for *P. elliottii* and *P. taeda*, respectively. The same happens for the development of the pollen tube of the pollen grains, for the species *P. maximinoi* with average of 77µm and *P. elliottii* with average of 75µm of total length of the tube. Greenhouse drying methods and a vacuum are efficient and indicated for aid in cryopreservation. However, drying in a freeze dryer was not possible for the pollen (winged) characteristic. The pollen presented a behavior different from usual, and is not described in any literature. Studies on germination, viability and behavior of populations and concentrations are therefore needed.

Keywords: Controlled Pollination, Hybrids, Germination.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem a 1% pelo teste de Tukey.	32
Tabela 2. Correlação entre espécies e meio de cultura utilizados no teste de germinação <i>in vitro</i>	33
Tabela 3. Médias de secagem não diferem a 1% pelo teste de Tukey.	37
Tabela 4. Comprimento do tubo polínico em relação ao açúcar utilizado no meio de cultura.	37
Tabela 5. Comprimento do tubo polínico em relação a espécie para cada meio de cultura.	39
Gráfico 1. Comportamento de cada meio de cultura utilizado para cada espécie.	33
Gráfico 2. Comportamento das espécies em cada meio de cultura utilizado para o teste.	33
Gráfico 3. Variação no comprimento entre meios de cultura para uma mesma espécie.	37
Gráfico 4. Variação no comprimento entre espécies para um mesmo meio de cultura.	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura dos quatro tipos básicos de pólen em coníferas. a) sacular, b, c e d não sacular.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2.** Identificação da germinação de pólen através de microscopia eletrônica. a) núcleo do óvulo, b) ponta do tubo polínico em crescimento.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Pólens para hidratação e utilização no teste de germinação *in vitro*. ... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.** Tratamentos após o gotejamento de safranina.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5.** Emissão do tubo polínico das tres espécies testadas com o meio padrão. Figuras a) e b) *P. taeda*; c) e d) *P. maximinoi*; e) e f) *P. elliotii*. A barra resresenta 100 µm da escala utilizada.....40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1	IMPORTÂNCIA DO SETOR FLORESTAL	11
3.2	O GÊNERO <i>PINUS</i> NO BRASIL	12
3.3	DESCRIÇÃO DO GÊNERO	13
3.4	A HIBRIDAÇÃO NO INCREMENTO DE PRODUTIVIDADE	16
3.5	FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DO PÓLEN.....	18
3.5.1	Manejo do Pólen.....	18
3.5.2	Fatores Genéticos, Fisiológicos e Físicos	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	ÁREA DE ESTUDO	26
4.2	MATERIAL VEGETAL	26
4.3	EXTRAÇÃO DO PÓLEN	26
4.4	SECAGEM DO PÓLEN	27
4.5	TESTES DE GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> SOB DIFERENTES MEIOS.....	27
4.6	DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO	31
4.7	CORANTES ESPECÍFICOS	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	GERMINAÇÃO.....	31
5.1.1	Diferentes Meios de Cultura.....	31
5.1.2	Secagem.....	35
5.2	DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLÍNICO.....	36
5.3	CORANTES ESPECÍFICOS.....	41
6	CONCLUSÃO	42
	REFERENCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A introdução de espécies exóticas no Brasil proporcionou grandes benefícios para o desenvolvimento socioeconômico de diversas regiões do país em função da crescente demanda de madeira, celulose e outros subprodutos. A demanda por produtos madeireiros e não madeireiros ainda é crescente e as espécies utilizadas para extração da matéria prima, devem ser constantemente selecionadas e melhoradas.

Para assegurar o sucesso das polinizações controladas para a produção de híbridos, é essencial que o pólen utilizado apresente boa viabilidade. Não são necessários testes de viabilidade se o mesmo for colhido de flores no estágio de desenvolvimento adequado, preparado corretamente e imediatamente utilizado nos cruzamentos controlados. Contudo, é comum que o pólen a tenha sido colhido em outra região ou fornecido por meio de intercâmbio como outras instituições sem o devido cuidado no manuseio e transporte.

Por outro lado, a necessidade do armazenamento do pólen, faz-se necessário porque não há coincidência de floração entre as espécies desejadas e, portanto, torna necessário, que o pólen colhido seja armazenado por um maior período de tempo, para ser utilizado no ano seguinte de floração. Neste caso, é necessário testar sua viabilidade, antes do procedimento de hibridação para que o resultado dos cruzamentos controlados seja efetivo.

Alguns métodos encontram-se disponíveis para avaliação da viabilidade do pólen quando for necessária, dentre eles destaca-se a germinação *in vitro*, capaz de distinguir os grãos viáveis dos inviáveis, pela emissão dos seus tubos polínicos em um meio de cultura específico. Esse tipo de teste busca reproduzir as condições naturais do estilete e estigma, onde o pólen germina e se desenvolve. O sucesso da germinação *in vitro* depende da temperatura, período de incubação e composição dos meios de cultura para cada espécie estudada.

Outra maneira para se determinar a viabilidade do pólen é utilizando o método colorimétrico empregando corantes específicos, que apresentam a viabilidade dos pólenes através de uma coloração característica.

Os grãos de pólen das coníferas estão disponíveis em grandes quantidades, sendo que a maior parte pode ser armazenada durante vários anos e apresentam boa germinação em meio de cultura. Essas características tornam mais fáceis o desenvolvimento de protocolos de coleta, extração, secagem, armazenamento e testes de viabilidade do pólen para esse gênero.

O armazenamento a médio e longo prazos são desejáveis pois possibilitam o cruzamento de materiais que não apresentam sincronia na liberação de pólen e receptividade dos estróbilos femininos, além de preservar a variedade genética, através de coleções em bancos de germoplasma.

Procedimentos adequados de coleta e processamento do pólen para o armazenamento são essenciais. A secagem do material armazenado é de fundamental importância, contribuindo para a redução do metabolismo do pólen, da probabilidade de injúrias e da possibilidade de contaminação por patógenos. Sendo assim, a secagem do pólen aliada ao armazenamento em baixas temperaturas permite a manutenção da viabilidade de pólen por maior período de tempo.

Diversos aspectos contribuem para o sucesso dos programas de melhoramento genético quando se pretende empregar a técnica de hibridação, desde a coleta do pólen, a secagem, o armazenamento correto e a verificação da viabilidade do mesmo, antes de se efetuar a polinização controlada. Embora o pínus seja amplamente empregado nos plantios florestais, ainda carece de estudos nestas áreas, para as diversas espécies do gênero, uma vez que o comportamento aos diversos procedimentos é específico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na germinação de três espécies do gênero *Pinus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Comparar dois métodos de secagem de pólen de *Pinus* visando a criopreservação;
- II. Otimizar o meio de cultura para a germinação do pólen de *Pinus*;
- III. Identificar a melhor concentração de corantes específicos para estimar a viabilidade do pólen de *Pinus*;
- IV. Identificar o meio que melhor detecte a viabilidade do pólen favorecendo o desenvolvimento do tubo polínico de cada espécie testada

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 IMPORTÂNCIA DO SETOR FLORESTAL

Embora nos anos 1965 a participação do setor florestal na economia fosse insignificante (valverde et al. 2004), hoje a mesma desempenha um papel expressivo, contribuindo significativamente na economia nacional, tanto pelo aumento do volume de bens de consumo interno e de exportação quanto pela contribuição no desenvolvimento social através da geração de empregos diretos e indiretos (SHIMIZU, 1988).

Do ponto de vista ambiental, a atividade florestal contribui para a conservação da natureza, promoção da biodiversidade, recuperação de áreas degradadas, manutenção dos regimes hídricos e manutenção da qualidade do ar e da água (DRESH et al., 2014 pág.82).

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a cobertura florestal mundial é de aproximadamente quatro bilhões de hectares. Destes, 20 % pertencem à Rússia, 13 % Brasil, Canadá e Estados Unidos da América com 8 % cada um, e China com 5 %, os quais juntos representam 53% de toda cobertura florestal (DERAL, 2015).

O Brasil possui 7,74 milhões de hectares de florestas plantadas, o que corresponde a 0,9 % do território nacional, que são responsáveis por 91 % de toda a madeira produzida para fins industriais no país. O restante são florestas nativas legalmente manejadas (IBÁ, 2015).

Diversas empresas fazem parte do setor de florestas plantadas, bem como investidores e empresários que fornecem desde insumos básicos até máquinas específicas para a atividade florestal, estes são responsáveis pela produção do início ao fim, seja no plantio em viveiro, no corte florestal, até os processamentos finais tais como a transformação da madeira ou a produção da celulose (IBÁ, 2015).

O setor florestal brasileiro é um dos mais desenvolvidos e competitivos do mundo, sendo possível perceber que nos últimos dez anos, o país aumentou sua produção em 27 %, com crescimento médio de 2,7 % ao ano (BRACELPA, 2013).

O desenvolvimento socioeconômico e o aumento de renda da população proporcionaram a inserção de novos consumidores no mercado, o que resultou em maior demanda por produtos madeiráveis e não madeiráveis (BRACELPA, 2013).

No ano de 2013, a extração de produtos não madeireiros de florestas plantadas foi de 203.008 ton, sendo divididas em: 72.802 ton de acácia-negra (casca); 56.743 ton de eucalipto (folha); 73.463 ton de resina de pinus (IBGE 2015).

O produto mais exportado no ano de 2014 foi a celulose (IBGE, 2015). Os estados Bahia, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul são os principais produtores, com os principais destinos: Estados Unidos, China (IBGE, 2015).

As exportações nacionais dos produtos provenientes da atividade florestal madeirável, geraram receita aproximada de U\$S 10,36 bilhões em 2014, superando em 4% o resultado do ano anterior. Desta receita total, 52 % são provenientes da produção de celulose, a produção de madeira e papel vem com 20% e os móveis com produção de 8% (DERAL, 2015).

3.2 O GÊNERO *PINUS* NO BRASIL

A política de incentivos fiscais ao reflorestamento vigorou de 1965 a 1988, acarretando um crescimento significativo da área reflorestada no Brasil (VALVERDE et al., 2004). Entretanto, no período anterior aos incentivos fiscais, foram feitos esforços pioneiros na introdução de plantios homogêneos de *Eucalyptus* e *Pinus*, muitos dos quais com intuito científico ou até mesmo ornamental (SHIMIZU, 2001).

Shimizu (2009) citado por Faccio (2010), afirma que as espécies de *Pinus* vêm sendo introduzidas no Brasil há mais de um século e são plantadas em escala comercial há mais de 30 anos, para as mais variadas finalidades. O crescente interesse nessa espécie deve-se principalmente ao rápido crescimento, à boa qualidade da madeira e à adaptabilidade ao clima e ao solo das Regiões Sul e Sudeste do Brasil (ANTONÂNGELO & BACHA, 1998).

De acordo com Pereira (1990), as coníferas são, em sua maioria, espécies de regiões frias, onde se constituem na principal fonte de produtos florestais para essas regiões. As espécies de *Pinus* se adaptaram muito bem no Brasil e graças à avançada

tecnologia silvicultural brasileira promove-se aqui produtividade dez vezes maior que as de muitos países de clima temperado (VALVERDE et al., 2004).

Valverde et al. (2004), garantem que esse rápido crescimento das plantações florestais confere ao país uma vantagem competitiva invejável e assustadora aos concorrentes, devido às condições favoráveis de clima, solo, extensão territorial, mão-de-obra, infraestrutura e capacidade gerencial produtiva.

Cabe ressaltar que a utilização dessa espécie exótica contribui para abastecer o mercado, antes atendido por espécies nativas. De acordo com a ABRAF, as plantações de *Pinus* cobrem 1.562.782 hectares do território nacional e estão concentradas principalmente na Região Sul do país (84,7%), devido às condições edafoclimáticas e à localização dos principais centros processadores desse tipo de madeira. O estado do Paraná é o líder no *ranking* de área plantada de *Pinus* spp. com 39,7 % da área total, seguido por Santa Catarina, que possui 34,5 % (ABRAF, 2013).

3.3 DESCRIÇÃO DO GÊNERO

Farjon (1998) citado por Fernando et al., (2001) relata que as coníferas são um antigo grupo de gimnospermas lenhosas que é atualmente constituído por oito famílias, 68 gêneros, 629 espécies e inúmeras variedades e cultivares. Eles representam algumas das mais importantes espécies de madeira serrada, bem como plantas ornamentais em todo o mundo.

Segundo Ottati (2004), o gênero *Pinus* pertence à família Pinaceae, caracterizada por apresentar árvores altas e monóicas, com folhas de dois tipos: as escamiformes, longas e decíduas, e as aciculiformes, longas e em geral surgindo em fascículos de 2-5 acículas, geralmente três, presas em ramos laterais curtos, de entrenós estreitos, definindo a inserção das folhas em feixes. Os cones masculinos são alongados, pequenos, de até 4 cm de comprimento, dispostos em cachos, e os femininos são cilíndricos a quase globosos, maiores, de até 15 cm de comprimento, com escamas lenhosas, persistentes, espessadas no ápice, cada uma com duas sementes aladas que amadurecem em 2 a 3 anos.

O sistema reprodutivo do *Pinus* é alógomo ou misto com tendência à alogamia, onde a taxa de autofecundação pode variar de 0 % (*P. pungens* e *P. taeda*) a 51 % (*P. merkusii*), porém, na maioria das espécies, há um predomínio de reprodução cruzada (88 %) (SHIMIZU, 2008).

Em algumas espécies de *Pinus* ocorre o fenômeno denominado poliembrionia zigótica, fecundação de um óvulo por mais de um grão de pólen, este poderia gerar indivíduos geneticamente diferentes, porém ocorre uma absorção proembriônica ou embriônica, sobrevivendo somente um embrião por óvulo (LAGOS, 1998).

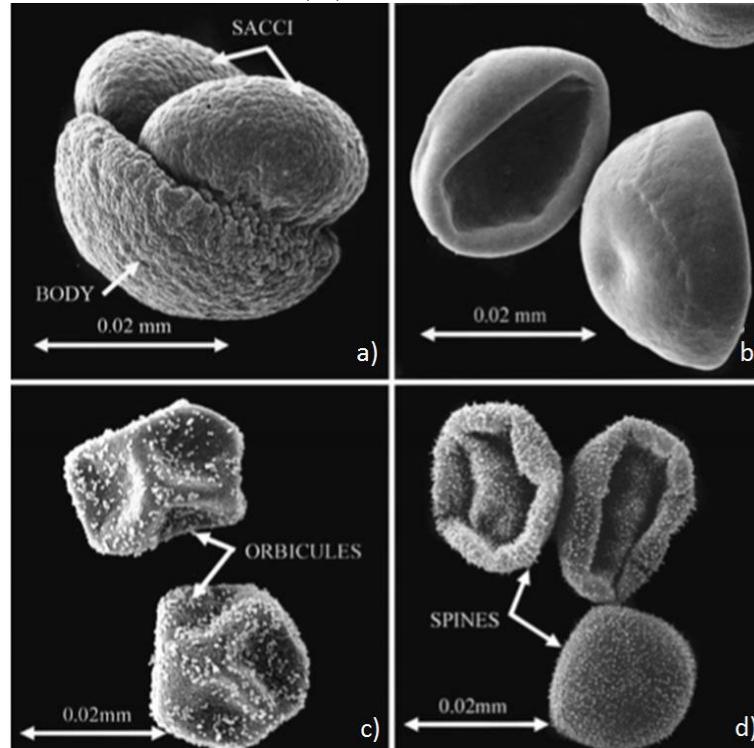
De acordo com Owens et al., (1998) as sementes de gimnospermas são "nuas", o que significa que elas não são completamente fechadas dentro de outra estrutura (cone). Ao contrário das angiospermas, a maioria dos quais são polinizadas insetos (entomofilia), a maioria das gimnospermas são polinizadas pelo vento (anemofilia).

O grão de pólen pode ser auriculado, exibindo dois alvéolos com ar. Essa estrutura provavelmente está relacionada não apenas a anemofilia, mas também na flutuação do pólen pelo líquido da micrópila. Nas coníferas ocorre a sifonogamia, ou seja, formação de tubo polínico funcional, onde o tubo libera enzimas, atravessando o núcleo e penetrando no gametófito feminino para liberar os gametas imóveis diretamente no arquegônio (ALVIM, 2008).

Nas coníferas o pólen pode ser sacular (Figura 1a) ou não sacular (Figuras 1b, 1c e 1d), com (Figura 1b), paredes orbicular (Figura 1c), ou altamente lisas (Figura 1d) e conter números variados de células quando liberado. Estas características podem variar entre as famílias e até mesmo dentro de famílias, como é o caso da Pinaceae (Figura 1a, 1b e 1d), que é a família mais diversa a este respeito (OWENS & SIMPSON, 1986). O pólen das coníferas tem uma esporoderme ou parede multicamadas de espessura.

Na figura 1a é possível a visualização das "asas" que dispersam o pólen (anemocoria). A figura 1b apresenta o recuo do pólen causado pela desidratação normal antes da liberação. Na figura 1c, verificamos a parede orbicular do pólen, enquanto que, na figura 1d, a microscopia apresenta a superfície esculpida (seta). O recuo é devido à secagem natural. Podemos ainda, observar a parede lisa do pólen.

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura dos quatro tipos básicos de pólen em coníferas. a) sacular, b, c e d não sacular.

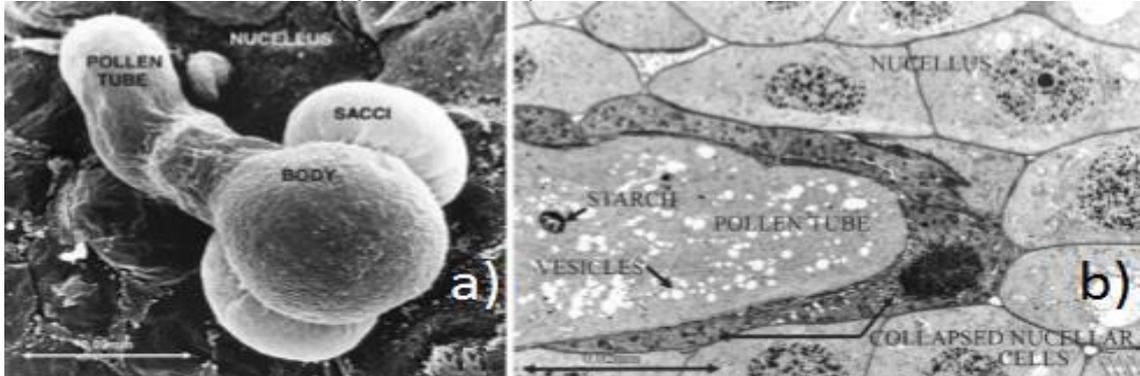


Fonte: Fernando et al. (2005).

O pólen maduro de *Pinus* desidrata quando o teor de água for inferior a 10 % antes de ser liberado. Isso permite que o pólen desidratado possa ser recolhido e armazenado em baixas temperaturas (<20 °C), por vários anos (WEBBER & BONNET 1989). Mas na maioria das condições naturais a umidade não é tão baixa e secagem adicional deve ser efetuada para o armazenamento bem sucedido.

A análise da viabilidade do pólen de pínus pode ser conduzida *in vivo* e *in vitro*. A germinação *in vivo* é demorada e laboriosa enquanto a germinação *in vitro* e com o uso de corantes específicos facilita avaliação de grandes quantidades de pólen. Como exemplo da germinação *in vivo* segue a digitalização de micrografia eletrônica da germinação do pólen de *Pinus* no núcleo do óvulo pode ser vista na Figura 2a, assim como a ponta do tubo polínico em crescimento (Figura 2b).

Figura 2. Identificação da germinação de pólen através de microscopia eletrônica. a) núcleo do óvulo, b) ponta do tubo polínico em crescimento.



Fonte: Fernando; Lazzaro; Owens (2005 p. 153).

3.4 A HIBRIDAÇÃO NO INCREMENTO DE PRODUTIVIDADE

Para a expansão dos plantios de *Pinus*, é preciso que haja disponibilidade de material genético melhorado. Para isso, são necessárias estratégias de melhoramento genético, visando sempre o aumento da produtividade e da qualidade da matéria-prima, à melhoria das condições adaptativas das espécies e, principalmente, à manutenção da variabilidade genética nas populações (SILVA, 2005; MORI, 1993; SEBBENN, 1994).

No melhoramento genético florestal, procura-se explorar a variabilidade natural das espécies mediante seleção de procedências, famílias e indivíduos. O melhoramento de *Pinus* é voltado para a seleção com base em diversas características, tais como volume do tronco, rendimento e qualidade da celulose de fibra longa e rendimento em resina (RESENDE, 1999). A hibridação é uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada para o avanço nas gerações de melhoramento.

Hibridação é a fusão de gametas geneticamente distintos, resultando em indivíduos híbridos heterozigóticos para um ou mais locos. O objetivo da hibridação é reunir em uma nova linhagem pura alelos favoráveis presentes em dois ou mais “genótipos” (MORI, 1993).

Levando-se em conta a melhor composição possível para um híbrido, Fonseca (2010), afirma ser importante, atingir os objetivos e metas de forma mais completa possível. Os genótipos utilizados devem estar bem adaptados ao local de plantio, já

que para a obtenção de um clone com bom crescimento e desenvolvimento deve estar o mais adaptado possível. Outro aspecto importante que deve ser levado em conta é o fator biótico (resistência a pragas e doenças) e o abiótico (resistência ao frio e/ou a seca), nos locais onde os indivíduos serão plantados, para isso, as espécies devem possuir determinada tolerância.

É essencial destacar a importância da fenologia no planejamento da coleta de pólen para o armazenamento, tendo em vista a hibridação de espécies com defasagem de florescimento (PIO 2003). O armazenamento de pólen justifica-se nesses casos ou quando os mesmos se encontram em regiões distintas (PIO et al., 2004).

O melhoramento genético do gênero *Pinus* é focado na produção de papel, celulose de fibra longa, madeira serrada e extração de resina. Entre as melhorias estão o aumento da produção volumétrica e o rendimento de árvores com troncos retos, com um menor número de ramos de maior espessura, o que melhora a indústria de energia da madeira (MISSIO et al., 2004).

Segundo o Instituto Florestal de São Paulo – IFSP, citado por Aguiar et al., (2011), o programa de melhoramento de pinus no Brasil concentra-se nas espécies de maior valor econômico para a produção de celulose e papel, nas Regiões Sul e Sudeste. Dentre estas, destacam-se *P. taeda*, *P. caribaea* var. *hondurensis* e *P. elliottii* (para produção de resina).

No Brasil, os programas de melhoramento genético do *Pinus* têm contribuído com o expressivo aumento da produtividade e a da qualidade dos produtos advindos desta espécie. Esse sucesso deve-se principalmente a utilização da hibridação controlada, técnica que possui inúmeras vantagens na síntese de híbridos, pois, além de proporcionar o conhecimento da capacidade geral e/ou específica de combinação das matrizes, possibilita o cruzamento entre parentais que apresentam defasagem na floração (PEREIRA et al., 2002).

Hibridações bem sucedidas em pinus tem sido obtidas pela combinação de espécies da mesma subseção taxonômica (SHIMIZU, 2008). Como por exemplo, *P. elliottii* var. *elliottii* com espécies de pinus tropicais (*P. caribaea*, *P. tecunimanii* e *P. oocarpa*), que pertencem à mesma subseção Australes (WRIGHT, 1976).

No manuseio de pólen, o desconhecimento da época ideal de coleta do pólen e a utilização de técnicas não adequadas de transporte, extração e armazenamento deste, podem comprometer sua viabilidade e dificultar a produção de híbridos interespecíficos (MENCK et al., 1990).

3.5 FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE E GERMINAÇÃO DO PÓLEN

3.5.1 Manejo do Pólen

Sabe-se que fatores intrínsecos ao próprio pólen, relacionados a seu estado de maturação fisiológica, origem, características genéticas, nutrição da planta, assim como os extrínsecos, quanto composição do meio de cultura, densidade de pólen no meio, temperatura de incubação, período de coleta e agentes ambientais, como temperatura e umidade, tem influência na germinação e na viabilidade do grão de pólen (STANLEY & LINSKENS, 1974).

Durante todo o procedimento de coleta e manuseio de pólen deve-se tomar cuidados para que estes não sejam misturados e contaminados. O pólen de pinus é provido de “asas” para a sua dispersão, deste modo, é necessário um cuidado exclusivo durante seu manuseio (AGUIAR et al., 2011).

A utilização do pólen pode ser realizada de duas maneiras, diretamente no campo a partir de pólen fresco ou utilizando-se pólen armazenado no laboratório, o que tem sido mais frequente.

Segundo Sebbenn (1994), deve-se levar em conta diversos fatores para uma coleta adequada dos estróbilos masculinos, porém o mais importante é a determinação do ponto ideal de maturação desses estróbilos, que permitirá obter pólen viável e em grande quantidade. Os estróbilos verdes não produzem pólen, ou produzem pouca quantidade enquanto que os estróbilos maduros já estão abertos e muitas vezes já liberaram grande quantidade de pólen antes de serem coletados e podem estar contaminados com pólenes estranhos. Portanto, o estágio adequado é quando após uma dobra dos estróbilos, suas escamas se separam, porém, não liberam o pólen, sendo esse estágio chamado de intermediário.

Após a liberação do pólen, o mesmo deve passar por peneiras e depois devem sofrer um processo de secagem. A secagem contribui para a redução do metabolismo do pólen durante o armazenamento, da probabilidade de injúrias pelo congelamento e da possibilidade de contaminação por microorganismos (fungos e bactérias) (SOUSA et al., 2010).

De acordo com Sousa et al. (2010), a secagem pode ser feita em dessecador com sílica-gel e sob vácuo ou em estufa, de preferência com circulação forçada de ar (30 °C), ou ainda no liofilizador para a redução drástica da umidade. O grau de redução da umidade do pólen deve ser compatível com a temperatura de armazenamento desejada. A desidratação deve ser mais drástica para o armazenamento a temperaturas criogênicas (- 80°C a -196 °C). A combinação de liofilização e criopreservação é o método mais promissor para a manutenção da viabilidade do pólen por longo tempo.

No entanto, alguns tipos de pólen não suportam secagem drástica, devido à perda de viabilidade (AGUIAR et al., 2011; SOUSA et al., 2010). O pólen das espécies vegetais pode ser classificado como tolerantes ou sensíveis à desidratação, o pólen binucleado é mais tolerante e o pólen trinucleado é considerado sensível (HUGHES & LEE, 1991). A preservação da viabilidade do pólen envolve a redução do teor de umidade e armazenamento em baixas temperaturas (AKIHAMA et al., 1978). Estudos apontam que a umidade do pólen próxima de 10 %, tem permitido a manutenção da viabilidade (SPRAGUE & JOHNSON, 1977), impedindo a formação de cristais de gelo no processo de congelamento e, conseqüentemente o rompimento da membrana celular e destruição do pólen.

Após a secagem o pólen pode ser armazenado em frascos de penicilina, tubos criogênicos ou *ependorfs*. A escolha do frasco será baseada na quantidade disponível e na temperatura de armazenamento. Cabe destacar que um após o descongelamento o pólen não deve ser congelado novamente (SOUSA et al., 2010) para a manutenção da sua viabilidade.

Dentre as várias metodologias empregadas de avaliação da viabilidade do pólen, destaca-se a germinação *in vitro*, capaz de distinguir os grãos de pólen viáveis dos inviáveis. Este teste busca reproduzir as condições naturais do estigma e estilete, onde o grão de pólen germina e se desenvolve (SOUSA et al., 2010).

Os meios de cultura preparados com um agente solidificante (ágar ou gelatina) têm sido utilizados com sucesso na germinação do pólen de muitas espécies (SOUSA-LANG & PINTO, 1997). Conforme Stanley & Linskens (1974), o agente solidificante promove, além da incorporação da sacarose ou estimulantes de germinação, a umidade relativa constante e condições aeróbicas adequadas para uma boa germinação polínica.

Os açúcares também desempenham papel importante no meio de cultura e vários trabalhos indicam a sacarose, como agente estimulante da germinação do pólen, sendo empregada por vários pesquisadores. Dafni (1992), citada por (SOUSA et al., 2010) ressalta que as concentrações ideais de sacarose, em testes de germinação para os diferentes tipos de pólen, devem ser realizadas no intervalo de 0 e 500 g.L⁻¹. Embora a concentração ideal para se promover a germinação *in vitro* possa variar entre as espécies, a sua amplitude encontra-se nesse intervalo indicado.

Além disso, outros elementos químicos podem ser importantes na emissão do tubo polínico, destacando-se o boro (B), cálcio (Ca), além de magnésio (Mg) e potássio (K) em menor grau. A germinação *in vitro* é estimulada pela adição desses elementos ao meio de cultura, submetendo o pólen a uma condição semelhante à encontrada no estigma (AGUIAR et al., 2011)

Outra maneira para se determinar a viabilidade do pólen é utilizando o método colorimétrico. Entretanto, alguns autores relatam que os corantes utilizados reagem com constituintes químicos ou estruturais do grão de pólen, cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar (EINHARDT et al., 2006). Sendo assim, os resultados obtidos podem superestimar a real viabilidade do pólen analisado.

Existem diversos corantes disponíveis e o tipo mais indicado, bem como a concentração a ser utilizada, deve ser testada para cada espécie. Alguns estudos indicaram que 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) reflete a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. A atividade enzimática do grão de pólen é associada à sua capacidade de germinação (DERIN & ETI, 1999). Quando o TTC reage com o hidrogênio produzido pela respiração celular dá ao pólen uma coloração vermelha (HOEKSTRA & BRUINSMA, 1975). Esse

corante tem sido também amplamente utilizado na avaliação de viabilidade de sementes.

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 e RIGAMOTO & 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.

A utilização do método de coloração para estimar a viabilidade do pólen é bastante atrativa pela sua simplicidade e rapidez na obtenção dos resultados, pois basta colocar o corante em contato com os grãos de pólen sobre uma lamínula que a contagem dos grãos de pólen viáveis pode ser realizada. Entretanto, deve-se referendar esses resultados com estimativas fornecidas por testes germinativos para indicar um corante que seja realmente efetivo na determinação da viabilidade do pólen.

3.5.2 Fatores Genéticos, Fisiológicos e Físicos

Como fatores físicos, Pharis et al., (1969), citado por Pharis (1976), constataram que para determinadas espécies de coníferas de zonas temperadas, o desenvolvimento dos estróbilos para o desprendimento do pólen e receptividade da flor feminina, é influenciado pelo comprimento do dia e baixa temperatura. A alta umidade impede a liberação dos pólenes dispersos pelo vento e, durante delongados períodos chuvosos, os amentilhos superamadurecidos caem ainda com os grãos de pólen (CHRISTIANSEN, 1960; citado por KRUGMAN et al., 1974).

WRIGHT (1976) cita que a viabilidade do pólen é diretamente afetada sob condições de alta umidade relativa. A viabilidade do pólen para certas angiospermas limita-se entre minutos ou horas, ou até mesmo poucos dias até várias semanas (MAHESHWARI, 1950), enquanto para as gimnospermas, a viabilidade do grão de pólen pode ser preservada por várias semanas, se protegido da luz solar direta. A viabilidade do pólen é influenciada por baixas temperaturas, acarretando a sua esterilidade, bem como pelos ventos fortes que ocasionam a sua liberação prematura

e imediata dessecação, é também afetada pelas altas umidades (KRUGMAN et al., 1974).

O primeiro passo na coleta de pólen é o entendimento da fisiologia e fenologia das espécies florestais. Adaptações naturais, diferenças climáticas, e as tendências se combinaram para criar um complexo sistema de sincronização entre a produção de pólen e receptividade das flores. Estudos científicos mostram que, geralmente, o período de maior dispersão de pólen e receptividade das flores ocorre simultaneamente em pinheiros naturais (BOYER, 1981; BRAMLETT, 1973). No entanto, a variação entre a produção de pólen e receptividade, mesmo entre indivíduos dentro do mesmo pomar, pode limitar a fertilização e a polinização cruzada ou aberta.

Os nomes comuns para estas estruturas reprodutivas são "*catkins*", "amentilho" ou "estróbilo masculinos". Os estróbilos masculinos ocorrem tipicamente em ramos de crescimento lento na coroa inferior da árvore, uma evolução natural para evitar a autopolinização. O estróbilo feminino ocorre na copa das árvores coníferas na parte superior. Os botões desenvolvem estróbilos megasporangiados femininos ou masculinos (microesporangiados) durante o primeiro ano. A temperatura ambiente do ar, altitude acima do nível do mar, e a precipitação são os fatores mais importantes no desenvolvimento e dispersão de pólen (TIGHE, 2004).

Chuvas no início da temporada que ocorrem antes do início da estação chuvosa, podem favorecer o desenvolvimento de estróbilos masculinos e femininos em muitas espécies de pinheiro (BENGTSON, 1969). Ainda segundo o mesmo autor, o ritmo de desenvolvimento dos estróbilos aumenta durante a próxima estação chuvosa, depois da dispersão do pólen e se inicia durante a próxima estação seca (dependendo da temperatura e umidade). Esta alternância nos ciclos, em ambientes tropicais, propicia às espécies a produção de estróbilos masculinos e femininos. Embora não haja um tempo máximo de produção e capacidade de resposta devido a influências climáticas (secas e chuvas sazonais).

Tighe (2004) afirma que temperaturas abaixo das desejáveis ocasionam desenvolvimento médio do pólen, consideravelmente como às temperaturas acima da média no desenvolvimento esperado para a maioria das espécies. O estróbilo masculino se desenvolve e amadurece durante o verão ou estação seca até o nível

de umidade diminuir a um teor pré-determinado pela natureza e começar sua abertura (TIGHE, 2004).

Embora a germinação do pólen em coníferas seja lenta, eles germinam facilmente *in vitro* e percentagens muito elevadas de germinação tem sido relatada para diferentes espécies de *Pinus*. A extração do pólen na fase correta de desenvolvimento e o armazenamento no nível de umidade e temperatura adequadas melhoram significativamente as taxas de germinação (FERNANDO & OWENS, 2001).

Os fatores genéticos e fisiológicos também afetam a longevidade do pólen. Vários autores descrevem que grãos de pólen binucleados possuem maior viabilidade, comparados com os trinucleados, que se classificam em tolerantes ou sensíveis à desidratação, respectivamente.

Dentre as plausíveis explicações para o fato, Sousa (1988) menciona que a segunda divisão meiótica coíbe o grão de pólen de reservas suficientes para propiciar uma apropriada longevidade e germinação. Kirby & Smith (1974) concluem que há maior quantidade de compostos de superfície na parede dos polens binucleados. O pólen das gramíneas por exemplo, é trinuclear, incluindo o milho, dificultando, assim, a armazenagem de gametas masculinos.

O estado nutricional da planta fornecedora do pólen é ainda um fator a ser considerado. Stanley & Linskens (1974) comprovaram que a nutrição mineral da planta, durante o desenvolvimento do pólen, afeta sua longevidade. Estes autores enfatizaram a sensibilidade que as anteras apresentam ao boro, cuja deficiência pode levar determinados tecidos ao colapso e induzir uma concentração nuclear atípica, motivada pela inibição da divisão nuclear. O desenvolvimento da parede pode ser anteparado e, em muitos casos, acarretar na desintegração da célula. Os autores ressaltam, ainda, que pode acontecer a produção de pólen irregular, mesmo quando a parede da antera continuou crescendo e o saco embrionário parecer inafetado.

Dentre os fatores que mais influenciam na longevidade dos grãos de pólen durante o armazenamento, destacam-se a umidade relativa, a temperatura e as embalagens de armazenamento. Tais variáveis devem ser estabelecidas para assegurar a manutenção da viabilidade por um período maior possível sem decréscimo na qualidade do material (Sousa, 1988). A maioria dos métodos utilizados

envolve a redução do teor de água e a conservação do pólen à baixa temperatura, de modo que as oscilações sejam evitadas.

Outro fator que interfere na conservação da qualidade do pólen é o tipo de armazenamento, que pode ser classificado em curto, médio e longo prazos. De acordo com Sousa (1988), normalmente, procede-se o armazenamento a curto e médio prazo visando estudos de genética e de melhoramento, e, a longo prazo, especialmente para a conservação genética sendo comum ocorrerem alterações que podem levar, após muitos anos, a populações geneticamente diferentes das originais.

3.6 METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE GRÃOS DE POLEN

Várias técnicas são encontradas na literatura para avaliação da viabilidade do grão de pólen, como a germinação *in vivo*, *in vitro* e o teste com corantes químicos, (PIO, 2004). A coloração é um teste simples, barato e que possibilita resultados rapidamente, tornando-se bastante atrativo para a avaliação dos grãos de pólen. Pressupondo uma correlação entre a viabilidade e a coloração, a avaliação é dada pela contagem dos pólenes viáveis e corados e não corados, respectivamente.

Diversos são os corantes empregados para essa finalidade. Dentre eles, destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio, cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), (STANLEY & LINSKENS, 1974) e verde malaquita com fucsina ácida (ALEXANDER, 1969 e 1980). Na literatura maior parte dos trabalhos descreve o uso dos corantes nucleares, sobretudo o carmim acético, para vários grupos de plantas.

No entanto, Andrés et al. (1999) concluíram que o carmim acético foi deficiente para constatar a viabilidade do pólen, comparado à germinação *in vitro*, em que se avaliou o desenvolvimento do tubo polínico. Neste caso, o carmim acético superestimou os dados.

O emprego desses corantes foi questionado por Alexander (1969), pelo fato de os grãos de pólen inviáveis ou abortados não serem corados. O autor explica que esse é um fator limitante no estudo de pólenes com paredes espessas, mucilaginosas e com

a presença de espículas, já que elas impedem a penetração do corante e, conseqüentemente, sua coloração. Nessa condição, polens viáveis podem não exibir coloração e ser erroneamente classificados como abortados.

O teste calorímetro, embora seja um procedimento simples e barato, não é inteiramente confiável, pois, conforme já exposto, pode fornecer uma informação equivocada da viabilidade. Pode-se, então, optar simultaneamente pela observação da capacidade germinativa dos grãos de pólen, por ser um caráter que se correlaciona absolutamente com a habilidade para fertilização (ALVIM, 2008). Portanto, apesar do seu grande potencial, os corantes específicos podem superestimar ou subestimar a viabilidade do pólen. O ideal seria encontrar um corante específico em uma concentração tal que se aproximaria da germinação *in vitro*.

Nos testes de germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre um determinado meio de cultura, contendo um açúcar (sacarose, etc.), elementos químicos necessários a germinação e um produto solidificante para permitir a germinação na superfície do meio sendo que a viabilidade é estimada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico (SOUSA, 1988). São considerados germinados os grãos que apresentam tubos polínicos com comprimentos maiores do que o maior diâmetro do próprio grão de pólen.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Pólen da Embrapa Florestas, no município de Colombo – PR, na Universidade Federal do Paraná, no setor de Ciências Agrárias e na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, no Laboratório de Tecnologia da Madeira, em Dois Vizinhos - PR.

4.2 MATERIAL VEGETAL

No presente estudo, foram utilizados os pólenes de três espécies e uma variedade do gênero *Pinus*: *P. taeda* L., *P. elliottii* Engelm., *P. caribaea* var. *caribaea* e *P. maximinoi* H.E. Moore, fornecidos pela Embrapa Florestas.

4.3 EXTRAÇÃO DO PÓLEN

Os ramos contendo os estróbilos da variedade *P. caribaea* var. *caribaea*, foram coletados em Ilha Solteira, estado de São Paulo, e transportados em caixa térmica, refrigerados, até a Embrapa Florestas.

Os estróbilos foram separados dos ramos e dispostos em sacos de papel Kraft, abertos em ambiente controlado e mantidos durante 24 horas, para que perdessem o excesso de umidade naturalmente, propiciando a abertura das escamas dos amentilhos garantindo uma extração eficiente.

A extração do pólen foi realizada utilizando peneiras (TYLERMESH 170). Os estróbilos maduros foram colocados sobre a peneira, separando o pólen das demais estruturas dos estróbilos com leves batidas, evitando que o material fosse espalhado no ambiente, pela sua característica de fácil dispersão.

Parte do material extraído foi utilizado para o procedimento de secagem e submetido a um teste de germinação *in vitro* com meio de cultura contendo sacarose 10%, enquanto a outra parte, foi utilizada para o teste de viabilidade com corantes específicos (azul de anilina e cloreto de 2,3,5, trifenil tetrazólio).

4.4 SECAGEM DO PÓLEN

Para a secagem do pólen foram utilizados três métodos: 1) secagem a vácuo com sílica gel, 2) secagem em estufa a 30°C e 3) liofilização.

Na secagem em estufa o pólen foi submetido a temperaturas de 30°C, para secagem. O material permaneceu por 24 horas nas condições da estufa até estabilização do seu peso.

No método a vácuo, o pólen permaneceu no dessecador com sílica gel, sob vácuo, a temperatura ambiente, durante 24 horas.

Para o processo de liofilização os frascos de penicilina contendo os grãos de pólen foram tampados com fita adesiva perfurada para admitir a passagem da água presente no material, em seguida, foram dispostos em frascos especiais para que esta fosse encaixada no aparelho e aplicado o vácuo.

O material seco foi submetido a um teste de germinação *in vitro*, com meio padrão (Meio Brewbaker & Kwack (1963) com 10 % de sacarose), para análise da eficiência e interferência dos métodos.

4.5 TESTES DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* SOB DIFERENTES MEIOS

Todos os materiais empregados foram esterilizados com hipoclorito 1% e estufa a 30 °C ou autoclavados a 120°C por 20 minutos, antes da sua utilização na montagem dos testes.

Para o teste de germinação *in vitro* a metodologia utilizada foi de Stanley e Linskens (1974), onde o pólen foi depositado em um meio de cultura, sobre lâminas de microscopia ótica.

A solução de Brewbaker e Kwack é composta de:

- 100 mg Ácido bórico - H_3BO_3
- 300 mg Nitrato de cálcio tetrahidratado- $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
- 200 mg Sulfato de magnésio heptahidratado – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 100 mg Nitrato de potássio - KNO_3

Quatro meios de cultura foram testados, sendo todos preparados com 0,8 % de ágar

- 1) Meio Brewbaker & Kwack (1963) com 10 % de sacarose (padrão);
- 2) Meio Brewbaker & Kwack (1963) com 10 % de glicose;
- 3) Meio Brewbaker & Kwack (1963) com 10 % de xilose;
- 4) Meio Brewbaker & Kwack (1963) com 10 % de galactose.

Os ensaios de germinação foram conduzidos com delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições. As lâminas foram identificadas indicando os tratamentos de espécie e açúcar conforme o quadro 1:

Tratamentos	Significado
TEG	Tratamento <i>P. elliotii</i> Galactose;
TEGL	Tratamento <i>P. elliotii</i> Glicose;
TES	Tratamento <i>P. elliotii</i> Sacarose (padrão);
TEX	Tratamento <i>P. elliotii</i> Xilose;
TMG	Tratamento <i>P. maximinoi</i> Galactose;
TMGL	Tratamento <i>P. maximinoi</i> Glicose;
TMS	Tratamento <i>P. maximinoi</i> Sacarose (padrão);
TMX	Tratamento <i>P. maximinoi</i> Xilose;
TTG	Tratamento <i>P. taeda</i> Galactose;
TTGL	Tratamento <i>P. taeda</i> Glicose;
TTS	Tratamento <i>P. taeda</i> Sacarose (padrão);
TTX	Tratamento <i>P. taeda</i> Xilose.

Quadro 1 - Tratamentos de acordo com o meio de cultura e a espécie.

Fonte: A autora, 2016.

O pólen utilizado foi distribuído uniformemente sobre uma placa de Petri (uma para cada espécie) em colocado em Gerbox contendo papel filtro umedecido com

água destilada para propiciar um ambiente saturado facilitando a hidratação e ativando o seu metabolismo. Os Gerbox foram alocados aleatoriamente na BOD, sob condições de 25 °C e umidade de 90 %, por 24 horas (Figura 3).

Figura 3. Pólens para hidratação e utilização no teste de germinação in vitro.



Fonte: A autora, 2016.

Os meios foram preparados acrescentando 10 % do açúcar a ser utilizado em cada meio, conforme o tratamento, e 0,8 % de ágar, na solução de Brewbaker e Kwack.

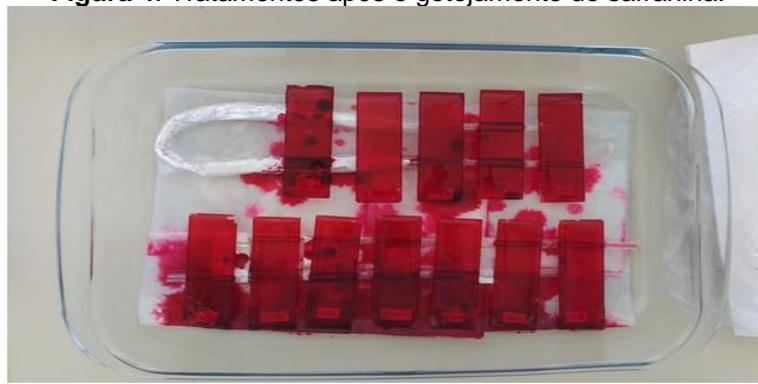
A seguir os erlenmeyers contendo o meio de cultura foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Após o processo de esterilização, o meio foi retirado e colocado em um becker em banho maria, para que não ocorresse a solidificação permitindo a aplicação desse meio sobre as lâminas.

O tratamento contendo glicose, solidificou formando um precipitado ao fundo do frasco, sendo necessária a utilização de um agitador magnético, para atrito e dissolução completa do composto. O meio permaneceu em agitação com velocidade média durante 15 minutos.

Para montar os testes de germinação, foram utilizados 4 mL do meio sobre cada lâmina do teste. Quando as laminas estavam com o meio de cultura solidificado, foram separadas de acordo com as espécies, para que em seguida, com o auxílio de um pincel os pólenes fossem cuidadosamente espalhados de forma uniforme, evitando o agrupamento do pólen, que interfere diretamente no teste, uma vez que há uma tendência de maior germinação do grupo pelo aprisionamento de elementos como o boro e incrementa a dificuldade de avaliação dos pólenes pelo emaranhado de tubos (SOUSA, 1997).

Após a inoculação, os pólenes permaneceram durante 72 horas na BOD, umidade relativa de 90 % e temperatura de 25 °C, período necessário para germinação do gênero. Ao final desse procedimento, foi gotejada a safranina 1% para interrupção do processo e coloração das lâminas (Figura 4). As cubas foram armazenadas em freezer a 20°C de forma que as lâminas puderam ser contadas por vários dias sem a contaminação por fungos e bactérias.

Figura 4. Tratamentos após o gotejamento de safranina.



Fonte: A autora, 2016.

A contagem dos pólenes foi realizada em microscópio óptico com 100 X de aumento (10 da ocular e 10 da objetiva), 300 grãos de pólen em cada repetição foram avaliados, sendo estes germinados ou não germinados. Foram considerados como germinados os grãos de pólen que apresentaram tubo polínico com comprimento maior que seu diâmetro, conforme a metodologia sugerida por Cook e Stanley (1960) citados por Sprague (1977).

Por apresentarem natureza binomial os dados de germinação (%) obtidos para cada repetição foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$, submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro através do software Statistica Release[®] 7.0.

4.6 DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLINICO

Foram mensurados os comprimentos de 30 tubos polínicos de cada lamina que apresentou germinação representativa. Com isso, identificamos o tratamento que melhor proporcionou condições de alongamento do tubo, para cada espécie testada.

A mensuração foi realizada através do programa IS Capture versão 3.5, com câmera acoplada ao microscópio óptico. Os comprimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro através do software Statistica Release ® 7.0.

4.7 CORANTES ESPECÍFICOS

Para a observação dos pólenes viáveis pelo método da coloração foram utilizados corantes em diferentes concentrações:

- 1) Azul de anilina (1,5 %);
- 2) Cloreto de 2,3,5 de trifeniltetrazólio (TTC) (0,5 %, 1,0 % e 1,5 %).

Os pólenes foram distribuídos sobre as lâminas com o auxílio de um pincel pequeno para que fosse então, gotejado o corante sobre o material, com auxílio de um conta-gotas. A lamínula era colocada exatamente onde haviam as gotas do corante, por ter maior probabilidade de reação. As lâminas com os tratamentos permaneceram no Gerbox até que se atingisse o tempo determinado (15, 30, 45 e 60 minutos).

Foram avaliados 300 grãos totais por repetição em microscópio óptico. Quatro lâminas foram avaliadas por tratamento, sendo considerados viáveis aqueles que coloriram e inviáveis aqueles que não coloriram.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 GERMINAÇÃO

5.1.1 Diferentes Meios de Cultura

O delineamento utilizado foi em esquema fatorial 4 (meios de cultura) x 3 (espécies), com 4 repetições (blocos). Os valores obtidos no teste de germinação *in vitro* são variáveis aleatórias discretas com natureza binomial (admitindo apenas dois resultados complementares), sendo a variável resposta o número de sucessos obtidos nas realizações

Após a aplicação da análise de variância (ANOVA), pode-se verificar que o F de tratamentos foi significativo a 1 % de probabilidade, sendo assim, o teste de Tukey foi aplicado para a comparação de médias e então verificou-se que no meio de cultura contendo xilose como tratamento, não houve germinação de nenhum grão de pólen para nenhuma espécie testada, as demais, apresentaram pólen germinado e estão descritas e discutidas abaixo.

Para facilitar a análise dos dados, os tratamentos foram agrupados conforme meio de cultura. A tabela 1 demonstra o teste Tukey 1% de probabilidade:

Tabela 1. Porcentagem de germinação de cada tratamento para o teste de germinação *in vitro*.

Tratamentos	Média (%)
<i>P. elliotii</i> Sacarose (padrão)	59a
<i>P. taeda</i> Sacarose (padrão)	58ab
<i>P. maximinoi</i> Sacarose (padrão)	54b
<i>P. taeda</i> Glicose	22c
<i>P. elliotii</i> Glicose	10d
<i>P. maximinoi</i> Glicose	4e
<i>P. maximinoi</i> Galactose	3e
<i>P. taeda</i> Galactose	2e
<i>P. elliotii</i> Galactose	2e
<i>P. maximinoi</i> Xilose	0e
<i>P. elliotii</i> Xilose	0e
<i>P. taeda</i> Xilose	0e

Fonte: A autora, 2016.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem a 1% pelo teste de Tukey.

A tabela 2 demonstra a interação entre meio de cultura e espécie para o teste de germinação *in vitro*.

Tabela 2. Correlação entre espécies e meio de cultura utilizados no teste de germinação *in vitro*.

Meio de Cultura	Espécies		
	<i>P. elliotii</i>	<i>P. taeda</i>	<i>P. maximinoi</i>
Sacarose	54,33Aa	57,40Aa	54,33Aa
Galactose	9,50Bb	21,50Ba	3,50Bc
Glicose	1,58Ca	2,25Ca	2,50Ba
Xilose	0,00Ca	0,00Ca	0,00Ca

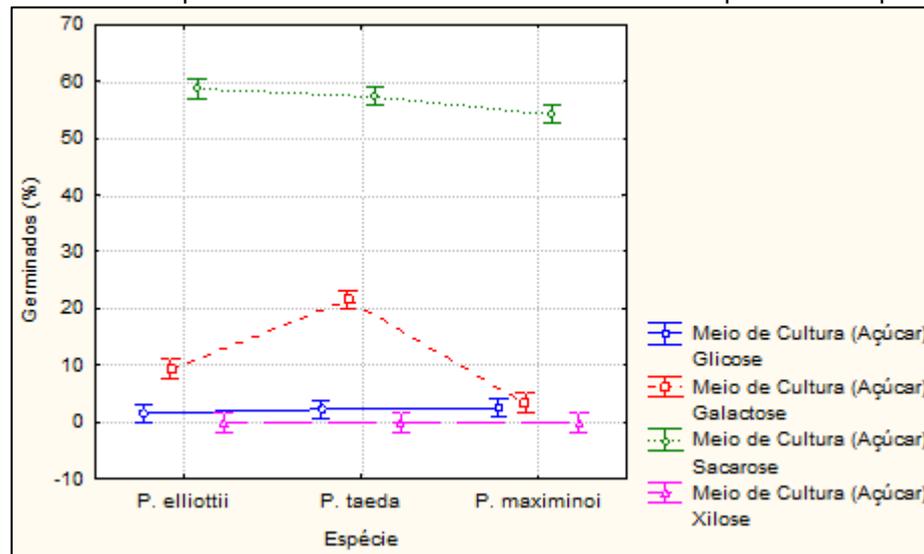
Fonte: A autora, 2016.

Os tratamentos TES (*P. elliotii* sacarose (padrão) e TTS (*P. taeda* sacarose (padrão)), não diferiram significativamente entre si; assim como, (TTS *P. taeda* Sacarose (padrão)) e TMS (Tratamento *P. maximinoi* sacarose (padrão)); enquanto os tratamentos TTGL (*P. taeda* glicose); TEGL (*P. elliotii* glicose), diferem entre si e dos demais.

Os tratamentos TMGL (*P. maximinoi* glicose), TMG (*P. maximinoi* galactose), TTG (*P. taeda* galactose), TEG (*P. elliotii* galactose), TMX (*P. maximinoi* xilose), TEX (*P. elliotii* xilose) e TTX (*P. taeda* xilose), não diferiram entre si significativamente para os valores de germinação do teste *in vitro*.

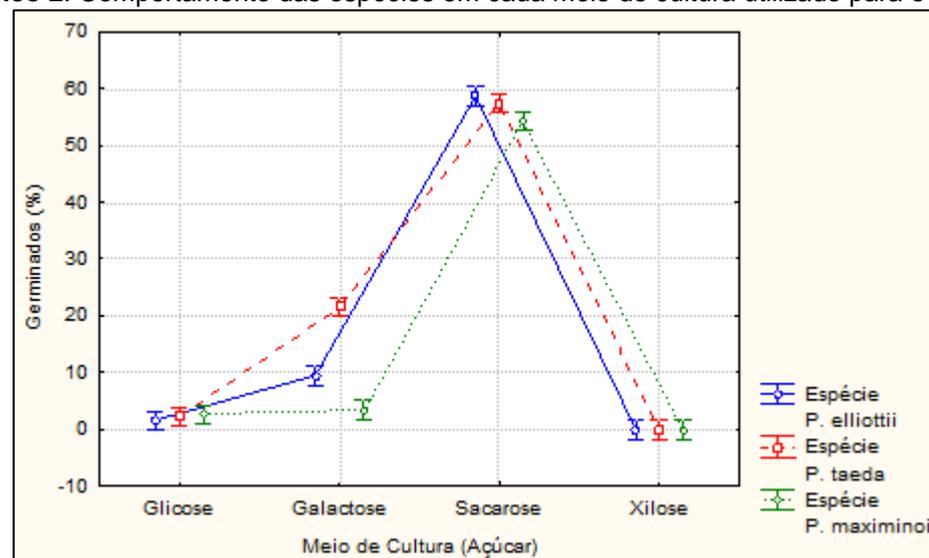
Constatou-se o efeito altamente positivo do meio padrão com sacarose (Gráficos 1 e 2), para as três espécies testadas, com ênfase no *P. elliotii* e *P. taeda*, apresentando os maiores índices de germinação, seguido do meio contendo glicose, galactose e xilose, respectivamente.

Gráfico 1. Comportamento de cada meio de cultura utilizado para cada espécie.



Fonte: A autora, 2016.

Gráfico 2. Comportamento das espécies em cada meio de cultura utilizado para o teste.



Fonte: A autora, 2016.

O açúcar empregado em todos os meios de cultura tem a finalidade de adaptar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornece energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico, variáveis analisadas no presente trabalho (STANLEY & LINSKENS, 1974).

Com a aplicação da ANOVA e teste Tukey 1% observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos. Todas as espécies apresentaram maior número de

pólen germinados em meio de cultura contendo sacarose, podendo assim, este ser classificado como o de maior eficiência para estas condições.

Para o meio contendo Glicose, observa-se que há um declínio na germinação em relação as espécies testadas, podemos ressaltar que a espécie *P. taeda* apresentou melhores resultados, porém, ainda considerados baixos.

O emprego de galactose como principal açúcar do meio de cultura para a geminação do pólen, foi ineficiente nas concentrações de 10%. Contudo, o ajuste de concentração para cada espécie, pode resultar em melhores índices. Pode-se atribuir a ineficiência do açúcar, a competição com a galactose presente na parede celular das células, ou ainda, baixa energia liberada para a germinação.

Almeida et al. (2002) evidenciaram que os meios contendo teor de sacarose 10% proporcionaram maiores índices de germinação, sendo a concentração mais indicada para a germinação in vitro de grãos de pólen de milho, assim como de pinus, ressaltada nos resultados e literatura.

Em um estudo empregando sacarose na germinação de pólen de *Citrus*, os cultivares apresentaram um comportamento semelhante ao do pinus, em que o melhor resultado foi obtido na concentração de 100 gL⁻¹ de sacarose, a partir da qual houve um decréscimo na porcentagem de grãos de pólen germinados (RAMOS et al., 2006).

Os resultados encontrados no presente trabalho correspondem com a maioria encontrada na literatura, onde os autores afirmam que a sacarose é um dos componentes imprescindíveis para a germinação de pólen, além de exercer a função de equilíbrio osmótico da solução e fornecer a energia necessária para o crescimento do tubo polínico, como já citado (GALLETTA, 1983; MIRANDA & CLEMENT, 1990; STANLEY & LINSKENS, 1974).

Deve-se aprofundar os estudos sobre as concentrações no meio de cultura destinado ao teste de germinação, para determinação da concentração adequada para cada espécie testada. Entretanto, os estudos comprovam que a sacarose apresenta melhores taxas de germinação da maioria das espécies estudadas.

MIRANDA & CLEMENT (1990) avaliaram meios com glicose, sacarose, lactose e galactose, para germinação de pólen de *Bactris gasipaes* H.B.K., obtendo o melhor resultado com sacarose a 2,5% e, valores baixos no emprego dos demais açúcares.

Tal comportamento é válido também para os pólenes de *Pinus* spp. testados no presente trabalho.

NEVES et al. (1996) testaram quatro concentrações de galactose, glicose, lactose e sacarose, para a germinação do pólen de cubiuzeiro (*Solanum tojiro* Humb. & Bonpl.) e cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schummann], encontrando maiores índices de germinação em 10, 15 e 20 % de sacarose, sem nenhum efeito dos demais açúcares testados para as duas espécies, ressaltando mais uma vez a eficácia da sacarose no meio de cultura para o teste *in vitro*.

A inibição da germinação em meios contendo xilose e baixos índices em galactose como tratamento, pode ser explicada pela composição da parede celular dos vegetais. A cadeia principal dos polissacarídeos pécnicos é constituída de resíduos de ácido D-galacturônico, intercalados ou não por resíduos de ramnose, e cadeias laterais contendo principalmente arabinose, galactose e xilose (ALKORTA et al., 22 1997; KASHYAP et al., 2001) estreitamente associadas com a celulose na parede celular.

Durante o processo de germinação, o pólen libera substâncias contidas em seu interior que reagem com os compostos do meio de cultura utilizado para o teste. O processo de difusão entre as soluções constituintes do material vegetal e do meio de cultura, fazem com que o soluto passe da solução hipertônica (de maior concentração) para a hipotônica (de menor concentração), até que se atinja o equilíbrio. Neste caso, o açúcar utilizado.

Uma hipótese é de que, as concentrações sejam insuficientes ou superiores ao necessário, competindo com o desenvolvimento do tubo polínico e aumentando a pressão osmótica. Como já citado no texto, a concentração de 10% de sacarose é ideal para as espécies do gênero. Entretanto, não há na literatura dados referentes a cada espécie que possui comportamento diferente, nem ao uso de xilose como açúcar principal.

Como citado na revisão de literatura, os fatores genéticos e fisiológicos também podem afetar a longevidade do pólen, sendo que, grãos de pólen binucleados possuem maior viabilidade, comparados com os trinucleados. Isso explica a boa viabilidade e capacidade de germinação do pólen das espécies de *Pinus* testadas, mesmo permanecendo armazenado por mais de cinco anos.

5.1.2 Secagem

Quando submetidos ao liofilizador os pólenes de *Pinus* foram dispersos no equipamento. Isso se deve, pela característica alada de dispersão pelo vento. Sendo assim, a secagem em liofilizador deve ser aprimorada para que não se perca o material quando retirado o vácuo.

Com a aplicação dos dois métodos de secagem, a germinação do pólen da variedade de *P. caribaea* var. *caribaea* não sofreu alteração em nenhum caso. O teste de germinação apresentou médias que não diferem entre si significativamente, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Médias de secagem não diferem a 1% pelo teste de Tukey.

Tratamento	Médias (%)
<i>P. caribaea</i> secagem a vácuo	70a
<i>P. caribaea</i> secagem a vácuo	72a
<i>P. caribaea</i> secagem em estufa	71a
<i>P. caribaea</i> secagem em estufa	73a

Fonte: A autora, 2016.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO TUBO POLINICO

Os dados obtidos referentes ao comprimento do tubo polínico para meio de cultura contendo sacarose, são apresentados na tabela 4.

Os tratamentos TMS (*P. maximinoi* sacarose) e TES (*P. elliottii* sacarose) não diferiram entre si, enquanto o tratamento TTS (*P. taeda* sacarose), apresentou menor desenvolvimento do tubo polínico.

Tabela 4. Comprimento do tubo polínico em relação ao açúcar utilizado no meio de cultura.

Sacarose	
Tratamento	Comprimento (µm)
TMS	77a
TES	75a
TTS	65b

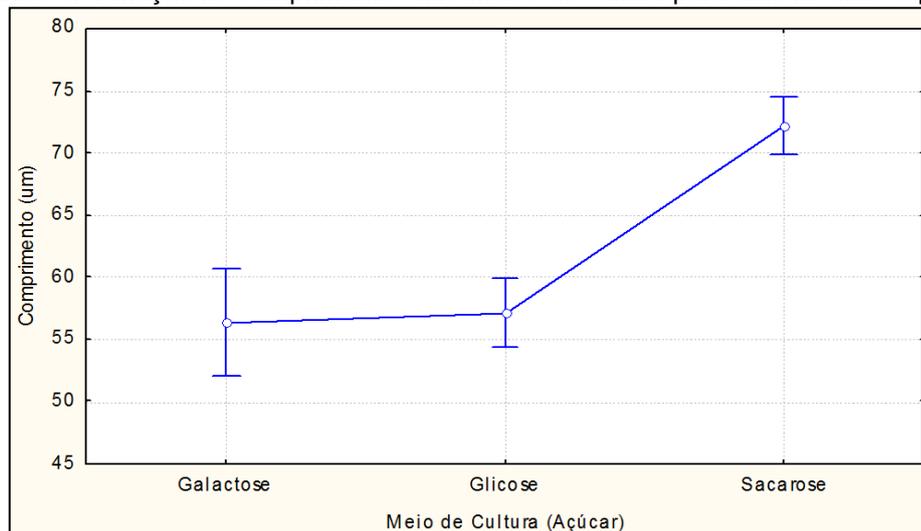
Galactose	
Tratamento	Comprimento (μm)
TTG	64a
TEG	53b
TMG	53b

Glicose	
Tratamento	Comprimento (μm)
TTGL	61a
TMGL	55ab
TEGL	55b

Fonte: A autora, 2016.

A sacarose se mostrou efetiva para as três espécies testadas como demonstrado no gráfico 3.

Gráfico 3. Variação no comprimento entre meios de cultura para uma mesma espécie.

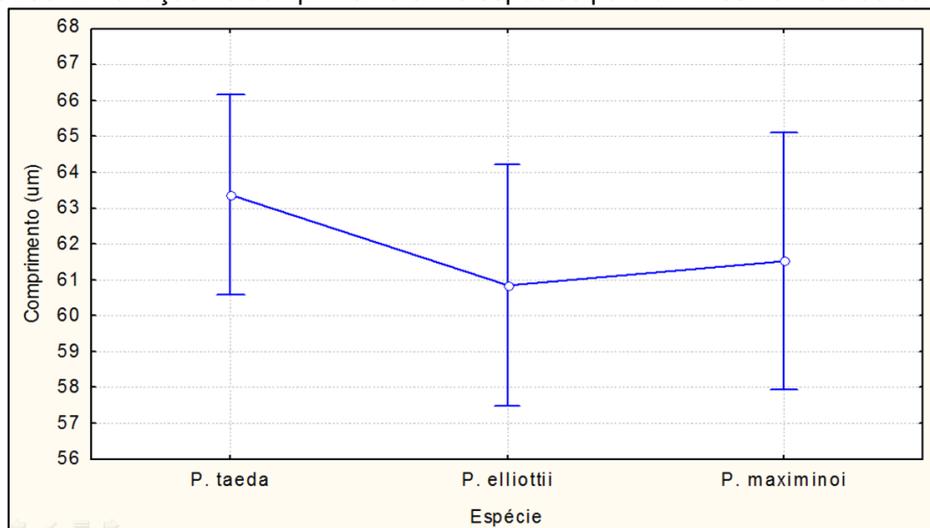


Fonte: A autora, 2016.

O tratamento TTG (*P. taeda* galactose), diferiu dos demais, indicando eficiência na liberação de energia do açúcar para a espécie *P. taeda*. Os tratamentos TEG (*P. elliotii* galactose) e TMG (*P. maximinoi* galactose) não diferiram significativamente.

Os tratamentos TTGL (*P. taeda* glicose) e TMGL (*P. maximinoi* glicose) não apresentaram diferença entre si, assim como TMGL (*P. maximinoi* glicose) e TEGL (*P. elliottii* glicose). Os melhores valores de comprimento de tudo polínico foram obtidos para a espécie *Pinus taeda* (Gráfico 4).

Gráfico 4. Variação no comprimento entre espécies para um mesmo meio de cultura.



Fonte: A autora, 2016.

Os resultados foram agrupados também de acordo com a espécie, para melhor visualização da eficiência de cada açúcar para cada espécie (Tabela 5).

Tabela 5. Comprimento do tubo polínico em relação a espécie para cada meio de cultura.

<i>Pinus taeda</i>	
Tratamento	Comprimento (µm)
TTGL	61a
TTG	64a
TTS	65a
<i>Pinus maximinoi</i>	
Tratamento	Comprimento (µm)
TMS	77a
TMGL	55b
TMG	53b

<i>Pinus elliottii</i>	
Tratamento	Comprimento (μm)
TES	75a
TEGL	55b
TEGL	53b

Fonte: A autora, 2016.

Embora a porcentagem de germinação dos grãos de pólen seja baixa, se este apresentar tubos polínicos vigorosos como os visualizados no tratamento com glicose, é suficiente para assegurar, ao menos, uma frutificação efetiva (EINHARDT et al., 2006).

A figura 5 demonstra as três espécies de *Pinus* testadas, *P. taeda*, *P. maximinoi* e *P. elliottii*, respectivamente, sob condições do meio padrão com sacarose, que proporcionou melhores índices de germinação e desenvolvimento de tubo polínico.

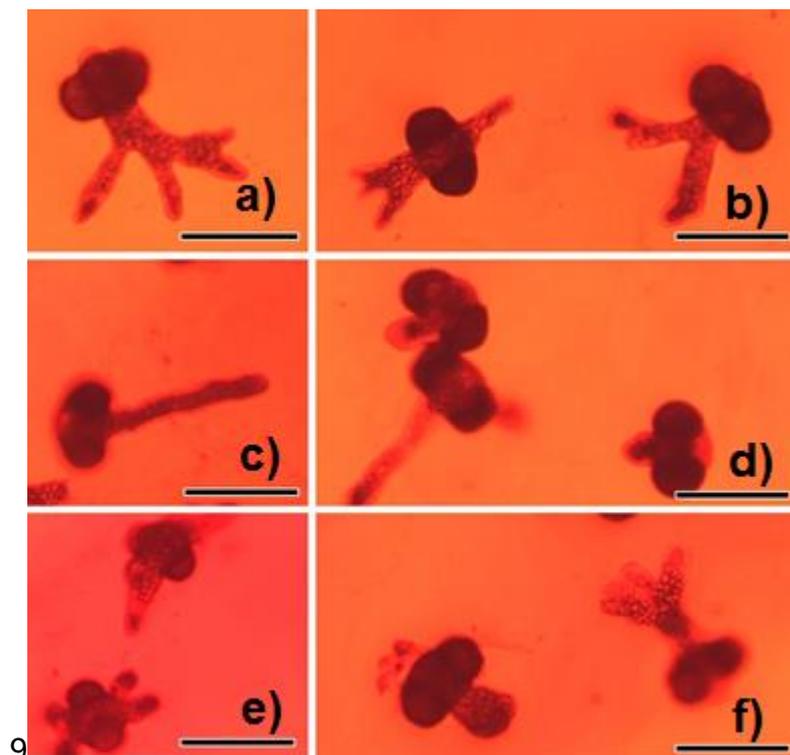


Figura 5. Emissão do tubo polínico das três espécies testadas com o meio padrão. Figuras a) e b) *P. taeda*; c) e d) *P. maximinoi*; e) e f) *P. elliottii*. A barra representa 100 μm da escala utilizada.

Fonte: A autora, 2016.

Pode-se observar um comportamento incomum no desenvolvimento dos tubos polínicos dos grãos de pólen utilizados para os testes. Pode-se verificar a emissão de mais de um tubo polínico (comportamento normal de germinação do pólen) por grão

de pólen. Especialmente as espécies *P. taeda* e *P. elliottii*, apresentaram mais de um tubo polínico, sendo ramificado de um principal ou contrários (dos dois lados do pólen).

Tal comportamento não é relatado em nenhuma literatura, portanto, deve-se aprofundar os estudos para entendimento do fenômeno e identificação da causa. A emissão desordenada de tubos polínicos não interfere na fecundação. Numa das extremidades do tubo fica uma massa viscosa ou citoplasma, com três núcleos. Um desses, chamado vegetativo, é responsável pelo funcionamento dessa ponta apical. Os outros dois núcleos são generativos, que apenas entram em atuação no processo de fertilização (CHANG & NEUFFER, 1992).

Os tubos polínicos germinam e crescem, primeiramente, com base nas substâncias de reserva armazenadas no próprio grão de pólen, ficando depois condicionados, para a sua própria nutrição, do estilo-estigma, no qual se desenvolvem, por isso podemos atribuir a baixa germinação à competição dos compostos.

O comportamento encontrado no presente trabalho, não tem interferência, pois, a direção do crescimento do tubo polínico é orientada por um mecanismo quimiotrópico, sobretudo quando ele passa do estilo-estigma para a cavidade do ovário, são substâncias produzidas por células de cada ovário que aliciam o tubo polínico para o óvulo. Existem alterações da taxa de crescimento desses tubos durante todo o seu trajeto, as quais são controladas por genes denominados genes gametofíticos (BRIEGER & BLUMENSCHNEIN, 1966).

Deve-se estudar a possibilidade de adequação das espécies para sua perpetuação. O tempo necessário, desde a polinização até a fertilização, depende diretamente da temperatura, da umidade e da constituição genética da planta (GOODMAN & SMITH, 1987). O tempo de duração entre a polinização e a fertilização é de aproximadamente um ano em *Pinus*, mas poucos meses em outros grupos. Contudo, a maioria do pólen é dispersa e não chega a fecundar, por se tratar de pólen alados, facilmente levados pelo vento.

5.3 CORANTES ESPECIFICOS

O teste com corantes específicos não apresentou resultado satisfatório. Para ambos os corantes, não houve coloração significativa indicando a viabilidade do material.

Podemos explicar isto com o fato de que, a temperatura ambiente nos dias de realização dos testes era abaixo de 20°C, com isso o metabolismo do material vegetal foi reduzido e as taxas de respiração não foram suficientes para reação com os corantes.

6 CONCLUSÕES

Ambos os métodos de secagem, a vácuo e em estufa, não prejudicam a capacidade germinativa do pólen. A umidade é retirada gradativamente do material, sendo os dois indicados para a criopreservação.

O meio de cultura padrão (Brewbaker & Kwack (1963) com 10 % de sacarose) é o mais indicado para o teste de germinação *in vitro* das três espécies testadas. Com tudo, é indicado que estudos futuros testem a variação nas concentrações dos demais tratamentos, para cada espécie.

O teste utilizando corantes específicos não foi eficiente, uma vez que não houve a coloração dos grãos de pólen. Entretanto, indica-se que se os testes sejam realizados em temperatura média ambiente acima de 25°C, para que a respiração do material vegetal seja suficiente para reação com o corante testado.

O meio padrão apresentou melhores condições também para o desenvolvimento do tubo polínico para as três espécies testadas, com destaque para *P. elliotii* e *P. maximinoi*, que obtiveram as maiores médias de comprimento.

Podemos ressaltar que na concentração de 10%, o açúcar mais indicado tanto para o teste de germinação quanto para desenvolvimento do tubo polínico é a sacarose. Pode-se indicar que sejam feitas alterações nas concentrações de Boro e Ágar presentes no meio de cultura, uma vez que estes possuem influência direta sobre a germinação e emissão de tubo polínico.

REFERENCIAS

AGUIAR, A. V. de; SOUSA, V. A. de; FRITZSONS, E.; JUNIOR, J. E. P.. **Programa de melhoramento de pinus da Embrapa Florestas**. Colombo- PR, 2011.

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. **Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen. In Long term preservation of favorable germoplasm in arboreal crops (T. Akihama & K. Nakajima, eds.)**. Kokusai Print Service, Tokyo, p. 1-7, 1978.

ANTONÂNGELO, A.; BACHA, C. J. I. **As fases da silvicultura no Brasil**. Revista Brasileira de Economia, v. 52, n. 1, p. 207-238, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF. **Anuário estatístico ABRAF 2013**: ano base 2012. Brasília: ABRAF, p. 147, 2013.

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

BENGSTON, George W., W. H. D. McGregor, and A. E. Squillace. **Phenology of terminal growth in slash pine: some differences related to geographic seed source**. Forest Science 13:402-412, 1969.

BRACELPA. **Publicação mensal da Associação Brasileira de Celulose e Papel**. São Paulo, 2013.

BRAMLETT, DL. **Effectiveness of wind pollination in seed orchards**. In: Franklin EC, editor. Pollen Management Handbook. Vol. 587. (USDA Forest Service Agriculture Handbook) p. 10–14, 1981.

BOYER, W. D. **Pollen production and dispersal as affected by seasonal temperature and rainfall patterns**. In Pollen Management Handbook. E. Carlyle Franklin, ed. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 587. Washington, DC. p. 2-9, 1981.

DERAL, Departamento de Economia Rural. **Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento: Produtos Florestais**. Paraná, 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/produtos_florestais_2014_2015.pdf>. Acesso em: 30 de setembro de 2015.

DFSC. **Conservation of genetic resources of *Pinus merkusii* in Thailand. DFSC Series of Technical Notes**. TN56 Danida Forest Seed Centre, Humlebaek. Denmark, 2000.

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

DRESH, A. R.; HOEFLICH, V. A.; JÚNIOR, R. T.; SCHAITZA, E. G.. **Pojeções de Consumo de Madeira com fins Energéticos para Secagem de Grãos na Região de Guarapuava, PR**. Curitiba, 2014.

DVORAK, P. Comm. Personal communication with Dr. William S. Dvorak, **CAMCORE**. 2004.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. do C. B. **Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro**. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal - SP, v. 28, n. 1, p. 5-7, Abril 2006. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n1/29678.pdf>> Acesso em 03 de outubro de 2015.

FACCIO, M. L. R.. **Importância do gênero *Pinus* sp. para o setor madeireiro no Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Estágio Profissionalizante em Engenharia Industrial Madeireira do Curso de Engenharia Industrial Madeireira) - Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

FAO. **State of the World Forests, 2001**. Rome: FAO Forestry, 2002.

FERNANDO, D. D. E.; LAZARRO, M. D.; OWENS, J. N. **Growth and development of conifer pollen tubes**. p. 149-152, 2005.

FERNANDO, D.D.; OWENS, J.N.; YU, X. **RNA and protein synthesis during *in vitro* pollen germination and tube elongation in *Pinus monticola* and other conifers**. p. 259–264, 2001.

HUGHES, H.G.; LEE, C.W. **Low-temperature preservation of *Clianthus formosus* pollen**. HortScience 26:1411-1412, 1991.

HOEKSTRA, F.A. & BRUINSMA, J. **Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen**. Plant Physiology 34:221-225, 1975.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Iba 2015**. p. 15. Disponível em: <http://www.iba.org/images/shared/iba_2015.pdf> Acesso em: 23 de setembro de 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2011**. Rio de Janeiro, v.26, n. 2, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2011**. Rio de Janeiro, v.29, n. 2, 2015.

KRUGMAN, S. L.; STEIN, W. I.; S., D. M. **Seeds of Woody plants in the United States**. Washington. Forest Service, p. 5-29, 1974.

LAGOS, M.. **Cruzamentos controlados em *Pinus radiata***. Curso de mejora genética forestal operativa. Chile: Faculdade Austral do Chile, p. 187-199, 1998.

MAHESHWARI, P. **An Introduction to the embryology of angiosperms**. University of Delhi, India, p. 472, 1950.

MENCK, A. L. de M.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALSKI, M. E.. **Influência do sistema de coletas de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus spp.***; Scientia; IPEF, n.43/44, p. 20-23, 1990.

MISSIO, R. F.; DIAS, L. A. do S.; RESENDE, M. D. V, de. **Selection of *Pinus caribaea* var. *bahamensis* progenies based on the predicted genetic value**. Crop Breeding and Applied Biotechnology 4:399-407, 2004.

MORI, E. S.. **Variabilidade genética em uma população de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden submetida a diferentes intensidades de seleção**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, p. 119, 1993.

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

NEL, A. **Factors Influencing Controlled Pollination of *Pinus Patula***. Master's Thesis. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa, p. 100, 2002.

OTTATI, A. L. T.. **ASPECTOS BIOECOLÓGICOS DO PULGÃO-GIGANTE-DO-PINUS, *Cinara atlantica* (WILSON, 1919) (HEMIPTERA: APHIDIDAE), EM *Pinus spp.* (PINACEAE)**. Botucatu, São Paulo, p. 133, 2004.

OWENS, J. N.; TAKASO, T.; RUNIONS, C. .. **Pollination in conifers**. p. 497, 1998.

OWENS, J.. N; SIMPSON, S. **Pollen from conifers native to British Columbia**. p. 955-967, 1986.

PEREIRA, B. A. da S.. **Introdução de coníferas no Brasil, um esboço histórico. Caderno de Geociências. IBGE, Brasília, 4:25-38, 1990.**

PEREIRA, C. P. **Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus spp.***; Cerne,v. 8, n.2, p. 60-69, 2002.

PHARIS, R.P. **Manipulation of flowering in conifers through the use of plant hormones**. MIKSHE, J.P. Modern methods in forest genetics. Berlin, p. 265-82, 1976.

PIO, L. A. S.. **Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de armazenamento**. Lavras – MG, p. 43, 2004.

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 42:2193-2200, 2002.

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

SEBBENN, A. M.. **Variação genética em progênes de meios-irmãos de *Pinus caribaea* Mor. var. *bahamensis* Bar. et Gol. na região de Bebedouro-SP.** Rev. Inst. Flor., São Paulo, v. 6, p. 63-73, 1994.

SHIMIZU, J. Y.. A pesquisa na evolução do Setor Florestal. **Anais do Encontro Brasileiro de Economia Florestal.** Curitiba: EMBRAPA-CNPFF, 1988. V.1. Curitiba, p. 365-378, 1988.

SHIMIZU, J. Y.. ***Pinus* na silvicultura brasileira.** Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

SILVA, J. M. da. **Análises genéticas em progênes de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* por caracteres quantitativos e marcadores moleculares.** 145f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Ilha Solteira, 2005.

SOUSA-LANG, V. A. de; JUNIOR, J. E. P.. **Influência do meio de cultura na germinação do pólen de três espécies de *Eucalyptus*.** Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n.34, p. 45-54, 1997. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPFF-2009-09/4927/1/vlang.pdf> > Acesso em: 30 de setembro de 2015.

SOUSA, V. A. de; SCHEMBERG, E. A.. AGUIAR, A. V.. **Germinação *in vitro* de pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham).** Scientia Forestalis, Piracicaba, v. 38, n. 86, p. 147-151, jun. 2010. Disponível em: < <http://ipef.br/publicacoes/scientia/nr86/cap02.pdf> > Acesso em: 25 de outubro de 2015.

SPRAGUE, J.R.; JOHNSON, V.W. **Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen.** In **Proceedings of 14 Southern Forest Tree Improvement Conference.** Eastern Tree Seed, Macon, p. 20-27. 1977.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **POLLEN Biology Biochemistry Management.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1974.

TIGHE, M. E. **Manual de Recolección y Manejo de Polen de Pinos Tropicales y Subtropicales Procedentes de Rodales Naturales.** CAMCORE, USA, p. 20, 2004.

VALVERDE, S. R.; SOARES, N. S.; SILVA, M. L. da; JACOVINE, L. A. G.; NEIVA, S. de A.. **O COMPORTAMENTO DO MERCADO DA MADEIRA DE EUCALIPTO NO BRASIL.** Revista Biomassa & Energia, v. 1, n. 4, p. 393-403, 2004.

WEBBER, J. E.; BONNET, Masembert. **Influence of moisture content of forest tree pollen on its response to different viability tests.** P. 605–635, 1989.

WRIGHT, J. W.. **Introduction to Forest Genetics.** New York, p. 279-84, 1976.