

MANEJO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE EUCALYPTUS SPP.

VALDERÊS APARECIDA DE SOUSA

VALDERÊS APARECIDA DE SOUSA

Aprovada em: 18-03 Engenheiro Florestal

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

Prof. Dr. Paulo Yoshio Kayayama

Prof. Dr. Gerhard Banerjee

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Prof. Dr. Mário Ferreira

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1988

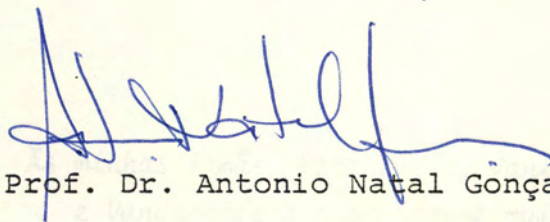
MANEJO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Eucalyptus* SPP.

VALDERÉS APARECIDA DE SOUSA

Aprovada em: 18-03-88

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves	ESALQ/USP
Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama	ESALQ/USP
Prof. Dr. Gerhard Bandel	ESALQ/USP
Prof. Dr. Mário Ferreira	ESALQ/USP



Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Antonio Natal *Carvalho* pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama pela indicação ao magistério e pelo apoio ao meu trabalho científico com tribuído com idéias valiosas.

Ao Prof. Dr. Frederico Pimentel Gomes por suas valiosas sugestões na

Aos meus pais, João e Nercina pelo
apoio, compreensão e incentivo
aos meus estudos

Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate pelo apoio à execução da análise estatística e interpretação dos dados experimentais.

DEDICO

Ao Prof. Marçílio de Almeida e ao Prof. *Marçílio* Filho pelo acesso aos instrumentos de medição.

As acadêmicas do Curso de Engenharia Florestal, Vera Lúcia e Inês Cristina Martins Galina pelo auxílio de parte da experimentação.

As minhas irmãs, Vera Lúcia, Vanilda
e Vandênilce a quem estimo muito

A Magaly Norma Villarroel Guardia pela assistência ativa mente da fase experimental e pelo

OFEREÇO

Aos laboratoristas dos setores de Fisiologia, Anatomia da Madeira, Química da Madeira e Seres Florestais, que apoiaram meu trabalho científico nesta fase.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Estudos Florestais - IEF, em especial Ester Keller Poggiani, que concedeu o apoio necessário ao Curso de Pós-Graduação.

AGRADECIMENTOS

- Ao orientador Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves pela orientação e amizade.
- Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama pela sua extrema dedicação ao magistério e pelo apoio ao meu trabalho, tendo contribuído com idéias valiosas.
- Ao Prof. Dr. Frederico Pimentel Gomes por ter participado com valiosas sugestões na análise estatística.
- Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto, que concedeu apoio à execução da análise estatística e interpretação dos dados experimentais.
- Ao Prof. Marcílio de Almeida e ao Prof. Dr. Mário Tomazello Filho pelo acesso aos instrumentos necessários à avaliação.
- Às acadêmicas do Curso de Engenharia Florestal Evandra Bussolo e Inês Cristina Martins Galina por terem participado de parte da experimentação.
- À Magaly Norma Villarroel Guardia por ter participado ativamente da fase experimental e pela amizade sincera.
- Aos laboratoristas dos setores de Fisiologia das Árvores, Anatomia da Madeira, Química da Madeira e Produção de Sementes Florestais, que apoiaram meu trabalho em todas as etapas.
- Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, em especial à Marialice Metzker Poggiani, que concedeu o apoio necessário durante o Curso de Pós-Graduação.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que tornaram possível este trabalho.
- Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo (Estação Experimental de Tupi) por ter permitido a coleta de material em suas dependências.
- Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) por facilitar a coleta de material no Estação Experimental de Anhembi, concedendo apoio material e humano para isso.
- À Duratex Florestal S/A por intermédio dos Engenheiros Florestais Rosiley Aparecida Brigatti Chaves e Raul Chaves, à qual propiciou o processamento dos dados obtidos.
- À Champion Papel e Celulose Ltda que incentivou as pesquisas nesta área e propiciou a execução dos testes preliminares, base para o posterior desenvolvimento do trabalho de armazenamento.
- A todos os amigos do Curso de Pós-Graduação, em especial a Araci Aparecida da Silva, Edson Seizo Mori, Fernando Patiño Valera e Marina Yukie Murayama pela amizade sincera.
- À Márcia Aparecida de Brito a quem estimo, pelo apoio recebido durante o Curso de Pós-Graduação.
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que tornasse possível este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE	xvi
RESUMO	xviii
SUMMARY	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Fatores que afetam a viabilidade do pólen...	4
2.1.1. Genéticos	4
2.1.2. Fisiológicos	6
2.1.3. Umidade do pólen e umidade relativa durante o armazenamento	7
2.1.4. Temperatura de armazenamento	17
2.1.5. Composição da atmosfera	20
2.1.6. Infecção por microorganismos	21
2.2. Técnicas de armazenamento	22
2.3. Testes de viabilidade do pólen	25
2.3.1. Testes "in vivo"	25
2.3.2. Testes "in vitro"	27
2.3.2.1. Germinação	27
2.3.2.2. Corantes específicos	46
2.3.3. Relação entre germinação "in vivo" e "in vitro"	50
2.4. Armazenamento e viabilidade do pólen de <i>Eucalyptus</i> spp.	53
2.4.1. Armazenamento	53
2.4.2. Testes de viabilidade	57

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1. Procedimentos gerais	59
3.1.1. Coleta	59
3.1.2. Condução do material à casa de vegetação	60
3.1.3. Extração do pólen	60
3.1.4. Teste de germinação	60
3.1.4.1. Composição do meio de cultura	60
3.1.4.2. Procedimento do teste de germinação	61
3.1.4.3. Contagem dos grãos germinados e não germinados	62
3.2. Determinação da concentração adequada de sacarose para a composição do meio de cultura visando a germinação do pólen	62
3.3. Efeito do boro na germinação do pólen	63
3.3.1. <i>E. urophylla</i>	63
3.3.2. <i>E. tereticornis</i>	64
3.3.2.1. Emprego de doses baixas de boro	64
3.3.2.2. Emprego de doses altas de boro	64
3.4. Efeito do cálcio na germinação do pólen	65
3.4.1. <i>E. tereticornis</i>	65
3.4.2. <i>E. urophylla</i>	65
3.5. Extração e suspensão do pólen em água	66
3.5.1. <i>E. tereticornis</i>	66
3.5.2. <i>E. urophylla</i>	66

	Página
3.6. Emprego de diferentes solventes orgânicos na extração do pólen visando ao armazenamento..	67
3.6.1. Éter etílico e éter de petróleo	67
3.6.2. Acetona	67.
3.7. Efeito de diferentes métodos de secagem na germinação do pólen recém-colhido	68
3.7.1. Material empregado	68
3.7.1.1. <i>E. camaldulensis</i>	68
3.7.1.2. <i>E. grandis</i>	68
3.7.1.3. <i>E. tereticornis</i>	69
3.7.1.4. <i>E. urophylla</i>	69
3.7.2. Tratamentos de secagem	69
3.7.3. Teste de viabilidade e crescimento do tubo polínico	70
3.8. Viabilidade do pólen recém-colhido e submetido aos tratamentos de secagem visando ao armazenamento	71
3.8.1. Material empregado	71
3.8.1.1. <i>E. camaldulensis</i>	71
3.8.1.2. <i>E. grandis</i>	71
3.8.1.3. <i>E. tereticornis</i>	72
3.8.1.4. <i>E. urophylla</i>	72
3.8.2. Tratamentos de secagem	72
3.8.3. Avaliação da dimensão do estilete e seu respectivo estigma para algumas espécies estudadas	73
3.8.4. Armazenamento do pólen	73
3.8.5. Avaliação da viabilidade	74
3.9. Avaliação do pólen armazenado	74

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1. Determinação da concentração adequada de sacarose do meio de cultura visando a germinação do pólen	75
- <i>E. urophylla</i>	75
4.2. Efeito do boro na germinação do pólen	78
4.2.1. <i>E. urophylla</i>	78
4.2.2. <i>E. tereticornis</i>	79
4.2.2.1. Emprego de baixas doses de boro	79
4.2.2.2. Emprego de altas doses de boro	80
4.3. Efeito do cálcio na germinação do pólen	82
4.3.1. <i>E. tereticornis</i>	82
4.3.2. <i>E. urophylla</i>	83
4.4. Extração e suspensão do pólen em água	84
4.5. Emprego de diferentes solventes orgânicos na extração do pólen visando ao armazenamento..	86
4.5.1. Éter etílico e éter de petróleo	86
4.5.2. Acetona	87
4.6. Efeito de diferentes métodos de secagem na germinação do pólen recém-colhido	88
4.6.1. Redução de umidade	88
4.6.2. Determinação da viabilidade	93
4.6.3. Crescimento do tubo polínico	98
4.7. Viabilidade do pólen recém-colhido e submetido aos tratamentos de secagem visando ao armazenamento	100

	Página
4.7.1. Determinação da viabilidade	100
4.7.2. Crescimento do tubo polínico	104
4.7.3. Avaliação do estilete e seu respectivo estigma para algumas espécies estudadas	106
4.8. Viabilidade do pólen armazenado por um mês..	107
4.8.1. Determinação da viabilidade	107
4.8.2. Crescimento do tubo polínico	112
4.9. Viabilidade do pólen armazenado durante 2 meses	114
4.9.1. Determinação da viabilidade	114
4.9.2. Crescimento do tubo polínico	120
4.10. Viabilidade do pólen armazenado durante 3 meses	122
4.10.1. Determinação da viabilidade	122
4.10.2. Crescimento do tubo polínico	128
5. CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
APÊNDICE	142

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
1. Velocidade da perda de água para o pólen de <i>E. camaldulensis</i> sob diferentes tratamentos de secagem	89
2. Velocidade da perda de água para o pólen de <i>E. grandis</i> sob diferentes tratamentos de secagem	90
3. Velocidade de perda de água para o pólen de <i>E. tereticornis</i> sob diferentes tratamentos de secagem	91
4. Velocidade de perda de água para o pólen de <i>E. urophylla</i> sob diferentes tratamentos de secagem	92
5. Valores de χ^2 para comparação de ... de germinação do pólen de <i>E. ...</i> diferentes doses de ...	
6. Valores de χ^2 para comparação de ... de germinação do pólen de <i>E. ...</i> diferentes doses de ...	
7. Valores de χ^2 para comparação de ... de germinação do pólen de <i>E. ...</i> diferentes doses de ...	

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1. Diferenças quantitativas existentes entre os componentes do pólen binucleado e trinucleado.	5
2. Amostra de pólen necessária para dados significativos sugerido por STANLEY & LINSKENS (1974)	39
3. Porcentagem de germinação do pólen recém-colhido em função das diferentes espécies	44
4. Comparação da germinação "in vitro" com a formação de frutos (<i>Pyrus communis</i> var. <i>Clapps favorite</i>) feita por Visser	52
5. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen (<i>E. urophylla</i>) sob diferentes concentrações de sacarose	76
6. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de <i>E. urophylla</i> sob diferentes doses de boro	78
7. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de <i>E. tereticornis</i> sob diferentes doses de boro	79
8. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de <i>E. tereticornis</i> submetido a diferentes doses de boro	80

TABELAS	Página
9. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de <i>E. tereticornis</i> submetido a diferentes doses de cálcio.....	82
10. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de <i>E. urophylla</i> submetido a diferentes doses de cálcio	83
11. Porcentagem média de germinação para o pólen de <i>E. tereticornis</i> e <i>E. urophylla</i> extraído em água e a seco	85
12. Valores para comparação de médias (%) de germinação do pólen de <i>E. camaldulensis</i> extraído com diferentes solventes orgânicos	87
13. Germinação do pólen (%) para o <i>E. urophylla</i> extraído com acetona e valor de χ^2 para comparação de médias de tratamentos	87
14. Germinação do pólen (%) das espécies de <i>Eucalyptus</i> sob diferentes procedimentos de redução de umidade e valores de χ^2 para comparação de médias dos tratamentos.....	94
15. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação (%) do pólen das espécies de <i>Eucalyptus</i> submetido aos diversos tratamentos de secagem.	96
16. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação (%) do pólen entre as diferentes espécies	97

TABELAS

Página

17. Comprimento médio do tubo polínico (μm) em função das diferentes espécies e tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey...	99
18. Germinação média (%) do pólen recém-colhido e submetido a secagem prévia e valores de χ^2 para comparação entre médias de tratamentos das diferentes espécies.....	100
19. Valores de χ^2 entre tratamentos de secagem para a germinação do pólen das diferentes espécies de <i>Eucalyptus</i>	101
20. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação do pólen (%) referentes às diferentes espécies	102
21. Comprimento médio do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey	105
22. Germinação média (%) sob as diferentes condições (secagem e armazenamento) e valores de χ^2 obtidos entre tratamentos para as espécies....	108
23. Resultados de χ^2 para médias de germinação (%) do pólen entre os diferentes tratamentos de secagem e armazenamento.....	109
24. Valores de χ^2 para a germinação média (%) do pólen entre as espécies de <i>Eucalyptus</i> sob os diversos tratamentos de secagem prévia e armazenamento.....	112

TABELAS

Página

25. Comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey	113
26. Germinação média (%) sob as diferentes condições de secagem e armazenamento e valores de χ^2 obtidos entre tratamentos para as espécies.	115
27. Resultados de χ^2 para médias de germinação (%) do pólen entre diferentes tratamentos de secagem e armazenamento	116
28. Resultados de χ^2 para germinação média (%) do pólen entre as espécies de <i>Eucalyptus</i> sob os diversos tratamentos de secagem prévia e armazenamento	119
29. Comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey	121
30. Germinação média (%) sob diferentes condições de secagem e armazenamento e valores de χ^2 obtidos entre tratamentos para as espécies	123
31. Resultados de χ^2 para médias de germinação (%) do pólen entre diferentes tratamentos de secagem e armazenamento	124
32. Valores de χ^2 para a germinação (%) do pólen entre as espécies de <i>Eucalyptus</i> sob os diversos tratamentos de secagem prévia e armazenamento	126

TABELAS

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

Página

33. Comprimento do tubo polínico (μm) para as diferen-
tes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia
e resultados dos testes F e de Tukey 129

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
concentrações de sacarose 133

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
diferentes doses de boro 134

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
o efeito de diferentes doses
de boro 144

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
o efeito de diferentes doses
de boro 145

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
o efeito de diferentes doses
de cálcio 146

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
diferentes doses de cálcio 147

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
os efeitos de diferentes doses
de extração 148

Germinação (1) para o pólen de *F. dactyloides* sob
o efeito de extração com
etilico e éter de petróleo. 149

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

TABELAS		Página
I.	Germinação do pólen (%) sob diferentes concentrações de sacarose	143
II.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. urophylla</i> sob diferentes doses de boro	144
III.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. tereticornis</i> sob o efeito de diferentes doses de boro	144
IV.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. tereticornis</i> sob o efeito de diferentes doses de boro	145
V.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. tereticornis</i> sob o efeito de diferentes doses de cálcio	146
VI.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. urophylla</i> sob diferentes doses de cálcio	147
VII.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. tereticornis</i> e <i>E. urophylla</i> sob diferentes métodos de extração	148
VIII.	Germinação (%) para o pólen de <i>E. camaldulensis</i> sob o efeito de extração com éter etílico e éter de petróleo.....	149

TABELAS

Página

IX.	Germinação (%) para o pólen de <i>E.urophylla</i> extraído com acetona	150
X.	Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem	151
XI.	Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem	152
XII.	Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem e armazenamento por um mês.....	153
XIII.	Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem e armazenamento por dois meses.....	154
XIV.	Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem e armazenamento por três meses.....	155

MANEJO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE *Eucalyptus* SPP.

Autora: VALDERÊS APARECIDA DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia adequada para coleta, extração, armazenamento e testes de viabilidade "in vitro" do pólen de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus tereticornis* Sm e *Eucalyptus urophylla* ST Blake. A coleta do pólen foi feita em flores em antese oriundas de ramos coletados com botões florais no início da abscisão do opérculo e mantidos em recipientes com água por 2 a 4 dias, em casa de vegetação. Dos métodos de extração estudados: a seco, em água, éter etílico, éter de petróleo e acetona, a extração a seco foi o método mais adequado. Foram utilizados os seguintes métodos de secagem: câmara seca (22°C constante) estufa (35°C e 40°C constantes) e a vácuo sob sílica-gel (temperatura ambiente). Verificou-se interações entre os mesmos e as espécies quanto a porcentagem de germinação do pólen. Apenas a secagem em estufa (40°C) mostrou-se prejudicial à maioria das espécies. A velocidade de secagem das estruturas estaminais variou entre

as espécies, sendo maior para o *E. urophylla* e *E. grandis* e menor para o *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*. Atribuiu-se esse comportamento a diferente natureza das espécies.

O pólen seco a vácuo, em estufa (35°C) e sem secagem foi armazenado em "freezer" (-16°C) e em refrigerador (4°C) em frascos de vidro (18 ml) hermeticamente fechados e colocados dentro de dessecadores. Após três meses de armazenamento verificou-se que a redução de umidade desempenhou papel importante na manutenção da viabilidade. A temperatura de -16°C foi mais adequada para o armazenamento quando acompanhada de redução de umidade do pólen. A viabilidade para todos os ensaios foi determinada através de testes de germinação "in vitro" empregando-se meio de cultura à base de ágar (0,8%) e sacarose (30%). Evidenciou-se também que a necessidade de quantidades adicionais de boro e cálcio depende de vários fatores dificultando a determinação de uma dose ideal. A temperatura de 25°C e umidade relativa de 99%, foram utilizadas na germinação do pólen, sendo 24 horas o período considerado como o mais indicado para a avaliação de germinação. A viabilidade foi determinada através da contagem dos grãos germinados e não germinados em microscópio óptico com o aumento de 450 x em campos ao acaso sendo o procedimento mais adequado avaliar 300 grãos totais por repetição. A análise estatística foi feita através do χ^2 (qui-quadrado) devido a heterogeneidade das variâncias e a natureza binomial dos

dados. A avaliação do comprimento do tubo polínico através do método de câmara clara mostrou não haver o efeito dos diferentes tratamentos de secagem, todavia detectou-se variações existentes entre as espécies, sendo que o *E. camaldulensis* destacou-se com as maiores médias. Detectou-se diferenças entre a germinação para as espécies estudadas, onde o *E. camaldulensis* apresentou as maiores médias para grande parte dos ensaios.

POLLEN HANDLING AND VIABILITY OF *Eucalyptus* SPP.

Author: VALDERÊS APARECIDA DE SOUSA

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The objective of this work was to develop adequate methodology for *Eucalyptus camaldulensis* Dehn, *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, *Eucalyptus tereticornis* SM and *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake pollen harvest, extraction, storage and "in vitro" viability tests.

The pollen harvest was made from flowers at anthesis from branches collected with flower buds at the beginning of the operculum abscission and maintained in containers with water under greenhouse conditions for 2 to 4 days. Among the pollen extraction methods utilized, dry, water, ethyl and petroleum ether and acetone, the dry extraction was the most adequate.

Drying before storage was made through: dry chamber (constant 22°C), kiln (constant 35°C and constant 40°C) and under vacuum with silica gel (at room temperature \pm 25°C). It was observed that there were interaction among methods and species in relation to the pollen germination

percentage, and only the drying in kiln (40°C) was harmful to most of the species. The drying rate of the stamen varied among species, this was higher for *E. urophylla* and *E. grandis* and lower for *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*. This was attributed to the nature of the species. Pollen without drying and with drying under vacuum with silica gel and in kiln (35°C) was stored in freezer (-16°C) and in refrigerator (4°C) in vials (18 ml) hermetically tight and kept under desiccator for 3 months. After storage it was observed that the reduction of the moisture of the stamen was very important for the viability maintenance. The storage at the freezer (-16°C) was the most adequate for the pollen storage when had the previous drying.

The viability test was made through the pollen germination test "in vitro" utilizing the medium made up of 0,8% agar and 30% sucrose. The need to add boron and calcium to the medium depend on several factors and this makes it difficult to determine the ideal amount of these elements to be added. The pollen germination was carried out under 25°C temperature and 99% relative moisture for 24 hours period. This period of 24 hours was determined to be the most indicated. The viability was determined through the counting of pollen grain germinated and non germinated with the use of a microscope with 450 x magnification in fields randomly distributed. This procedure was the most adequate to evaluate replicates of 300 pollen grains. The statistical

analysis was made through the use of the χ^2 (chi square) due to the heterogeneity of variances and the binomial nature of the data. The evaluation of the pollen tube length showed not have effects of the drying methods. However there were variations among species and *E. camaldulensis* pollen tube showed the larger lengths. There were differences among species for the germination percentage and *E. camaldulensis* showed higher pollen germination rates.

materia-prima nas industrias de compensados, aglomerados, chapas, celulose e papel, bem como combustivel, tem levado a necessidade de reflorestamentos com especies de rapido crescimento.

No Brasil, tem-se em pratica reflorestamentos com especies que apresentam um bom desempenho e que sao adaptadas a condicoes locais. Das especies nativas, as que mais se destacam pela sua representatividade em termos de produtividade sao o *Eucalyptus* e o *Pinus*.

O aumento da produtividade dos plantios florestais pode ser conseguido atraves de varias medidas, como do melhoramento genético das especies, da utilização racional das áreas disponíveis, melhorias técnicas, é necessário. Todavia, o desenvolvimento satisfatório das atividades florestais depende principalmente do custo envolvido.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda de madeira para o uso como matéria-prima nas indústrias de compensados, aglomerados, chapas, celulose e papel, bem como combustível, tem levado à necessidade de reflorestamentos com espécies de rápido crescimento.

No Brasil, tem-se empregado espécies exóticas que apresentam um bom desempenho e biologicamente são mais conhecidas do que as espécies nativas. Os gêneros que mais se destacam pela sua representatividade em áreas reflorestadas são o *Eucalyptus* e o *Pinus*.

O aumento de produtividade dessas essências florestais pode ser conseguido através de: a) expansão da área reflorestada; b) melhoria das técnicas de manejo, bem como do melhoramento genético do material disponível. A utilização racional das áreas disponíveis, incluindo as marginais, é necessário. Todavia, a adequação dessas áreas ao desenvolvimento satisfatório das espécies pode não ser justificado pelo alto custo envolvido. Um das possíveis soluções

seria o emprego de indivíduos selecionados, capazes de se desenvolverem mais adequadamente. A outra envolve a produção de híbridos de forma a combinar diferentes características de sejáveis em um único indivíduo, facilitando assim a adaptação às condições específicas. Na hibridação vários caracteres são recombinaados e há a possibilidade do aparecimento de indivíduos que se desenvolvem melhor que as espécies paternas em áreas marginais. Todavia, a produção de híbridos interespecíficos pode ser dificultada ou mesmo impedida quando não se conhece técnicas adequadas de manejo de pólen, especialmente para o *Eucalyptus* que apresenta uma curta longevidade sob condições normais de ambiente e defasagem de floração evidente entre determinadas espécies.

Deve-se enfatizar também a importância da conservação do pólen visando aos cruzamentos controlados para a determinação da capacidade combinatória geral e específica. Esse procedimento permite o esclarecimento da constituição genética dos pomares existentes, ou ainda a formação de novos pomares com base na seleção dos indivíduos desejados para o melhoramento genético futuro.

Técnicas apropriadas devem ser disponíveis para coleta, transporte, extração e armazenamento do pólen, pois todos esses fatores são decisivos na manutenção da viabilidade.

As condições de armazenamento são primordiais para se atingir o sucesso desejado. Dentre os fatores que mais influenciam na longevidade do pólen durante o armazenamento destacam-se a umidade e a temperatura de armazenamento. Essas variáveis devem ser definidas para possibilitar a manutenção da viabilidade por um período maior possível.

Por outro lado, a avaliação adequada da viabilidade é imprescindível para que se tenha com segurança a verdadeira qualidade do pólen armazenado visando a polinização controlada.

Os objetivos deste trabalho com pólen de *Eucalyptus* spp. são: desenvolver técnicas adequadas de coleta, extração, armazenamento e testes de germinação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FATORES QUE AFETAM A VIABILIDADE DO PÓLEN

Há uma tendência à queda do poder germinativo ao longo do armazenamento. Existem vários fatores que concorrem para a depreciação da qualidade do pólen armazenado.

2.1.1. Genéticos

Os efeitos genéticos são evidentes na determinação da longevidade.

Vários autores dentre eles, BREWBAKER (1967); STANLEY & LINSKENS (1974); FRANKEL & GALUN (1977) citaram a tendência para a menor viabilidade e capacidade germinativa do grão de pólen trinucleado em relação ao binucleado. Dentre as possíveis explicações para o fato BREWBAKER (1967), citou que a segunda divisão meiótica priva o grão de pólen de reservas suficientes para propiciar uma boa longevidade e germinação. Apesar de GOSS (1968) afirmar não se conhecer as mudanças do metabolismo associadas à germinação e longevidade do pólen trinucleado, KIRBY & SMITH (1974) chegaram a

conclusão de que as proteínas, carboidratos e compostos totais extraídos variam entre os dois tipos de pólen (Tabela 1).

Tabela 1. Diferenças quantitativas existentes entre os componentes do pólen binucleado e trinucleado.

Condições nucleares	Binuclear	Trinuclear
	- $\mu\text{g}/10^6$ grãos de pólen -	
Carboidratos (α naftol)	9,40 \pm 1,83**	5,75 \pm 1,83
Proteínas (extraídas pelo método de Lowry)	4,98 \pm 0,57**	3,85 \pm 0,57
Compostos totais extraídos (base peso seco)	370,97 \pm 20,97**	330,15 \pm 20,48

Fonte: KIRBY & SMITH (1974)

Significância ** = 0,01

OBS.: resultados da análise para 42 espécies de angiospermas representando 25 famílias.

A análise mostrou diferenças significativas entre as condições binucleares e trinucleares com respeito aos compostos totais extraídos da parede, bem como carboidratos e proteínas. Ficou evidente uma maior quantidade de compostos de superfície nos pólen binucleados.

Tem-se observado respostas diferenciadas das espécies em relação ao armazenamento em função da própria composição do pólen, dentre outros fatores.

2.1.2. Fisiológicos

Durante o armazenamento do pólen podem ocorrer alterações fisiológicas que concorrem para o decréscimo da viabilidade. Algumas mudanças são destacadas por STANLEY & LINSKENS (1974) tais como: alteração na velocidade de respiração e conversão dos açúcares em ácidos orgânicos, acúmulo dos produtos metabólicos secundários (ácidos orgânicos), alteração dos lipídeos da exina do pólen. Harrington¹ e King², citados por WANG (1975) acrescentaram a esses fatores a auto-oxidação dos lipídeos, a possível inativação das enzimas, hormônios de crescimento e ácido pantotênico e ainda danos causados por dessecação.

O estado nutricional da planta fornecedora de pólen é também um fator a ser considerado. STANLEY & LINSKENS (1974) evidenciaram que a nutrição mineral da planta durante o desenvolvimento do pólen pode afetar a longevidade. Destacam a sensibilidade que as anteras apresentam ao boro. Enfatizam que a ausência desse elemento pode levar os tecidos da camada da esporogênese ao colapso, de forma a induzir

¹ HARRINGTON, J.F. Seed and pollen storage. In: FRANKEL, O. K. & BENNET, E. Genetic resources in plants - their exploration and conservation. Oxford, Blackwell, 1970. p.469-89.

² KING, J.R. The storage of pollen-particularly by the freezedrying method. Bull. Torrey Bot. Club., 92:270 - 87, 1965.

uma concentração nuclear anormal causada pela inibição da divisão nuclear. A formação da parede pode ser impedida e em muitos casos ocorrer a desintegração da célula. Salientam ainda que pode ocorrer a produção de pólen anormal mesmo quando a parede da antera continue crescendo e o saco embrionário parece inafetado.

2.1.3. Umidade do pólen e umidade relativa durante o armazenamento

O teor de umidade do pólen é um dos fatores mais importantes envolvendo o armazenamento e normalmente encontra-se negativamente relacionado à longevidade. Vários trabalhos enfatizam a necessidade de redução do teor de umidade (STANLEY & LINSKENS, 1974; MATTHEWS & KRAUS, 1981; MARTINS et alii, 1981), já que nesse procedimento reduz-se a atividade metabólica e também a ação de microorganismos como fungos e bactérias.

Muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar o teor de umidade adequado ao armazenamento. SPRAGUE & JOHNSON (1977) verificaram em seus estudos que a umidade inicial constituiu-se no fator mais importante para o armazenamento bem sucedido. Afirmam que o baixo teor de umidade do pólen (8 a 10%) propicia um bom armazenamento independente do método empregado. GODDARD & MATTHEWS (1981) enfatizam que o teor de umidade do pólen deve ser reduzido

de 9 a 10% para proceder-se ao armazenamento sob refrigeração ou temperaturas mais drásticas.

Em estudos conduzidos com pólen de milho BARNABÁS (1985) verificou que a maioria dos grãos de pólen observados sobreviveram a uma redução de umidade equivalente a 50% sem a perda de suas funções normais. Com redução superior a esse nível houve a morte dos grãos de pólen menos vigorosos ou perda da capacidade de formar tubo polínico.

HAUNOLD & STANWOOD (1985) armazenaram o polén de lúpulo com umidade em torno de 10%.

A importância da redução de umidade é enfatizada para armazenamentos a curto prazo. SNYDER & CLAUSEN (1974) destacam que para preservar a viabilidade do pólen mesmo por algumas semanas é necessário reduzir a umidade.

O teor ideal varia para cada caso estudado. A intensidade de secagem necessária de acordo com SNYDER & CLAUSEN (1974) depende da espécie e do método de armazenamento empregado. Por exemplo, MATTHEWS & KRAUS (1981) salientam que para o armazenamento em "freezer" (-20°C) há necessidade de secar o pólen adequadamente. A presença de alto teor de umidade poderá conduzir à formação de gelo intracelular que implicará na ruptura da parede celular. Deve-se atentar para o nível de desidratação que cada espécie pode suportar. STANLEY & LINSKENS (1974) destacam que nem todo

pólen pode ser submetido a um nível de umidade muito baixo. Saliencia que para espécies de *Tulipa*, *Plantago media*, *Clivia cusculus* e *Parnassia*, a água contida não deve ultrapassar o nível crítico de umidade que é 40%. Já SPRAGUE & SNYDER (1981) evidenciam que para o pólen de *Criptomeria*, *Larix* e *Pinus* a umidade máxima deve ser de 10%, acima da qual o pólen será danificado com conseqüente redução de viabilidade.

Deve-se ter muita precaução com a desidratação do pólen trinucleado. De acordo com os vários trabalhos ao desidratar o pólen trinucleado os componentes nucleares das células masculinas podem ser danificadas provocando uma redução da viabilidade.

Vários métodos são empregados para se conseguir a redução de umidade desejada. A secagem a vácuo é tida como um método simples e rápido, sendo recomendado por vários autores como FRANKEL & GALUN (1977) e MATTHEWS & KRAUS (1981).

Snyder³, citado por DORMAN (1976) detectou que o dessecamento do pólen por 15 minutos através de vácuo (aproximadamente 5 mm de Hg) proporcionou a redução de umidade ao nível adequado, enfatizando também a conveniência do dessecante sílica-gel. Acrescentam SPRAGUE & SNYDER (1981) que após 15 minutos o pólen de pinho apresentou um conteúdo de

³ SNYDER, E. Extracting, processing and storing southern pine pollen. Washington, USDA. Forest Service, 1961. 14p.

umidade entre 11 e 14% a qual constitui-se em uma umidade segura para armazenamento em refrigerador. No entanto, para o armazenamento em "freezer" haveria necessidade de desidratar o pólen por 30 minutos.

Por sua vez AHLGREN & AHLGREN (1978) armazenaram o pólen de *Pinus strobus* com sucesso durante 8 anos após tê-lo submetido à dessecação sobre sílica-gel em um congelador por 48 horas. Como parte do processo aplicaram vácuo de 2mm de Hg por um período de 20 a 30 minutos e armazenaram o pólen em ampolas à temperatura de 5°C. Não detectaram redução na produção de sementes viáveis formadas a partir do pólen armazenado por 8 anos. A redução de umidade através de sílica-gel, da combinação de vácuo com sílica-gel e ácidos como agente desidratante é enfatizada em diversos trabalhos. O ácido sulfúrico é destacado por DUFFIELD & SNOW (1941). Os autores obtiveram melhores resultados quando armazenaram o pólen sobre esse ácido à umidade relativa de 50% e temperatura de 2°C por um ano. Sob essas condições a umidade do pólen permaneceu em torno de 20%. Também MATTHEWS & KRAUS (1981) destacam o emprego do ácido sulfúrico no armazenamento do pólen de espécies florestais. Afirmam que ao empregar-se um solução de gravidade específica 1,5 o pólen atingiria um conteúdo de umidade de 15%. Todavia, GODDARD & MATTHEWS (1981) alertam para o fato de que o ácido sulfúrico sendo volátil pode emitir SO₂ e SO₃ de mo-

do a afetar a germinação do pólen. Ainda os mesmos autores destacam a utilização do cloreto de cálcio como agente desidratante.

A liofilização constitui-se em um importante método de redução de umidade. De acordo com STANLEY & LINSKENS (1974) esta consiste na redução de temperatura de -60°C a -80°C , seguido por aplicação de vácuo de 50 - 250 mm de Hg para remover a água por sublimação. O pólen liofilizado pode então ser armazenado sob diversas condições, que podem ser: temperatura ambiente, nitrogênio ou vácuo. Todavia, deve-se considerar a necessidade de reumidificar o pólen para avaliar a viabilidade. DUFFIELD & SNOW (1941) destacam que a germinação do pólen armazenado com baixo teor de água foi incrementada pela exposição a umidade relativa de 75% e 4°C por 12 horas. WANG (1975) cita o armazenamento bem sucedido de pólen liofilizado para várias espécies florestais. LIVINGSTON & CHING (1967) empregaram também com sucesso a liofilização para o pólen de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco e conseguiram manter a viabilidade por mais de dois anos.

O processo de liofilização deve, no entanto, ser muito bem conhecido para a sua aplicação adequada, especialmente com respeito à velocidade de congelamento. A mesma deve ser baixa inicialmente, de forma que a cristalização seja predominante ou completamente extracelular, antes da nucleação de cristal tornar-se geral.

Antes, porém, de se aplicar qualquer tratamento de secagem é necessário verificar o seu efeito sobre a viabilidade do pólen. FARMER JR. & HALL (1974) avaliaram o efeito da secagem a vácuo, sobre a germinação do pólen de *Prunus serotina* Ehrh. antes do armazenamento. Concluíram não haver qualquer efeito em comparação com o pólen recém-colhido.

A determinação precisa da umidade é necessária para se efetuar um trabalho de secagem adequado. A mesma pode ser feita por vários métodos. GODDARD & MATTHEWS (1981), sugeriram a determinação através da pesagem de 1 grama de pólen. Colocando-se o material em estufa, procede-se a pesagem e à medida que o mesmo vai secando utiliza-se a perda de peso para se determinar a umidade. SNYDER & CLAUSEN (1974) salientam, todavia, que a determinação do conteúdo ideal de umidade do pólen para armazenamento requer medidas precisas. Enfatizam que deve-se ter precaução quanto a utilização do método da pesagem de 1 ou 2 gramas seguida da permanência em estufa por uma hora. Acontece que às temperaturas mais elevadas pode ocorrer a volatilização de outras substâncias além da água.

Ainda com respeito a determinação da umidade do pólen GODDARD & MATTHEWS (1981) citaram o aparelho Ohaus no qual uma lâmpada aquecida de 4,5 watts é acionada por sete

minutos sendo que a porcentagem de umidade é lida diretamente na escala óptica.

Existem vários outros processos destrutivos para determinação de umidade, entretanto merece destaque o método de Jensen⁴, citado por GODDARD & MATTHEWS (1981). Esse método permite determinar a umidade de pequenas quantidades de pólen, apresentando boa precisão. O aparelho utilizado mede o conteúdo absoluto de umidade de uma amostra submetida a vácuo profundo. A pressão de vapor é liberada e condensada como gelo. Quando o gelo evapora do sistema causa uma pressão de volume conhecido. Essa pressão resultante é proporcional à massa de água liberada, sendo medida em seguida por um manômetro à óleo.

A umidade relativa durante o armazenamento é tida como um dos principais fatores relacionados à longevidade. A mesma encontra-se diretamente relacionada à umidade de equilíbrio apresentada pelo pólen durante a estocagem. DUFFIELD & SNOW (1941) relatam o armazenamento de *Pinus* spp. onde os resultados de um ano de experimento envolvendo quatro níveis de umidade relativa e de temperatura mostraram que a umidade relativa de 50% e temperatura de 0 a

⁴ JENSEN, C.J. Some factors influencing survival of pollen storage procedures. In: IUFRO WORKING GROUP MEETING SEXUAL REPRODUCTION FOREST TREES. Varparanta, 1970. 18p.

4°C, o pólen de *Pinus strobus* e *Pinus resinosa* apresentaram germinação superior a 80%. Não houve diferença significativa entre o pólen de ambas as espécies. Detectaram ainda, redução na germinação, tendo atingido aproximadamente zero para as umidades relativas entre 0 a 10% sob temperaturas de 30°C e ambiente. A umidade desejada foi conseguida por meio de ácido sulfúrico. WORSLEY (1958) relatou o armazenamento de pólen de *Pinus* bem sucedido a umidade relativa de 25%.

A influência da umidade relativa foi estudada por LANNER (1962) para 9 espécies de *Pinus*, *Abies*, *Pseudotsuga* e *Cedrus*. O autor empregou dessecadores padrões em câmara com umidade controlada. Observou que quanto maior a umidade relativa, maior tempo era gasto para o pólen perder a umidade. O tempo necessário para o pólen atingir a umidade de equilíbrio dependeu principalmente da diferença entre o conteúdo de umidade inicial e o conteúdo de umidade de equilíbrio a ser atingido.

Em revisão detalhada sobre o efeito da umidade relativa na longevidade STANLEY & LINSKENS (1974) evidenciaram que a longevidade é maior para umidade entre 6 e 60%. No entanto, detectou-se casos onde várias espécies germinaram melhor a 0,005% de umidade do que a 30%. Todavia, é importante atentar para a observação de que nem todas as espécies podem suportar níveis tão baixos de umidade.

WANG (1975) relatou bons resultados em Petawawa com a conservação do pólen de *Picea abies*, *P. galuca*, *P. mariana* (Mill) B.S.P., *P. rubens* Sarg. e *P. mariana* x *P. rubens* por um período de 11 a 13 anos, em recipientes tamponados com algodão e mantidos em dessecadores sobre sílica-gel (umidade relativa de 0 a 1%) e temperatura de -18°C .

A longevidade do pólen que requer alta umidade normalmente é menor do que a longevidade daquele que permite uma maior redução de umidade (SNYDER & CLAUSEN, 1974). Por sua vez, WORSLEY (1959) citou que o pólen de muitas espécies (*A. amabilis*, *A. concolor* var. *lowiana*, *Larix leptotelis*, *Picea breweriana*, *P. smithiana*, *P. contorta*, *P. mugo*, *P. nigra*, *P. peuka*, *P. ponderosa*, *P. strobus* e *P. silvestris*) pode ser armazenado a 0°C sob umidades relativas entre 10 e 25%, conseguidas por meio de ácido sulfúrico. Neste caso, a perda de viabilidade não é alta.

O armazenamento segundo WRIGHT (1976) pode ser feito de forma que o pólen seja colocado em frascos tamponados com algodão a umidade relativa de 25% ou menos e temperatura de 3 a 4°C , ou de -10 a -20°C quando disponíveis. Já HENNY (1978) armazenou pólen de *Spathiphyllum floribundum* (Linden e Andrade) N.E. Br. e *Vriesea malzinei* E. Merr a 7°C e 23°C com umidade relativa de 10, 35, 65 e 90%. A germinação ótima do pólen para ambas as espécies ocorreu com o armazenamento a 7°C e 65% de umidade relativa. O arma

zenamento do pólen de framboesa foi feito por OTTERBACHER et alii (1983) à baixa temperatura em caixas contendo uma camada de cloreto de cálcio. O pólen permaneceu viável por mais de 4 anos. Por sua vez, AKORODA (1983) estocou grãos de pólen de *Discorea rotundata* sob várias combinações de umidade relativa e temperatura. O pólen armazenado a 0% de umidade relativa e -5°C permaneceu altamente viável por mais de um ano.

Com respeito ao controle mais preciso de umidade em refrigerador (0 a 5°C) SNYDER & CLAUSEN (1974) afirmam que o mesmo pode ser conseguido no laboratório por meio de dessecadores contendo soluções saturadas de sais e enfatizam que pode-se atingir uma faixa de umidade relativa com soluções como segue:

Sal	Umidade relativa de (%)	2 a 5°C
Li Cl . H ₂ O	14	
K ₂ C ₂ H ₃ O ₂	24	
MgCl ₂ .6H ₂ O	35	
CaCl ₂ .6H ₂ O	40	
K ₂ CO ₃ .2H ₂ O	47	
Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	60	
Na ₂ Cr ₂ O ₇ .H ₂ O	60	
NaCl	75	
(NH ₄) ₂ SO ₄	83	

Acrescentam que outros dois sais que podem ser utilizados são o NaOH e $\text{ZnCl} \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. Esses sais utilizados a 20°C propiciam as seguintes umidades relativas:

Sal	Umidade relativa (%) a 20°C
NaOH	6
$\text{ZnCl} \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	10

Cada sal propicia, portanto, uma umidade relativa específica com a qual o teor de umidade do pólen eventualmente atingirá o equilíbrio.

2.1.4. Temperatura de armazenamento

As condições de armazenamento vão determinar o sucesso no processo de conservação do pólen. Existem muitos fatores externos que influenciam negativamente na longevidade, dentre eles: temperatura, atmosfera que envolve o pólen (umidade relativa, concentração de gases), etc. A temperatura, bem como o conteúdo de umidade são os principais fatores a serem considerados.

O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se ligado a redução do metabolismo do pólen, o que propicia uma maior longevidade.

Pode-se conseguir temperaturas reduzidas através de refrigeradores e "freezers", que são de fácil acesso, e de

outros métodos mais sofisticados como gases liquefeitos. A decisão com respeito ao método empregado dependerá do objetivo do armazenamento, bem como da característica da espécie trabalhada. Por exemplo: o emprego de gases liquefeitos para armazenamento a prazos mais longos exige um alto nível de desidratação, por outro lado, existem pólenes que não suportam o nível de desidratação necessário para isso.

SCHOENIKE & STEWART (1963) armazenaram o pólen de *P. banksiana* Lamb., *Picea glauca* (Moench) Voss e *P. abies* (L.) Karst por 5 anos sob temperatura de 4°C. Ainda FARMER & HALL (1974) armazenaram por 30 meses o pólen de *Prunus serotina* Ehrh sob temperaturas de: 3°C, -30°C e 21°C. Todavia, o pólen seco a vácuo perdeu completamente a viabilidade à temperatura ambiente. YANG (1983) observou que o pólen de *Actinidia chienensis* e *Actinidia eriantha* armazenado à temperatura ambiente (18 a 26°C) durante 8 dias perdeu a viabilidade. Entretanto, afirma que dentro do dessecador com sílica-gel o mesmo permaneceu viável por aproximadamente 100 dias. Verificou também que o armazenamento à temperatura entre -10°C e -20°C por 24 meses propiciou alto índice de viabilidade para ambas as espécies.

O pólen de alface foi armazenado por EENIK (1983) à temperatura ambiente (20°C), refrigerador (4°C) e "freezer" (-18°C). O autor detectou a perda de viabilidade em

2 dias à temperatura ambiente; já no refrigerador isto se deu em 4 dias. Em estudos de armazenamento para o pólen de silva PERRY & MOORE (1985) observaram que a germinação decresceu linearmente com o incremento do tempo. O período necessário para atingir 50% de inviabilidade variou entre cultivares de 2,5 a 10 dias. O armazenamento à temperatura de 6°C dobrou o tempo necessário para atingir 50% de inviabilidade. O pólen de lúpulo foi armazenado por HAUNOLD & STANWOOD (1985) em refrigerador (3°C), em "freezer" (-18°C) e em nitrogênio líquido (-196°C). Os autores observaram que o pólen armazenado a -18°C sofreu uma redução de viabilidade de aproximadamente 50% depois de um ano, enquanto o pólen armazenado a 3°C tornou-se completamente inviável em um ano.

O armazenamento sob baixas temperaturas conseguidas pelo emprego de gases liquefeitos tem sido destacado em muitos trabalhos, especialmente em nitrogênio líquido. As temperaturas muito baixas (entre -180°C e -271°C) de acordo com STANLEY & LINSKENS (1974) reduzem a atividade citoplasmática a praticamente zero. Dessa forma, o pólen pode ser armazenado por um longo período de tempo. Citam ainda estudos indicando que o pólen de *Lupinus* preservado a -180°C poderia permanecer inalterado e vivo por mais ou menos um milhão de anos. Em seus estudos a respeito de armazenamento do pólen em nitrogênio líquido (-196°C) LIVINGSTON & CHING (1967) destacam que dois pesquisadores japoneses mantiveram viável o pólen de 30 angiospermas por um período de

5 a 7 anos. Verificaram que grande parte do pólen manteve o seu poder germinativo mesmo à umidade entre 10 e 23%. Ainda GANESHAN (1985) e HAUNOLD & STANWOOD (1985) destacam o armazenamento de pólen bem sucedido em nitrogênio líquido.

É interessante acrescentar que não se tem detectado o efeito inicial do nitrogênio líquido na germinação. PARFITT & ALMEHDI (1983) em testes para detectar o efeito do congelamento em nitrogênio líquido a -196°C visando o armazenamento não detectaram diferença na viabilidade entre pólen tratado e não tratado.

2.1.5. Composição da atmosfera

Um outro fator importante a ser destacado no armazenamento de pólen é a composição da atmosfera que o envolve. Verifica-se que a redução ou acréscimo de certos gases pode concorrer para uma maior longevidade.

STANLEY & LINSKENS (1974), em revisão detalhada a este respeito, detectaram em grande número de trabalhos que a presença de CO_2 e N_2 incrementou a longevidade do pólen. Todavia, a presença do oxigênio foi indesejável e o emprego do vácuo tem sido bem sucedido para superar o problema.

Tem-se utilizado o vácuo para conservar o pólen de várias espécies como; *Citrus*, *Lilium*, *Pyrus*, *Pinus nigra* e *Betula verrucosa*. No entanto, STANLEY & LINSKENS (1974)

citam que muitos autores observaram existir pólen que não suporta o armazenamento à pressão reduzida, como é o caso de *Hordeum*, *Antirrhinum*, *Saccharum* e *Cinchona*.

MATTHEWS & KRAUS (1981) relataram que as pesquisas conduzidas na Carolina do Norte mostraram ser o armazenamento do pólen a vácuo mais eficiente. Por outro lado, SAHAR & SPIEGEL-ROY (1980) armazenaram pólen de *Citrus reticulata* (Blanco) e *Poncirus trifoliata* (C.) em atmosfera de N_2 ou CO_2 e temperatura de $-18^{\circ}C$.

Em estudos feitos com *Pinus* STANLEY & LINSKENS (1974) observaram que ocorreu germinação depois de 2 anos e meio, quando o pólen foi armazenado sob vácuo à temperatura de $5^{\circ}C$. Todavia, o pólen armazenado a $5^{\circ}C$ sem vácuo sobreviveu somente 378 dias.

2.1.6. Infecção por microorganismos

A contaminação do pólen é um fator negativo na conservação. STANLEY & LINSKENS (1974), revisando este assunto, verificaram que muitos trabalhos enfatizam o problema da infecção por fungos. A influência exercida pode ser direta ou indireta. Indiretamente, pode acarretar mudanças químicas dos colóides ou a inibição de enzimas como amilases e invertases. Também é enfatizado o efeito destrutivo da luz ultra-violeta sobre a viabilidade do pólen na prevenção de infecção por fungos.

2.2. TÉCNICAS DE ARMAZENAMENTO

O armazenamento como meio de manutenção da viabilidade do pólen é uma ferramenta valiosa empregada pelos melhoristas e geneticistas.

Para fins didáticos pode-se dividi-lo em dois tipos, a curto e longo prazos. Segundo WANG (1975) normalmente procede-se ao armazenamento a curto prazo visando aos estudos de genética e melhoramento e a longo prazo para conservação genética. O autor refere-se ainda em seu trabalho a preocupação quanto a ocorrência de alterações que podem levar após muitos anos a populações geneticamente diferentes das originais.

Por sua vez MATTHEWS & KRAUS (1981) citaram que para ambos os tipos de armazenamento a maior preocupação consiste na redução do teor de umidade e temperatura mantendo-as sem flutuação.

Conhecendo-se os fatores que podem afetar a longevidade do pólen tem-se procurado utilizar métodos de armazenamento de forma que esses fatores interfiram o mínimo possível nos propósitos de conservação.

A maioria dos métodos empregados envolvem a redução do teor de umidade e manutenção do pólen à baixa tem

peratura, de forma que as flutuações das mesmas sejam evitadas.

Como foi destacado anteriormente, tem-se empregado com freqüência o armazenamento em refrigerador e "freezer". No entanto, ultimamente tem-se desenvolvido métodos de conservação em gases liquefeitos (temperaturas extremamente baixas).

SNYDER & CLAUSEN (1974) armazenaram o pólen em ampolas visando a obtenção de um meio adequado para manter a viabilidade do mesmo durante o transporte, quando o controle de temperatura e umidade não é possível. Evidenciaram ainda que um procedimento alternativo envolve o acréscimo de nitrogênio líquido às ampolas seguido pelo fechamento das mesmas à pressão ambiental. Enfatizaram que, embora o transporte das ampolas sob vácuo seja praticável para algumas espécies, os resultados medíocres obtidos e o alto custo não justificam o uso desse método para o armazenamento em geral.

Uma outra técnica que tem sido empregada no armazenamento consiste no uso de solventes orgânicos. Essa técnica foi apresentada por STANLEY & LINSKENS (1974) como um meio de superar o problema de se manter uma umidade relativa específica, sendo empregada com sucesso no transporte do pólen, sem a necessidade de gelo seco ou refrigeração. Salientam que a mesma não é de uso geral, mas em alguns casos poderá constituir-se em um método de armazenamento fácil, e

pecialmente quando pretende-se fazer a polinização manual e também nos casos em que o pólen apresenta uma superfície viscosa. Afirmam que este tipo de armazenamento não é empregado para todo tipo de pólen. Por isso, cada solvente deve ser testado individualmente para as espécies de interesse. Estudando o pólen de *Iris ensata* Thunb. YABUYA et alii (1982) observaram que a germinação, bem como o crescimento do tubo polínico não foram alterados quando mergulhou-se o pólen em certos solventes, dentre eles: acetona, acetonitrila, éter etilíco, éter de petróleo, etc. Já para outros solventes tais como: n-butil, acetoetil, xileno, tolueno, butanol, cloro de metileno, etanol e metanol observaram um decréscimo na germinação. Já AGARWAL (1983) armazenou pólen de videira à temperatura de 4 a 6°C em álcool amílico e benzeno, após 6 meses observou germinação de 57,9% e 50,71%, respectivamente. Ressaltam ainda STANLEY & LINSKENS (1974) que uma outra vantagem de se empregar solventes orgânicos refere-se aos baixos custos envolvidos para certos produtos como acetona, benzeno e éter de petróleo.

SPRAGUE (1977) destacou cinco métodos de armazenamento do pólen que são utilizados na Carolina do Norte:

- armazenamento em refrigerador a 2°C sob vácuo
- armazenamento em "freezer" a -20°C sob vácuo

- armazenamento em refrigerador a 2°C em frascos ta pados com borracha
- armazenamento em frascos tapados com algodão a 2°C
- armazenamento em frascos tapados com algodão em dessecador com LiCl a 2°C.

Salientou o autor que os resultados indicaram ser o método do vácuo o mais efetivo: os frascos tapados com borracha e os vedados com algodão como intermediários, e o método do dessecador com LiCl como o menos efetivo.

2.3. TESTES DE VIABILIDADE DO PÓLEN

Qualquer que seja o teste de viabilidade empregado, o mesmo deve avaliar com precisão a potencialidade do grão de pólen recém-colhido e armazenado. Pode-se classificar os métodos básicos de avaliação do pólen em dois tipos: "in vivo" e "in vitro".

2.3.1. Testes "in vivo"

No teste de germinação "in vivo" deposita-se o grão de pólen em um estigma receptivo e, após um determinado período de tempo, destaca-se o estilete e em seguida procede-se a contagem do número de tubos que penetraram no estigma. Compara-se em seguida ao número total de grãos (STANLEY & LINSKENS, 1974). Os mesmos autores citam situações obser-

vadas por outros pesquisadores que podem dificultar a prática do método de germinação "in vivo":

- dificuldade de penetração do tubo polínico na superfície estigmática devido a superfície cuticular.
- a presença de água no estigma pode levar o pólen à ruptura, de forma que o mesmo não germina conseqüentemente.
- quando o estigma não se encontra receptivo ou quando há incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo.
- a aplicação de uma concentração alta do pólen pode inibir a penetração do tubo polínico no estilete.
- a ocorrência de uma queda acentuada na temperatura pode modificar drasticamente a germinação do pólen "in vivo" e conduzir a uma viabilidade aparentemente baixa.
- dificuldade de se identificar os tubos polínicos dos grãos germinados no estigma.

A capacidade do pólen produzir sementes, segundo STANLEY & LINSKENS (1974), pode ser utilizada como critério de viabilidade. Citaram o tempo como um dos fatores que influenciam na opção por esse teste. Para pinho são necessários 20 meses e para muitas angiospermas de 1 a 3 meses. Além do mais a interferência de substâncias e outros bloqueios para o crescimento normal do pólen pode resultar em um índice de viabilidade não confiável.

Fatores como número de óvulo disponível para fertilização, quantidade de pólen aplicado à superfície estigmática e período do dia para aplicação são todos estatisticamente importantes nos ensaios de viabilidade de *Zea mays* (fatores observados por vários autores citados por STANLEY & LINSKENS, 1974).

2.3.2. Testes "in vitro"

Segundo HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON (1984) os métodos utilizados para avaliação da qualidade do pólen "in vitro" são:

- a) teste de germinação;
- b) teste do conteúdo de células vegetativas com corantes;
- c) testes de atividades enzimáticas e procedimento fluorocromático (FCR), principalmente com testes de integridade da membrana plasmática da célula.

Face a maior utilização de testes de germinação "in vitro" e corantes específicos para avaliação de viabilidade do pólen passaremos à análise mais detalhada.

2.3.2.1. Germinação

São conhecidos vários métodos de germinação "in vitro" STABLEY & LINSKENS (1974) descreveram uma série deles. Merece destaque, no entanto, o meio de germinação

contendo ágar, ou gelatina. Trata-se de um meio bastante em pregado. Os estudos revelam que o mesmo é muito atrativo uma vez que oferece facilidade à incorporação de açúcar ou outros estimulantes à germinação do pólen, além de proporcionar umidade relativa constante. Os autores acrescentam a isso a observação com respeito a facilidade de manejo das lâminas e a possibilidade de preparar quantidades permanentes. Destacam que as condições aeróbicas na superfície da lâmina são muito convenientes. FARMER JR. & HALL (1974) utilizaram para testes de germinação "in vitro" de *Prunus serotina* Ehrh. o meio com ágar devido a facilidade de manuseio.

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar qualitativa e quantitativamente os componentes necessários para a melhor composição do meio de cultura para a germinação do grão de pólen. Os componentes são constituídos basicamente por carboidratos e elementos estimulantes.

A necessidade de uma fonte de carboidrato é evidente na maioria das vezes. Ocorrem apenas alguns casos como o *Pinus*, citado por DORMAN (1976), em que o pólen germina só em água destilada, sem a necessidade de outros aditivos.

Duffield⁵, citado por KLAEHN & NEU (1960) afir

⁵ DUFFIELD, J.W. Studies of extraction, storage and testing of pine pollen. Z. Forstgenetik, 3:39-45, 1954.

ma que o grão de pólen, a exemplo das sementes apresenta considerável quantidade de reservas na forma de carboidrato ou gordura. Este alimento é, segundo o autor, na maioria das vezes suficiente para o crescimento inicial do tubo polínico, mas há a necessidade de fontes externas para manter o crescimento posterior.

Dois papéis são atribuídos aos açúcares (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974): (a) exercem o controle da pressão osmótica; (b) servem como substrato respiratório. Os autores enfatizam que o pólen de muitas espécies pode romper-se quando colocado na água. O emprego de uma determinada quantidade de açúcar limita a taxa de difusão da água, evitando dessa forma o rompimento do pólen. Afirmam ainda que dos açúcares testados para promover a germinação e crescimento do tubo polínico, a sacarose (açúcar presente na maioria dos pólenes) é o mais efetivo.

KLAEHN & NEU (1960) verificaram que o melhor meio de germinação é composto de 10% de sacarose para *Prunus serotina* e *Populus tremuloides*. Em revisão detalhada de vários trabalhos DIAVANSHIR & FECHNER (1975) encontraram que soluções aquosas de menos de 20% de sacarose estimularam a germinação do pólen de *Pinus*, *Picea* e *Abies*, os mesmos autores detectaram que o melhor meio de cultura para a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico foi constituído de 10% de sacarose e 0,5% de ágar. Por sua vez WRIGHT (1976)

recomendou que o teste de germinação seja feito em um meio de cultura contendo ágar 2% e sacarose de 5 a 10%.

O método de germinação utilizado na Carolina do Norte, de acordo com SPRAGUE (1977), envolve o uso de uma solução de mel sobre o qual o pólen é esborrifado para germinação. STANLEY & LINSKENS (1974), no entanto, destacam observações com respeito ao emprego de lactose animal. Com este tipo de carboidrato, segundo os autores, o pólen pode metabolizar mais rapidamente, propiciando uma pressão osmótica adequada ao crescimento do tubo polínico.

Um fato interessante observado por SNYDER & CLAUSEN (1974) é que a concentração ótima de açúcar visando a germinação do pólen de *Pinus* e *Picea* incrementou de 3% para 20% quando o pólen foi armazenado por 6 meses.

É importante salientar que todos os testes de germinação conhecidos para o *Eucalyptus* envolve o uso de sacarose, a saber: BODEN (1958); GABRIELLI et alii (1965) e BORGES et alii (1973). Além do mais, tem-se fixado determinada dose de sacarose para avaliar o pólen recém-colhido e armazenado por diferentes períodos.

O acréscimo ao meio de germinação de elementos como boro, cálcio, hormônios e enzimas tem desempenhado papel fundamental na germinação do pólen em certos testes de viabilidade.

O efeito estimulante do boro tem sido observado há tempo. Segundo BHOJWANI & BHATNAGAR (1974) o boro dentre as substâncias inorgânicas, na forma de ácido bórico ou borato, é a que apresenta o efeito mais marcante na germinação do pólen e crescimento do tubo polínico. Afirmam ainda ser o pólen da maioria das espécies deficiente em boro. "In nature" essa deficiência é suprida pelo nível comparativamente alto de boro existente no estigma e estilete. Quando o grão de pólen está crescendo "in vitro" grandes quantidades (10 - 200 ppm) são supridas exogenamente. Salientam que a presença desse elemento reduz o rompimento do tubo polínico, aumentando o seu crescimento, bem como a porcentagem de germinação.

Ao revisar detalhadamente vários trabalhos que analisam o efeito do boro na germinação STANLEY & LINSKENS (1974) destacaram o seguinte:

- em determinados casos a adição de extrato de estigma ao meio de cultura estimula a germinação devido ao alto conteúdo de boro existente no mesmo.
- em determinados casos, mesmo uma pequena quantidade de boro (5 - 10 ppm) pode provocar um efeito tóxico. No entanto, muitos trabalhos com respeito ao acréscimo desse elemento ao meio de germinação aconselham de 100 a 150 ppm como doses que propiciam melhores resultados.

- uma observação relativa ao comportamento do boro indicou que o produto natural da fotossíntese na presença de $C^{14}O_2$ foi mais facilmente translocado da folha para o resto da planta quando comparado ao crescimento num meio sem boro.
- para determinadas espécies como *Tecoma radicans* a presença desse elemento estimula a absorção de alguns açúcares como sacarose, provocando um aumento correspondente no consumo de oxigênio e estimulando o crescimento do tubo polínico. Evidencia-se, portanto, que o crescimento do tubo é associado ao metabolismo.

Várias observações estão de acordo com o fato de que o comprimento do tubo polínico encontra-se diretamente relacionado com a concentração de ácido bórico, ao passo que a porcentagem de pólen estourado é inversamente proporcional.

Dentre os meios de germinação com ágar e sacarose, segundo FARMER & HALL (1974), aquele com a adição de ácido bórico propiciou maior porcentagem de germinação para o pólen de *Prunus serotina* Ehrh.

Reichle⁶, citado por DIAVANSHIR & FECHNER (1975), mostrou que 0,01% de ácido bórico em um meio contendo 0,7%

⁶ REICHLER, R.E. A study of germination and growth of coniferous pollen "in vitro". Fort Collins, 1960. 53p. (M.S. Colorado State University).

de ágar e 7,5% de sacarose estimulou o crescimento do tubo polínico para *Pinus*, *Picea* e *Abies*, no entanto, o ácido bórico na concentração de 0,1% inibiu a germinação e o crescimento do tubo polínico de quase todas as espécies estudadas. Notou-se que o pólen de *Pinus contorta* Dougl. não foi estimulado em nenhum dos três níveis de ácido bórico testados.

O pólen de folhosas freqüentemente necessita mais do elemento boro que as coníferas (SNYDER & CLAUSEN, 1974). Afirmam ser o meio com 0,001 a 0,015% de ácido bórico satisfatório para muitos tipos de pólen. Todavia, concentrações acima de 0,015% apresentaram-se normalmente inibitórias ou tóxicas. STANLEY & LINSKENS (1974) enfatizam que embora um grande número de substâncias tenham sido utilizadas para estimular a germinação e crescimento do grão de pólen, o efeito do boro (como ácido bórico ou bórax) supera qualquer hormônio conhecido (vitaminas, antibióticos ou qualquer outra substância química) exceto a giberelina, que tem sido muito proveitosa em vários casos.

Diversas hipóteses foram lançadas para explicar o papel desempenhado pelo boro, no entanto, nenhuma esclarece satisfatoriamente. Basicamente os estudiosos atribuem os seguintes papéis ao boro:

- translocação de açúcares (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974; STANLEY & LINSKENS, 1974). Ocorre neste caso a formação do complexo borato-açúcar, sendo que a célula utiliza o açúcar e libera o borato.
- influência direta ou indireta nos passos enzimáticos da biossíntese de carboidratos (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974; STANLEY & LINSKENS, 1974).

Nesta situação supõe-se que o íon borato esteja associado à membrana celular e reagindo quimicamente com a molécula de açúcar facilita a passagem através da membrana. O açúcar penetra na célula por meio de uma segunda reação.

- Efeito na relação com água (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974) prevenindo o rompimento do tubo polínico.

De acordo com STANLEY & LINSKENS (1974) o boro age nos passos enzimáticos da biossíntese de carboidratos. Segundo os autores a rejeição da hipótese relativa à participação na translocação de açúcares (formação do complexo borato-açúcar) deve-se à ocorrência de grande disparidade entre o boro livre e o açúcar. Em análise detalhada relativa ao papel do boro PETER & STANLEY (1974) afirmam que a teoria mais persistente refere-se ao seu envolvimento na absorção de açúcar.

O cálcio também é tido como um elemento importante na germinação do pólen. Tem-se observado uma maior porcentagem de germinação "in vitro" nos casos em que os grãos

encontram-se agrupados. Este fenômeno é denominado "efeito de população" e tem sido reconhecido por muitos autores (STANLEY & LINSKENS, 1974; BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974; SNYDER & CLAUSEN, 1974). A ocorrência do "efeito de população" é atribuído ao cálcio. O cálcio, de acordo com BHOJWANI & BHATNAGAR (1974), participa da seguinte forma: em meio aquoso o mesmo se difunde rapidamente, de forma que permanece uma pequena quantidade no grão de pólen. Quando os grãos de pólen encontram-se em grupos na superfície do meio semi-sólido, o Ca^{++} difundido pode ser preso entre os grãos e dessa forma produzir o efeito de população. Por outro lado, FARMER & HALL (1974) empregaram na germinação "in vitro" de *Prunus serotina* Ehrh. uma densidade de pólen que variou de 30 a 150 grãos/mm². Não detectaram, no entanto, para essas concentrações uma relação entre densidade do pólen e porcentagem de germinação.

Grande número de trabalhos acrescentam ao cálcio o efeito antagônico que pode exercer a ação inibitória de certos metais pesados como o Cu (STANLEY & LINSKENS, 1974; BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974). Entretanto, STANLEY & LINSKENS (1974) acrescentam que nos trabalhos desenvolvidos para se verificar o comportamento do cálcio em relação a tratamentos enzimáticos ficou claro que o papel do cálcio encontra-se relacionado às substâncias pecticas.

Vários trabalhos (BREWBAKER & KWACK, 1963; BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974) citam que o efeito do cálcio de-

pende da presença de uma pressão osmótica adequada, oxigênio e borato. Essa pressão pode ser conseguida por intermédio de um doador metil, tal como metionina e outros cátions inorgânicos como Mg^{++} , K^+ , Na^+ e H^+ .

De forma geral, quando se adiciona cálcio ao meio de germinação nota-se as seguintes características (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974):

- o crescimento do tubo polínico é mais vigoroso
- o tubo polínico é mais reto e rígido
- o pólen, bem como o tubo polínico são menos sensíveis a pequenas mudanças do meio
- a permeabilidade é controlada. A ausência do cálcio no meio germinativo leva a incrementar a permeabilidade da membrana do tubo polínico provocando dessa forma a perda de metabólitos internos.

Segundo STANLEY & LINSKENS (1974) nenhuma substância como o cálcio com exceção do ácido giberélico, promoveu tão eficazmente o crescimento do tubo polínico.

BHOJWANI & BHATNAGAR (1974) citam outros elementos que podem ser componentes importantes do meio de germinação como: enzimas (celulases e pectinases) e hormônios (auxinas e giberelinas). DORMAN (1976) afirma que os reguladores de crescimento utilizados no meio germinativo do grão de pólen dão amplos resultados que variam de leve estímulo à inibição completa da germinação.

Com respeito ao tempo e temperatura necessários para a germinação do pólen dispõe-se de uma série de estudos, dentre os quais destacam-se:

- DIAVANSHIR & FECHNER(1975) verificaram uma melhor germinação do pólen de *Juniperus* de 3 a 5 dias sendo que o crescimento do tubo polínico atingiu seu máximo comprimento dentro de 16 ou 17 dias.
- DORMAN (1976) citou a indicação de um período de 72 horas para germinação do pólen de *Pinus* sob uma temperatura entre 26 a 27°C.
- WRIGHT (1976) destacou que o tempo de germinação deve ser de 48 a 72 horas a 24°C.
- SPRAGUE (1977) enfatizou que no método utilizado na Carolina do Norte tem-se deixado o pólen a temperatura ambiente (22°C) por 48 horas, evitando-se a flutuação de temperatura.
- FARMER & HALL (1974) procedendo a testes de germinação "in vitro" do pólen de *Prunus serotina* Ehrh submeteram o mesmo à incubação por um período de 24 horas sob temperatura de 26°C.

Nota-se que o tempo empregado para a germinação, dependendo sobretudo da espécie, pode levar de algumas horas até muitos dias. Quanto a temperatura WORSLEY (1959) observou que a germinação do *Pinus ponderosa* deu-se depois de 8 dias a 3°C, enquanto a 15°C germi-

nou em dois dias e a 30°C começou a germinar em 6 horas. Na avaliação do pólen de pera VASILAKAKIS & PORLINGS (1985) notaram uma redução à temperatura abaixo de 15°C, ao passo que a taxa de crescimento do tubo polínico "in vitro" aumentou com a temperatura entre 5 e 25°C. No entanto o período de incubação quando muito longo pode tornar-se problemático. Segundo GODDARD & MATTHEWS (1981) para o pólen de pinho cujo tempo necessário é de 72 horas, a contaminação pode constituir-se em um sério problema. Para minimizá-lo, deve-se empregar fungicidas em baixa concentração. Salientam que ao evitar o uso do açúcar ou outro carboidrato no meio de germinação também reduz-se o crescimento das hifas. Todavia, como foi discutido, nem todo pólen germina satisfatoriamente, na ausência de uma fonte de carboidrato.

Além dos fatores já citados evidencia-se como um dos mais importantes a alta umidade relativa necessária durante o período de germinação.

Quanto ao número de grãos a serem observados na avaliação da viabilidade do pólen DUFFIELD & SNOW (1941) relataram estudos com apenas 50 grãos tomados ao acaso.

A densidade do pólen deve ser baixa o suficiente para facilitar o exame dos grãos individualmente (SNYDER & CLAUSEN, 1974).

Tem-se na Tabela 2, a seguir, o tamanho de amostra sugerido por STANLEY & LINSKENS (1974).

Tabela 2. Tamanho da amostra de pólen necessário para dados significativos sugerido por STANLEY & LINSKENS (1974).

Germinação (%)	Número de grãos a serem contados (n)		
	Nível de confiança = Nível de significância		
	0,01	0,05	0,10
1 ou 99	380	15	4
5 ou 95	1825	73	18
10 ou 90	3457	138	35
15 ou 85	4898	196	49
20 ou 80	6147	246	61
25 ou 75	7203	288	72
30 ou 70	8067	323	81
35 ou 65	8740	350	87
40 ou 60	9220	369	92
45 ou 55	9507	380	95
50	9604	384	96

A avaliação da porcentagem de germinação de *Prunus serotina* Ehrh. foi feita por FARMER & HALL (1974) através da contagem de 100 grãos por repetição. Verificaram que o crescimento do tubo polínico completou-se em 6 horas e o seu comprimento variou em função da árvore doadora. Já SPRAGUE (1977) utilizou 200 grãos na avaliação da viabilidade. Depois da contagem final usou o seguinte critério para avaliar o pólen:

Excelente:	35% ou mais de germinação
Bom:	20 - 34% de germinação
Considerável:	10 - 19% de germinação
Pobre:	1 - 9% de germinação
Muito pobre:	morto

Há uma tendência de empregar-se um total de 400 grãos de pólen no teste de germinação para se garantir uma boa avaliação do lote (MARTINS et alii, 1981)

Quanto ao delineamento estatístico empregado, muitos trabalhos como o de GABRIELLI et alii (1965) e BORGES et alii (1974) não apresentam referência. Segundo STANLEY & LINSKENS (1974), o mesmo depende da finalidade do teste, ou seja: determinar entre várias amostras a de maior viabilidade ou determinar o índice de viabilidade antes do uso de determinado pólen. Para ambos os casos tem-se uma resposta binomial e os autores aconselham o uso do teste "t". Afirmam que o tamanho da amostra para tornar o teste válido dependerá sobretudo da faixa de germinação média e do desvio padrão da média. Enfatizam ainda os autores que para uma variação de aproximadamente 8% entre repetições e uma germinação de 60% conta-se 2 x 200 grãos. Afirmam ainda que a utilização de campos escolhidos com uma distribuição uniforme normalmente produz a variação de 8% entre ensaios de viabilidade do pólen "in vitro".

Existem ainda outros fatores que influenciam na germinação do pólen, dentre eles o manejo. Pode-se in-

cluir neste caso o período de coleta e posição dos botões florais na copa. Podem ocorrer variações na germinação do pólen dentro de uma mesma árvore (KLAEHN & NEU, 1960). Os autores destacam que com frutíferas Kobel⁷ obteve uma germinação mais alta para o pólen proveniente de flores junto ao tronco. Os autores atribuíram a baixa germinação observada para *Betula papyrifera* e não germinação de *Ulmus americana* a estas variações observadas em espécies frutíferas. Salientam que o pólen de *Betula papyrifera* foi obtido na secção mais baixa da copa e os amentilhos na extremidade. Ainda KLAEHN & NEU (1960) afirmaram ser provável que a quantidade de alimento armazenado nos grãos possam diferir na mesma árvore de ano para ano. De acordo com BODEN (1958) existem variações na floração entre diferentes "stands" de uma espécie e entre árvores individuais de cada "stand". Afirma que embora a época de floração seja alterada por fatores como clima, existe um controle genético forte na herança individual. Acrescenta ainda que não há correlação entre abundância de pólen e porcentagem de germinação. Dessa forma, quando se coleta o material em floração no campo, corre-se o risco de ter pólen de árvores com baixa porcentagem de germinação. Aconselha-se, portanto, a coleta do pólen de muitas árvores quando não há necessidade de usar árvores individuais.

⁷ KOBEL, F. Lehrbuch des Obstbaues auf Physiologischer Grundlage. Zweite Auflage, Berlin, Springer Verlag, 1954.

O transporte adequado é um fator a ser considerado. No caso do *Eucalyptus* spp. o melhor método de condução do campo ao laboratório continua sendo a imersão da extremidade dos galhos cortados em baldes contendo água. BODEN (1958) aconselhou este método e salienta que a condução das flores envolvidas em polietileno poderia levar à perda quase total da fertilidade.

A separação do pólen das estruturas reprodutivas é aconselhável para o armazenamento conveniente. Toda via, o processo de extração pode tornar-se mais ou menos trabalhoso em função da espécie empregada. No caso do gênero *Pinus* a aplicação de uma leve secagem seguida do peneiramento dos cones propicia a obtenção de grandes quantidades de pólen. Já para o gênero *Eucalyptus* a dificuldade de extração é maior devido a própria característica floral. Acrescenta-se a isso o fato do pólen ser viscoso e apresentar tendência a aderir às paredes da antera, como já foi discutido anteriormente.

Segundo Stanley & Search⁸, citados por GRIFFIN et alii (1982) o método de extração úmido pode provocar uma queda na viabilidade. Argumentam que a imersão em água cau-

⁸ STANLEY, R.G. & SEARCH, R.W. Pollen protein diffusates. In: HESLOP-HARRISON, E. Pollen development and physiology. London, Butterworths, 1971.

sa a rápida eluição das proteínas das paredes do pólen. Citam que em estudos de germinação o pólen de pera (*Pyrus communis*) não se detectou redução significativa depois de uma eluição por 15 segundos, mas após repetir o processo por quatro vezes houve perda completa da viabilidade. A extração através de solventes orgânicos é atrativa. No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos a esse respeito.

A variação na germinação observada devido às causas genéticas deve ser também enfatizada, STANLEY & LINSKENS (1974) citam exemplos de variação para uma população natural de alfafa diplóide (*Medicago sativa*). Neste caso, o pólen de algumas plantas produziram tubos polínicos longos quando germinaram "in vitro" e outras produziram tubos polínicos curtos. Detectaram uma diferença de 100% entre os mesmos e constataram a ocorrência do mesmo padrão para frutos formados. O pólen que emitiu tubo curto produziu poucas sementes e o pólen das linhagens com tubo grande produziu muitas sementes.

Tem-se observado também entre as espécies uma diferente capacidade de germinação do pólen "in vitro". Essas variações entre espécies têm sido ilustradas em vários trabalhos. Diferenças entre as espécies de *Eucalyptus* spp. foram detectadas por BORGES et alii (1973) referentes ao pólen recém-colhido e também armazenado. A Tabela 3 ilustra os dados obtidos na avaliação de viabilidade do pólen recém-colhido.

Tabela 3. Porcentagem de germinação do pólen recém-colhido em função das diferentes espécies.

Espécie	Germinação (%)
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	78,1 a
<i>Eucalyptus robusta</i>	53,4 b
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	51,2 b

Fonte: BORGES et alii (1973)

Teste de Tukey ao nível $\alpha = 0,01$.

O aumento do nível de ploidia normalmente encontra-se ligado ao decréscimo de fertilidade do pólen, embora o incremento da ploidia não reduzirá necessariamente a viabilidade detectada pela germinação "in vitro" (STANLEY & LINSKENS, 1974). Os autores destacam ainda em seus estudos a relação existente entre a viabilidade do pólen e a fertilidade para uvas triplóides e tetraplóides. Observou-se que para a maioria das 33 variedades, cultivares e espécies estudadas, a germinação "in vitro" foi muito parecida, mas as plantas triplóides apresentaram uma redução na fertilidade do pólen entre 3% a 96%, quando a avaliação foi feita com base na formação de fruto.

O estágio do desenvolvimento do pólen é importante. O insucesso no teste de germinação pode ser devido

ao manuseio do mesmo em estágio inadequado. Em seu trabalho com *Annona cherimola* Mill. SAAVEDRA (1977) detectou uma menor produção de sementes para as flores abertas inicialmente. Observações citológicas detalhadas revelaram que a maioria dos grãos de pólen dessas flores encontravam-se no estágio de tetrade por ocasião da antese. O pólen exibia paredes espessas, impregnadas de amido e não germinou "in vitro". No entanto, as flores abertas posteriormente apresentaram maior proporção de grãos de pólen individuais, sem amido e com atividade metabólica mais intensa. Esse pólen germinou "in vitro" sem nenhum problema depois de algumas horas.

A germinação "in vitro" apresenta alguns aspectos negativos e sua validade tem sido questionada. Sallientam STANLEY & LINSKENS (1974) que vários trabalhos mostram a possibilidade do pólen viável não ser necessariamente fértil. Acrescentam que o meio de cultura para a germinação do grão de pólen sendo deficiente pode inibir a germinação ou permitir um pequeno crescimento do tubo polínico. Ainda os mesmos autores afirmam que os tubos polínicos cultivados "in vitro" encerram o seu crescimento antes de atingir o tamanho normalmente alcançado no estilete. Segundo VASIL (1974) a quantidade inicial de ácido relativamente pequena ou outras substâncias como auxinas e giberelinas fornecidas pelo pólen, que encontra-se germinando "in vitro", ao pisti-

lo serve para iniciar o crescimento mínimo e os processos metabólicos. Como resultado, liberam enzimas e quantidades adicionais de auxinas dos tecidos do estilete do ovário.

Além do mais, quando se pratica o teste de germinação "in vitro" pode-se obter resultados distorcidos devido ao efeito de população produzido pelo cálcio (STANLEY & LINSKENS, 1974; BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974; SNYDER & CLAUSEN, 1974) como foi discutido anteriormente. Devido a muitas variáveis afetarem a germinação do pólen, os resultados de testes de um determinado método, freqüentemente não são comparáveis (GODDARD & MATTHEWS, 1981).

2.3.2.2. Corantes específicos

A determinação da viabilidade do pólen através de corantes específicos é muito atrativa, especialmente devido a rapidez do processo. Ao empregar este método evita-se também o risco de contaminação que é muito comum nos testes de germinação "in vitro". Os corantes específicos podem também constituir-se em uma valiosa ferramenta para o taxonomista na identificação de híbridos (HAUSER & MORRISON, 1964). Este processo segundo os mesmos autores é baseado no fato de que o pólen de muitos híbridos é contraído e flácido, portanto não viável. Todavia, afirmam KLAEHN & NEU (1960) que a principal aplicação dos corantes específicos tem sido para a determinação da viabilidade. Acrescentam que

estes métodos não constituem-se necessariamente em substitutos adequados para os testes de germinação atuais.

A validade deste método para avaliação da viabilidade tem sido questionada, inclusive por HAUSER et alii (1964). De acordo com STANLEY & LINSKENS (1974) destaca-se entre os problemas surgidos com corantes vitais a coloração de pólen não viável de híbridos, e pólen imaturo ou abortado. Enfatizam ainda que certos pólenes apresentando uma fraca coloração podem exibir alta viabilidade. Ainda STANLEY & LINSKENS (1974) ressaltam observações com respeito a precisão dos corantes. Destacam que a maioria dos corantes não são suficientemente precisos.

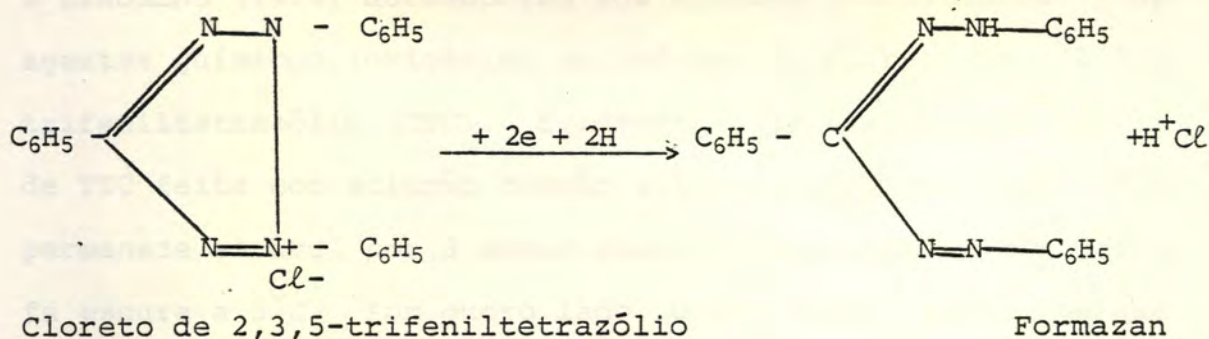
Vários são os corantes empregados para se detectar a viabilidade do pólen. Dentre eles: azul de algodão em lactofenol, anilina azul em lactofenol (HAUSER & MORRISON, 1964). Por sua vez STANLEY & LINSKENS (1974) referem-se a outros corantes específicos:

- iodeto de potássio- específico para amido,
- carmim-acético-preferencialmente colore cromossomos,
- metil-floxina verde - colore citoplasma e celulose.

Já WORSLEY (1959) aconselha o emprego do corante metil-floxina em glicerina-gel como base. As lâminas são

semi-permanentes e apresentam a vantagem de serem preparadas no campo durante o trabalho de polinização, podendo ser analisadas posteriormente.

Um dos corantes mais citados é o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio. A redução do mesmo se dá por enzimas desidrogenases (COOK & STANLEY, 1960). Essa reação propicia a formação do complexo formazan que é vermelho e insolúvel. Associa-se neste caso a capacidade de germinação com a atividade enzimática. A reação de redução do corante, de acordo com DELOUCHE et alii (1976) se dá da seguinte forma:



Este corante é empregado com grande intensidade para determinar a viabilidade de sementes. O primeiro trabalho com respeito à coloração de pólen, data de 1952, sendo que nesta ocasião VIEITEZ estudou o pólen de milho. O emprego desta espécie deve-se a grande abundância de pólen disponível e a clara percepção da cor vermelha produzida pelo mesmo. O autor verificou que o máximo de redução teve lugar a 50°C, ocorrendo um decréscimo à temperaturas superiores.

res (60°C e 70°C) devido a destruição do sistema enzimático. A reação deu-se então lentamente. Evidenciou ainda que as temperaturas entre 20°C e 45°C não afetaram a precisão dos testes, todavia, a coloração se estabeleceu mais rapidamente às temperaturas mais elevadas. Quanto a temperatura ótima salienta que a mesma nem sempre constitui-se em um ponto fixo uma vez que depende da quantidade de enzimas presentes.

O armazenamento da solução de tetrazólio deve ser cauteloso, de acordo com VIETTEZ (1952) já que a mesma é fotosensível, indicando que não deve ser exposta à luz. STANLEY & LINSKENS (1974) acrescentam aos agentes fotoquímicos os agentes químicos (oxigênio) na redução do cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC). Evidenciam que uma solução de 1% de TTC feita com solução tampão 0,15M de tris-HCl - pH 7,8 permanece estável por 3 meses quando armazenada em uma garrafa escura a 5°C . Por outro lado, GRABE (1976) salientou que para ocorrer a coloração pode-se colocar os testes em luz difusa ou no escuro, uma vez que o efeito da luz é muito pequeno e pode ser desprezado como um fator que afeta a precisão dos resultados.

Ao indicar o cloreto de 2,3,5 tifeniltetrazólio para estimar a viabilidade do pólen, ALEXANDER (1980) afirmou que os corantes normalmente empregados para identificar os grãos não abortados, como carmim acético em glicerina-gel ou lactofenol azul de algodão, apresentam certas limi-

tações. Esses corantes não são efetivos para o pólen da maioria das plantas pertencentes às famílias Malvaceae e Compositae devido a natureza espessa e impermeável das paredes do pólen. Esses grãos de pólen são difíceis de serem separados devido a presença de mucilagem e proeminentes esculturas. Ainda CHEN & CHEN (1981) utilizaram o cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) para testar o pólen de coníferas e folhosas. Concluíram que a concentração ótima de TTC foi de 0,5% e o tempo de tratamento de 12 - 18 horas. Obtiveram uma taxa de viabilidade ligeiramente menor para o pólen de conífera que aquela obtida em meio de germinação.

Dentre os diversos tipos de corantes citados por STANLEY & LINSKENS (1974) destaca-se o tetrazólio nitroazul (nitro BT). Enfatizam estudos com o emprego deste corante para as espécies florestais onde mostram que a porcentagem de viabilidade normalmente é mais alta do que aquela apresentada pelos testes de germinação.

2.3.3. Relação entre germinação "in vivo" e "in vitro"

Em seus estudos BODEN (1958) citou que Pryor⁹ encontrou uma relação direta entre a germinação do pólen e a formação de sementes para o *Eucalyptus pulvurulenta*. A

⁹ PRYOR, Dados não publicados

planta que apresentou maior quantidade de sementes foi polinizada pelo pólen com viabilidade mais alta. Quando não ocorreu germinação "in vitro" não houve produção de sementes. Porém, em um dos cruzamentos o pólen que apresentou apenas 10% de viabilidade proporcionou a produção de boa quantidade de sementes. Citando a observação de Lobanov¹⁰ atribuiu isso a uma aplicação intensa de pólen. Os autores também concordam que devido a aplicação de uma quantidade de pólen relativamente grande em cada estigma as chances de grãos de pólen apresentando baixa viabilidade "in vitro" produzirem sementes são altas.

Foi feito um estudo da relação existente entre germinação do pólen "in vivo" com corantes vitais por WIDRLECHNER et alii (1983). Analisando testes referentes a 7 genótipos de azaléia (*Rhododendron* sp.) verificaram que todos os corantes estudados exibiram correlações significativas entre coloração e germinação. Os corantes são: diacetato de fluorescina, 3-amino-9 etil carbazol (AEC) e 3-(4,5-dimetiltiazolil-2) e brometo de 2,5 difeniltetrazólio. O AEC apresentou a correlação significativa mais alta ($r = 0,96$).

¹⁰ LOBANOV, C.A. The effect of different quantities of pollen upon fertilization results. Agrobiologija, 3: 78-85, 1950. Apud. Hort. Abst., 21:1374, 1951.

STANLEY & LINSKENS (1974) destacam o trabalho de Visser¹¹, onde o autor comparou os ensaios de germinação "in vitro" com a formação de frutos em maçã, pera e tomate. Os resultados para o pólen de pera encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação da germinação "in vitro" com a formação de frutos (*Pyrus communis* var. *Clapps favorite*) feita por Visser.

Germinação "in vitro" (%)	Formação de fruto
abaixo de 20	nenhuma ou pobre
20 - 40	de pobre a moderada
40 - 60	de moderada a normal
acima de 60	normal

Fonte: STANLEY & LINSKENS (1974).

Em revisão detalhada sobre o assunto STANLEY & LINSKENS (1974) verificaram casos em que o pólen de tomate não germinou "in vitro", mas foi capaz de formar uma quantidade de sementes equivalente àquela obtida para pólen recém-colhido. Deve ser enfatizado, todavia, a capacidade do tomate produzir frutos partenocárpicos. Tornou-se evidente também nestes estudos que o pólen apresentando viabilidade rela

¹¹ VISSER, T. Med. Lardbouwhogeschool Wageningen. 55(1), 1 (56,59,64,78,79,80).

tivamente baixa, ou seja, 40% ou menos, ainda é capaz de formar frutos normalmente. Os mesmos autores acrescentam que muitos fatores podem afetar a quantidade de frutos e sementes obtidos após a polinização. Verificaram em muitos trabalhos que o pólen apresentando baixa porcentagem de germinação pode produzir sementes satisfatoriamente.

Devido ao ensaio "in vivo" ser muito demorado, a maioria dos pesquisadores preferem métodos alternativos de germinação "in vivo" e in vitro".

2.4. ARMAZENAMENTO E VIABILIDADE DO PÓLEN DE

Eucalyptus spp.

2.4.1. Armazenamento

O primeiro trabalho conhecido sobre armazenamento do pólen de *Eucalyptus* spp. é o de Pryor¹², citado por BODEN (1958), onde o autor utilizando pólen armazenado obteve cruzamento de *Eucalyptus robusta* com *Eucalyptus cinerea*. O trabalho de BODEN (1958) no entanto mostrou maiores detalhes a este respeito. O autor armazenou o pólen de *Eucalyptus maculosa* de botões florais com o opérculo começando a

¹²PRYOR, L.D. An F₁ hybrid between *Eucalyptus cinerea* F. Muell and *Eucalyptus robusta*. Proc. Linn. Soc. N.S.W. (5/6), 1954.

romper. Submeteu as estruturas estaminais à temperatura de -16°C , 2°C e ambiente. Avaliou mensalmente o pólen armazenado tendo verificado que aquele submetido à temperatura ambiente perdeu a viabilidade completamente após um mês. Já o pólen que foi conservado à 2°C manteve-se viável até três meses, sendo que aos seis meses haviam pouquíssimos grãos viáveis. Para a temperatura de -16°C detectou-se uma viabilidade de 60% aos sete meses. Ainda o mesmo autor enfatizou a necessidade de separação do pólen das estruturas estaminais após uma secagem prévia. Recomendou que a secagem prévia deve ser feita com sílica-gel, já que dessecantes como cloreto de cálcio e hidróxido de potássio podem causar danos ao pólen. Indicou ainda que as temperaturas entre 20 e 30°C seriam mais adequadas para a germinação do pólen.

Em seguida GABRIELLI *et alii* (1965) utilizando a metodologia de BODEN (1958) armazenaram e testaram o pólen de várias espécies de *Eucalyptus*. Os autores concluíram que o armazenamento a 4°C é melhor do que a temperatura ambiente e para a conservação do pólen é melhor extraí-lo do botão floral.

Estudos de armazenamento e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* foram também conduzidos por BORGES *et alii* (1973). Os autores coletaram ramos apresentando botões florais com os opérculos prestes a se desprender em tempo seco. Em seguida conduziram os ramos com as bases imersas em baldes de água. Sepa-

raram os estames contendo pólen das demais estruturas florais. O material permaneceu no interior do dessecador para secagem prévia à temperatura ambiente por uma hora, sendo em seguida acondicionado em tubos de ensaios tamponados com algodão e armazenado. Dessa forma, conservaram o pólen de *E. tereticornis*, *E. robusta* e *E. camaldulensis* por três meses sob temperaturas de 4°C e -10°C. Perceberam que de maneira geral o armazenamento influenciou negativamente na conservação do pólen, havendo uma tendência para queda drástica da germinação. Verificaram ser essa queda mais acentuada à temperatura de -10°C. Para o *E. resinifera* observaram 50,7% de germinação a 4°C e 30,08% a -10°C. É importante salientar que na maioria dos estudos feitos para outras espécies, tem-se verificado a maior eficiência do armazenamento a -10°C do que a 4°C. Pode ter ocorrido um pré-tratamento de secagem inadequado, o que conduziu ao congelamento intracelular da água contida no pólen levando ao rompimento da célula como já foi destacado anteriormente.

Uma nova forma de armazenamento do pólen é sugerida por GRIFFIN et alii (1982). No caso os autores separaram o pólen das estruturas estaminais por meio de água destilada através de um sistema duplo de filtração. O pólen foi então depositado sobre um filtro miliporo. Depois da secagem sobre sílica-gel esses filtros foram cortados em tiras e armazenados em frascos a -16°C. Todavia, enfatizam que deve-se tomar cuidado com a extração úmida devido ao pro

blema de eluição das proteínas da parede do pólen. Através desse método os autores armazenaram pólen de *E. regnans* às temperaturas de 5°C e -16°C e avaliaram aos 36 dias e 12 meses de armazenamento. Concluíram que a conservação à temperatura ambiente foi adequada para um período de 36 dias, mas uma alta viabilidade foi mantida por um ano a -16°C.

Ainda sobre o armazenamento e teste de viabilidade de *Eucalyptus* spp.; CAUVIN (1983) sugeriu a coleta dos botões florais próximo à deiscência. Ao completar a abertura dos mesmos em um balde contendo água, sugeriu cortar os estames com uma tesoura e em seguida incorporar sílica-gel juntamente com os estames dentro de um recipiente fechado, passando através de uma peneira metálica de 50 a 100 µm. Acrescenta ainda, que deve-se colocar o pólen em pequenas quantidades dentro de tubos de vidro de 5 a 10 cm³ e fechá-los hermeticamente sob vácuo parcial de 800 g/cm², em seguida armazenar a uma temperatura próxima a -10°C.

Apesar do armazenamento do pólen em solventes orgânicos ser um método atrativo e empregado com sucesso para determinadas espécies, não se dispõe de resultados positivos com respeito ao gênero *Eucalyptus*. SOUSA & GONÇALVES (1986) verificaram que o pólen de *E. camaldulensis* tratado com éter etílico e *E. urophylla* tratado com acetona visando ao armazenamento, não germinou devido a desidratação excessiva observada. Concluíram que estudos com diferentes graus

de diluição devem ser conduzidos para verificar se este tipo de armazenamento pode ser aplicado para o *Eucalyptus* spp.

2.4.2. Testes de viabilidade

A viabilidade de várias espécies de *Eucalyptus* foi determinada por BODEN (1958) através de testes de germinação "in vitro". O autor utilizou o meio de germinação contendo 20% de sacarose e 1,5% de gelatina com incubação por 6 horas a 30°C. Enfatizou que temperaturas entre 20°C e 30°C seriam mais adequadas. O pólen foi disperso sobre o meio diretamente da flor ou ainda com auxílio de um bastão ou escova. O autor fez a contagem baseada em 3 ou 4 campos, de forma que 50 ou mais grãos fossem discernidos como germinados ou não germinados. Devido ao fato desse pólen apresentar a tendência de agrupar-se formando agregados de vários tamanhos, de forma a dificultar a contagem, o autor avaliou apenas grãos isolados e pequenos grupos onde todos os grãos foram facilmente identificados. Observou também o incremento do tubo polínico ao longo do tempo até o momento em que a pressão osmótica do meio de germinação tornou-se muito alta, em decorrência da dessecação, de forma a impedir o posterior crescimento.

Para avaliar a germinação do pólen de *Eucalyptus* recém-colhido e armazenado GABRIELLI et alii (1965) empregaram gelatina a 1,5% e dependendo da espécie 30% ou 40%

de sacarose. Outra observação que merece destaque é a necessidade de reidratação do pólen em câmara úmida quando o mesmo sofre dessecação para o armazenamento. O período empregado pelos autores para reidratação foi de apenas 10 minutos em câmara úmida e de 20 horas para avaliação de grãos de pólen germinados e não germinados em diferentes campos ao acaso.

Empregando também testes de germinação "in vitro" para avaliar a viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp. BORGES et alii (1973) utilizaram várias concentrações de sacarose (entre 20% e 40%) e CAUVIN (1983) a concentração de 20% de sacarose e 0,5% de ágar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

3.1.1. Coleta

Ramos com botões florais apresentando o opérculo próximo à abscisão provenientes do terço inferior da copa de quatro árvores foram utilizados para a coleta do pólen. Segundo BODEN (1958) este estágio é o mais adequado para coleta dos botões florais.

Para os ensaios de determinação dos componentes do meio de cultura adequado à germinação e para os ensaios de extração do pólen com solventes orgânicos não foi pré-determinado o período do dia para a coleta dos ramos no campo. O período para a coleta e transporte de ramos visando a manutenção em casa de vegetação e posterior coleta do pólen foi das 14:00 às 16:00 horas. Este procedimento foi utilizado para os testes de secagem e armazenamento de pólen.

3.1.2. Condução do material à casa de vegetação

Os ramos com botões florais foram transportados com as extremidades imersas em recipientes contendo água. Em seguida o material foi conduzido à casa de vegetação e a exemplo de GRIFFIN et alii (1982) as flores com o opérculo já liberado no campo foram removidas para evitar a possibilidade de contaminação. Os ramos permaneceram em repouso até o estágio ideal (antese) por um período que variou entre 2 e 4 dias.

3.1.3. Extração do pólen

Na antese, as estruturas estaminais foram separadas das florais por intermédio de um estilete. Essas estruturas foram colhidas em tubos de ensaio e agitadas com água. Para a extração do pólen a seco foram utilizadas peneiras

3.1.4. Teste de germinação

3.1.4.1. Composição do meio de cultura

A germinação do pólen foi feita em meio de cultura de ágar e sacarose. Com exceção do ensaio para determinar a concentração ideal de sacarose, todos os

demais testes apresentaram o meio de cultura contendo 30% de sacarose e 0,8% de ágar.

3.1.4.2. Procedimento do teste de germinação

O meio de cultura foi espalhado sobre lâminas microscópicas (aproximadamente 4 ml por lâmina) e após a solidificação do mesmo o pólen foi uniformemente disperso na superfície. Em seguida, as lâminas foram colocadas dentro de caixas de germinação com papel de filtro umedecido sobre suportes (barras de vidro). As caixas com suas tampas foram mantidas num germinador com temperatura de 25°C e 99% de umidade relativa constantes por um determinado tempo. A avaliação quando feita em um período diferente de 24 horas foi devido ao fato de não ter-se determinado ainda esse período como padrão. Nas observações feitas pelo autor evidenciou-se que um período menor que este é precoce, por outro lado, períodos maiores podem dificultar as observações devido à contaminação por microorganismos e, especialmente fungos e bactérias. A ocorrência de infecção por fungos quando o pólen germina "in vitro" durante um período de tempo superior a 24 horas constituiu-se em um problema para a avaliação da viabilidade (COOK & STANLEY, 1960). Ao final do período de incubação aplicou-se safranina para tornar mais fácil a visualização e a contagem dos grãos de pólen.

3.1.4.3. Contagem dos grãos germinados e não germinados

Seguindo a metodologia de COOK & STANLEY (1960) que foi enfatizada por SPRAGUE (1977) o grão de pólen foi considerado germinado quando o comprimento do tubo polínico emitido ultrapassou a máxima extensão do mesmo. As observações foram feitas em microscópio óptico com aumento de 450 x. Há variação para os ensaios quanto ao número de grãos avaliados por repetição, até a definição de 300 grãos. Essa definição foi feita somente após os testes de secagem e armazenamento. STANLEY & LINSKENS (1974) afirmam que com duas lâminas de ágar por lote de pólen, 200 grãos devem avaliar satisfatoriamente a porcentagem de germinação para os limites normalmente encontrados. Não se avaliou o número de grãos de pólen de acordo com a porcentagem de germinação como sugerido por STANLEY & LINSKENS (1974) devido a dificuldade de previsão da faixa de germinação.

3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ADEQUADA DE SACAROSE PARA A COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA VISANDO A GERMINAÇÃO DO PÓLEN

O pólen de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake foi coletado em árvores do Banco Clonal do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, de material procedente de Rio Claro-SP. As concentrações de sacarose empregadas no

ensaio em função de um teste preliminar foram: testemunha 0%, 20%, 25%, 30% e 35%.

No ensaio preliminar analisou-se a viabilidade do pólen de *E. grandis* em função das seguintes doses de sacarose: 0%; 0,1%; 10%; 20%; 30% e 40%. Observou-se germinação superior à concentração de 30%. Em função deste resultado, procedeu-se a estudos mais detalhados com concentrações próximas a 30%, ou seja, 20%, 25%, 30% e 35%.

Fez-se a avaliação com 6 e 18 horas de incubação. Cada tratamento foi constituído de 4 repetições, que por sua vez apresentou 30 campos ao acaso com o objetivo de observar o número de grãos de pólen germinados e não germinados.

3.3. EFEITO DO BORO NA GERMINAÇÃO DO PÓLEN

Devido a constante ênfase por vários autores da necessidade desse elemento e a baixa porcentagem de germinação obtida em meio de cultura composto unicamente de sacarose, decidiu-se determinar as doses mais adequadas para a composição do meio de cultura.

3.3.1. *E. urophylla*

O pólen utilizado foi coletado em árvores do

Banco Clonal pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e procedentes de Rio Claro-SP.

Adicionou-se cinco diferentes concentrações ao meio: 2, 4, 6, 8 e 10 ppm de B^{+3} (H_3BO_3).

Cada tratamento foi constituído de 4 repetições que por sua vez somou 40 campos ao acaso para avaliação de grãos germinados e não germinados após os períodos de 12 e 18 horas de instalação do ensaio.

3.3.2. *E. tereticornis*

3.3.2.1. Emprego de doses baixas de boro

O pólen neste caso foi proveniente de árvores do Banco Clonal pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. Diferentes doses foram adicionadas ao meio de cultura: 3, 4, 5 e 6 ppm de B^{+3} (H_3BO_3). Para cada tratamento foram utilizadas 3 repetições cada uma composta de 30 campos ao acaso para a contagem de grãos germinados e não germinados. As avaliações foram feitas 12 e 18 horas após a instalação do ensaio.

3.3.2.2. Emprego de doses altas de boro

Devido a resposta não significativa em relação ao uso de B^{+3} anteriormente empregadas, foi determinado o uso de doses mais altas. As doses (mg/l) de H_3BO_3 : 100 (18

ppm de B), 150 (27 ppm de B) 200 (35 ppm de B), 250 (44 ppm de B), 300 (53 ppm de B) foram utilizadas nesse ensaio. VAN WYK (1981) cita em sua revisão que doses de 100 a 250 ppm de H_3BO_3 são mais adequadas à composição do meio de cultura para a germinação do pólen de *Eucalyptus* spp. Cada tratamento comportou 4 repetições que por sua vez foram constituídas de 30 campos ao acaso. Foram avaliados os grãos germinados e não germinados, nos períodos de 6 e 24 horas após a instalação do ensaio.

3.4. EFEITO DO CÁLCIO NA GERMINAÇÃO DO PÓLEN

3.4.1. *E. tereticornis*

Utilizou-se o pólen coletado em árvores do Banco Clonal pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. Ao meio de germinação do grão de pólen acrescentou-se o Ca^{2+} na forma de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (ppm) como segue: 110, 220, 330 e 440.

Cada tratamento foi constituído de 3 repetições com 30 campos ao acaso por repetição. O período de germinação do grão de pólen foi de 12 e 18 horas.

3.4.2. *E. urophylla*

Neste caso também o pólen é proveniente do

Banco Clonal do Departamento de Ciências Florestais da
ESALQ/USP, procedente de Rio Claro-SP.

Ao meio de cultura para a germinação empregou-se o Ca^{2+} na forma de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ppm) nas proporções: 110, 220, 330 e 440. Utilizou-se 3 repetições para cada tratamento, avaliando-se a porcentagem de germinação após um período de 12 e 36 horas. Tomou-se 60 campos ao acaso por repetição para avaliar a viabilidade.

3.5. EXTRAÇÃO E SUSPENSÃO DO PÓLEN EM ÁGUA

3.5.1. *E. tereticornis*

O pólen foi coletado no Banco Clonal do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. A avaliação da viabilidade do pólen foi feita para os tratamentos: a) pólen extraído com água e espalhado sobre o meio de germinação em suspensão aquosa; b) pólen extraído e espalhado à seco sobre o meio de cultura (com o auxílio da própria antera). As avaliações foram feitas para 4 repetições por tratamento com um total de 30 campos ao acaso por repetição nos períodos de 18 e 24 horas após a instalação do ensaio.

3.5.2. *E. urophylla*

Utilizou-se o pólen proveniente do Banco Clonal do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP e procedente de Rio Claro-SP. A avaliação da viabilidade foi determinada em função dos tratamentos: a) pólen extraído com água e espalhado sobre o meio germinativo em suspensão aquosa; b) pólen extraído e espalhado a seco sobre o meio germinativo. As avaliações foram feitas considerando-se 4 repetições por tratamento e um total de 30 campos ao acaso por repetição. O período de incubação foi de 18 e 24 horas.

3.6. EMPREGO DE DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS NA EXTRAÇÃO DO PÓLEN VISANDO AO ARMAZENAMENTO

3.6.1. Éter etílico e éter de petróleo

As estruturas estaminais de *E. camaldulensis* Dehn. provenientes da Estação Experimental de Anhembi, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, foram submetidas aos solventes éter etílico e éter de petróleo visando a extração do pólen. Após a evaporação dos mesmos avaliou-se a viabilidade do pólen através da germinação "in vitro". Cada tratamento apresentou 4 repetições, tendo sido contado o número total de grãos de 30 campos ao acaso por repetição. O período de incubação foi de 18 e 24 horas.

3.6.2. Acetona

As estruturas estaminais do *E. urophylla* pertencente ao Banco Clonal do Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, procedentes de Rio Claro-SP, foram submetidas à acetona para a extração do pólen. Em seguida, foi feito o teste de germinação onde utilizou-se 3 repetições por tratamento, com a contagem de 30 campos ao acaso por repetição. Empregou-se os períodos de 12 e 18 horas para a incubação.

3.7. EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM NA GERMINAÇÃO DO PÓLEN RECÉM-COLHIDO

3.7.1. Material empregado

3.7.1.1. *E. camaldulensis*

A espécie é originária da Austrália entre as coordenadas: latitude $16^{\circ}27'S$ a $17^{\circ}24'S$, longitude $144^{\circ}46'E$ a $145^{\circ}09'E$ e altitude de 380m a 680m e procedente da Estação Experimental de Anhembi-SP, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, tendo sido utilizada aos 6 anos de idade.

3.7.1.2. *E. grandis*

A espécie com origem em Coff's Harbour e procedente de Itapetininga-SP, foi utilizada aos 4 anos de idade.

3.7.1.3. *E. tereticornis*

A espécie originária da Austrália entre as coordenadas: latitude $15^{\circ}43'S$ a $18^{\circ}36'S$, longitude $144^{\circ}45'E$ a $145^{\circ}20'E$ e altitude de 150 m a 900 m e procedente da Estação Experimental de Anhembi-SP, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, foi utilizada aos 6 anos de idade.

3.7.1.4. *E. urophylla*

O material é procedente da Indonésia entre as coordenadas: latitude $8^{\circ}35'S$ a $8^{\circ}53'S$, longitude $125^{\circ}45'E$ a $125^{\circ}26'E$ e altitude de 420 m a 1500 m e foi coletado na Estação Experimental de Anhembi-SP, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, tendo sido utilizado aos 6 anos de idade.

3.7.2. Tratamentos de secagem

Empregou-se o pólen de quatro árvores por espécie visando amenizar o problema decorrente do emprego de apenas uma árvore. O pólen permaneceu dentro da própria an-

tera durante os tratamentos de secagem, considerando que a umidade de equilíbrio é atingida pelo mesmo com as demais estruturas estaminais. A separação do pólen é aconselhada por vários autores, dentre eles GABRIELLI et alii (1965). No entanto, o presente trabalho mostrou que a extração com água e especialmente com solventes orgânicos é problemática e deve ser melhor estudada.

A secagem das estruturas estaminais foi feita sob as condições: câmara seca (22°C constante), estufa (35°C constante), estufa (40°C constante), vácuo sob sílica-gel (temperatura ambiente). Acompanhou-se a perda de água através de pesagens efetuadas de hora em hora até a estabilização do peso. Em seguida, a viabilidade do pólen foi avaliada através do teste de germinação "in vitro".

3.7.3. Teste de viabilidade e crescimento do tubo polínico

Para avaliar a germinação "in vitro" foi utilizado o meio de cultura comum aos demais ensaios (30% de sacarose e 0,8% de ágar) sem a adição de nutrientes como B e Ca, devido aos resultados contraditórios obtidos, especialmente para o boro. Espalhou-se o pólen sobre o meio de cultura com o auxílio de uma peneira de forma a evitar o emprego de água para a suspensão do pólen. Um total de 4 repetições foram utilizadas para avaliar cada tratamento, a repeti

ção por sua vez consistiu da contagem de 300 grãos totais (germinados e não germinados) tomados ao acaso. O período de 24 horas foi considerado para a germinação.

O comprimento do tubo polínico foi avaliado através do método de câmara clara, tomando-se ao acaso 30 grãos germinados por repetição (10% do total de grãos avaliados). Este método consiste da projeção do tubo polínico sobre um anteparo, permitindo sua medição. Através da relação entre imagem projetada e de uma lâmina graduada foi possível determinar o tamanho do tubo. Para essa finalidade foi utilizado um microscópico óptico com aumento de 200 x.

3.8. VIABILIDADE DO PÓLEN RECÉM-COLHIDO E SUBMETIDO AOS TRATAMENTOS DE SECAGEM VISANDO AO ARMAZENAMENTO

3.8.1. Material empregado

3.8.1.1. *E. camaldulensis*

A espécie utilizada é originária da Austrália entre as coordenadas: latitude $16^{\circ}27'S$ a $17^{\circ}24'S$; longitude $144^{\circ}46'E$ a $145^{\circ}09'E$ e altitude de 380m a 680m e procedente da Estação Experimental de Anhembi-SP, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, tendo sido utilizada aos 6 anos de idade.

3.8.1.2. *E. grandis*

O material utilizado foi coletado nas dependências do Horto Florestal de Tupi e pertencente ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo, aos 15 anos de idade, sendo procedente do Horto Florestal de São Paulo-SP.

3.8.1.3. *E. tereticornis*

A espécie originária da Austrália entre as coordenadas: latitude $15^{\circ}43'S$ a $18^{\circ}36'S$; longitude $144^{\circ}45'E$ a $145^{\circ}20'E$ e altitude de 150 m a 900 m e procedente da Estação Experimental de Anhembi-SP, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, foi utilizada aos 6 anos de idade.

3.8.1.4. *E. urophylla*

A espécie é procedente da Indonésia entre as coordenadas: latitude $8^{\circ}35'S$ a $8^{\circ}53'S$; longitude $125^{\circ}54'E$ a $125^{\circ}26'E$ e altitude de 420 m a 1500 m e procedente da Estação Experimental de Anhembi-SP, Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, tendo sido utilizada aos 6 anos de idade.

3.8.2. Tratamentos de secagem

Em função da observação feita através dos vários métodos, elegeu-se a secagem em estufa ($35^{\circ}C$) e a vácuo

para as quatro espécies estudadas. O procedimento de secagem já foi descrito anteriormente. Procedeu-se a redução de umidade até que as estruturas estaminais atingissem a umidade observada no estudo prévio relativo a secagem. Em seguida, avaliou-se a viabilidade.

3.8.3. Avaliação da dimensão do estilete e seu respectivo estigma para algumas espécies estudadas

As espécies estudadas foram: *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. urophylla*. Uma incisão foi feita na extremidade do estilete junto a parte superior do ovário e com o auxílio de um paquímetro efetuou-se as medições de 30 estiletos com seus respectivos estigmas para cada espécie.

3.8.4. Armazenamento do pólen

O pólen juntamente com as estruturas estaminais, secas sob as condições: estufa (35°C constante) e vácuo (temperatura ambiente) foram armazenados em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C). O pólen foi acondicionado em frascos de vidros (18 ml) tapados com borracha e vedados com parafina e fita de vedação. Em seguida os frascos foram colocados dentro de dessecadores. Não se armazenou pólen à temperatura ambiente, já que trabalhos anteriores mostraram haver perda rápida da viabilidade sob essas condições (apro-

ximadamente 20°C). BODEN (1958) detectou a perda completa de viabilidade do pólen de *Eucalyptus* em um mês quando o mesmo foi armazenado à temperatura ambiente.

3.8.5. Avaliação da viabilidade

A viabilidade do pólen foi determinada para 4 repetições por tratamento com a contagem de 300 grãos ao acaso por repetição. O período de incubação foi de 24 horas.

3.9. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO PÓLEN ARMazenado

A avaliação foi feita por três meses consecutivos. É importante salientar que submeteu-se o pólen armazenado à reidratação através da exposição às condições normais de ambiente por aproximadamente 2 horas. O procedimento para o teste de germinação foi o mesmo aplicado na avaliação por ocasião do armazenamento. O comprimento de 30 tubos polínicos por repetição foi obtido pelo método da câmara clara.

com SOXAL & SCHUP (1981) e STEZL & TORRIS (1980) a hipótese de homogeneidade da variância foi rejeitada pelo teste de Bartlett.

STANLEY & LINSKENS (1974) aconselham o uso do teste "t". No entanto, para a validade do mesmo há necessi-

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados originais observados com relação à porcentagem de germinação encontram-se no apêndice.

Para os testes nos quais procedeu-se a avaliação de viabilidade em dois períodos, os resultados apresentados são do período mais próximo à 24 horas, uma vez que períodos inferiores à 18 horas são precoces e superiores problemáticos devido à infecção por microorganismos, especialmente por fungos.

Concentração de sacarose: 0 20 25 30 35

4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ADEQUADA DE SACAROSE

PARA A COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA VISANDO A GERMINAÇÃO DO PÓLEN

0	0,11ns	1,33ns	2,22ns
20	-	1,07ns	1,37ns
25	-	-	0,01ns
30	-	-	-

E. urophylla

Obs.: Incubação por 18 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Na Tabela 5 estão os resultados das análises estatísticas para a germinação do pólen. O χ^2 foi empregado para a análise. No caso da avaliação de grãos germinados e não germinados, foi obtida uma resposta binomial, além disso e de acordo

com SOKAL & ROHLF (1981) e STEEL & TORRIE (1980) a hipótese da homogeneidade da variância foi rejeitada pelo teste de Bartlett.

STANLEY & LINSKENS (1974) aconselham o uso do teste "t". No entanto, para a validade do mesmo há necessidade de se fazer uma amostragem de acordo com a porcentagem de germinação e desvio padrão da média, como foi enfatizado na revisão de literatura. Porém, devido aos problemas existentes com o manejo e germinação do pólen nunca se conhece previamente a taxa de germinação, tornando impossível uma amostragem adequada e conseqüentemente o emprego deste tipo de teste.

Tabela 5. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen (*E. urophylla*) sob diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de sacarose (% média)	0	20	25	30	35
	(0,81)	(4,89)	(5,19)	(8,08)	(7,28)
0	-	10,07**	11,93**	18,75**	19,75**
20	-	-	0,11ns	1,83ns	2,22ns
25	-	-	-	1,07ns	1,37ns
30	-	-	-	-	0,01ns

Obs.: Incubação por 18 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

ns = não significativo

De acordo com a Tabela 5, ao nível de 1% não se detectou diferença estatística entre os tratamentos. To-

davia, a sacarose na concentração de 30% propiciou a maior porcentagem média de germinação (8,08%), seguida das concentrações próximas que são: 25% e 35% com médias de germinação respectivas de: 5,19% e 7,28%. A testemunha, que constituiu-se do meio de cultura na ausência de sacarose apresentou germinação (0,81%) inferior estatisticamente aos demais tratamentos.

BODEN (1958) detectou que soluções de 20% de sacarose são adequadas à germinação do pólen para as espécies de *Eucalyptus* estudadas. Já GABRIELLI et alii (1965) verificaram que as melhores concentrações de sacarose variaram de 30% e 40% para as diversas espécies de *Eucalyptus* estudadas, dentre elas o *E. grandis*.

Verifica-se uma baixa porcentagem de germinação mesmo na concentração ideal de sacarose. Segundo SPRAGUE (1977) essa porcentagem de germinação é tida como pobre. Atribuiu-se esse fato à necessidade da incorporação de outros elementos ao meio de cultura.

Empregou-se apenas a sacarose para a germinação do pólen, embora STANLEY & LINSKENS (1974) afirmem que o emprego de carboidratos como a lactose animal, permite ao pólen metabolizar mais rapidamente, facilitando o crescimento do tubo polínico. BODEN (1958) indicou a sacarose em diferentes concentrações como o carboidrato mais adequado, embora a germinação foi obtida com o emprego de glicose, frutose, galactose. O autor notou que a germinação a 10% de glicose foi aproximadamente igual àquela a 20% de sacarose, uma vez que a pressão osmótica dessas soluções é a mesma.

4.2. EFEITO DO BORO NA GERMINAÇÃO DO PÓLEN

4.2.1. *E. urophylla*

A análise dos dados pelo χ^2 mostrou o efeito de tratamentos, obtendo-se o valor 242,89 significativo ao nível de 1%. Analisando mais detalhadamente ao nível de tratamentos tem-se a Tabela 6.

Tabela 6. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de *E. urophylla* sob diferentes doses de boro.

Concentração de boro (ppm) (média)	0 (6,22)	2 (2,06)	4 (2,74)	6 (2,53)	8 (2,42)	10 (1,36)
0	-	92,11**	57,89**	75,82**	66,72**	167,17**
2	-	-	3,96*	2,16ns	1,14ns	6,87**
4	-	-	-	0,36ns	0,75ns	22,35**
6	-	-	-	-	0,10ns	18,17**
8	-	-	-	-	-	13,63**

Obs.: Incubação por 18 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

Segundo a Tabela 6, ao nível de 1% detecta-se o efeito negativo sobre a germinação do pólen em decorrência do acréscimo de doses crescentes de boro. A testemunha com uma média de germinação de 6,22% apresentou-se superior aos demais tratamentos. Provavelmente a fonte de pólen apre-

sentava o nível adequado desse elemento e a adição do boro tenha produzido efeito tóxico. Dentre os tratamentos com doses crescentes de boro destacou-se com menor germinação aquele contendo 10 ppm de boro (1,3% de viabilidade).

4.2.2. *E. tereticornis*

4.2.2.1. Emprego de baixas doses de boro

A análise dos dados através do χ^2 evidenciou o valor de 2431,05, sendo significativo ao nível de 1%. Análises mais detalhadas com respeito aos tratamentos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de *E. tereticornis* sob diferentes doses de boro.

Dose de boro (ppm) (média)	0	3	4	5	6
	(29,64)	(31,00)	(30,62)	(27,20)	(27,70)
0	-	0,93ns	0,43ns	3,06ns	1,77ns
3	-	-	0,05ns	6,02*	4,20*
4	-	-	-	4,46*	3,03ns
5	-	-	-	-	0,10ns

Obs.: Incubação por 18 horas

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

Verificou-se portanto, que não houve resposta à adição de boro ao meio de cultura ao nível de 1%. Essa não resposta po

pode ser explicada pela ocorrência de um dos dois fatores: a) as doses empregadas não foram neste caso suficientemente altas para provocar um estímulo à germinação; b) o pólen utilizado possuía o nível de boro adequado de forma a permitir a emissão do tubo polínico.

4.2.2.2. Emprego de doses altas de boro

A análise dos dados através do χ^2 revelou o valor 1046,88, significativo ao nível de 1%. As análises mais detalhadas referentes aos tratamentos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de *E. tereticornis* submetido a diferentes doses de boro.

Dose de H_3BO_3 (ppm) (média)	0	100	150	200	250	300
	(30,75)	(8,25)	(4,48)	(6,84)	(6,78)	(2,11)
0	-	246,51**	304,22**	314,83**	326,84**	693,10**
100	-	-	14,25*	4,38*	1,77ns	81,32**
150	-	-	-	3,62ns	7,42**	17,11**
200	-	-	-	-	0,74ns	45,29**
250	-	-	-	-	-	61,77**

Obs.: Incubação por 12 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

Como se percebe pela Tabela 8 ao nível de 5% a testemunha apresentou germinação muito superior aos tratamentos nos quais foi adicionado boro. A média observada para a testemunha foi de 30,75%.

Verificou-se também que a germinação para os tratamentos com doses adicionais de boro esteve entre 8,25% (100 ppm de H_3BO_3), e 2,11% (300 ppm de H_3BO_3). Tornou-se evidente, portanto, que o acréscimo de boro concorreu para o decréscimo da germinação "in vitro". Provavelmente tenha provocado um efeito tóxico devido a não necessidade de boro adicional, como foi discutido em testes anteriores.

Analisando-se os resultados com respeito à necessidade de boro para as duas espécies observadas (*E. urophylla* e *E. tereticornis*), ficou evidente a dificuldade de se estabelecer o nível adequado para a composição do meio de germinação dos grãos de pólen. A necessidade ou não do acréscimo desse elemento dependerá, portanto, do estado nutricional da matriz e conseqüentemente do próprio nível de boro existente no pólen.

Visser citado por STANLEY & LINSKENS (1974) afirmam que o nível de boro existente no pólen é influenciado pela quantidade de boro disponível à planta durante o desenvolvimento. Ainda os mesmos autores salientam que o nível de boro normalmente varia dentro de um gênero e mesmo dentro de uma espécie. Conseqüentemente a determinação da dose adequada para um determinado pólen torna-se difícil. O pro-

cedimento de análises químicas dos componentes do pólen e do estigma poderiam auxiliar na determinação da necessidade de doses adicionais ao meio de germinação desse elemento.

4.3. EFEITO DO CÁLCIO NA GERMINAÇÃO

4.3.1. *E. tereticornis*

A análise dos dados através do χ^2 revelou o valor 280,66 significativo ao nível de 1%. As análises mais detalhadas relativas aos tratamentos encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação do pólen(%) do *E. tereticornis* submetido a diferentes doses de cálcio.

Dose de (ppm) (média)	0	110	220	330	440
	(7,98)	(12,15)	(20,15)	(6,87)	(8,35)
0	-	15,97**	129,46**	1,86ns	0,20ns
110	-	-	38,92**	28,68**	14,56**
220	-	-	-	170,12**	142,67**
330	-	-	-	-	3,60ns

Obs.: Incubação por 18 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

ns = não significativo

Analisando-se a Tabela 9 ao nível de 1% evidencia-se uma maior porcentagem de germinação para o tratamento 220 ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (20,15%). Em seguida o destaque

ficou para 110 ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com 12,15%. A testemunha apresentou uma germinação tão baixa estatisticamente quanto aos demais tratamentos com uma média de 7,98%.

4.3.2. *E. urophylla*

Através da análise dos dados pelo χ^2 obteve-se o valor 40,96, significativo ao nível de 1%. Resultados mais detalhados relativos aos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação (%) do pólen de *E. urophylla* submetido a diferentes doses de cálcio.

Dose de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ppm) (média)	0 (11,92)	110 (16,38)	220 (18,08)	330 (14,56)	440 (18,43)
0	-	19,15**	27,23**	7,33**	28,76**
110	-	-	1,76ns	4,38*	3,11ns
220	-	-	-	10,47*	0,28ns
330	-	-	-	-	12,24**

Obs.: Incubação por 36 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

De acordo com a Tabela 10 ao nível de 5% destacaram os tratamentos 440, 220 e 110 ppm $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com as maiores médias, respectivamente: 18,43%; 18,08% e 16,38%. Novamente a testemunha exibiu a menor germinação com 11,92%.

Notou-se também neste ensaio, que o período de incubação de 36 horas não é adequado, observando-se médias de germinação inferiores para esta avaliação em relação a 12 horas devido a dificuldade de avaliação devido a contaminação por microorganismos.

Com respeito ao emprego de Ca verificou-se que a dose 220 ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ propiciou melhor germinação para as espécies observadas: *E. tereticornis* e *E. urophylla*.

4.4. EXTRAÇÃO E SUSPENSÃO DO PÓLEN EM ÁGUA

Na Tabela 11 tem-se a porcentagem média de germinação para as espécies *E. tereticornis* e *E. urophylla*.

Tabela 11. Porcentagem média de germinação para o pólen de *E. tereticornis* e *E. urophylla* extraído em água e a seco.

Tratamento	Espécie	
	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>
Pólen extraído em água	36,63	0,53
Pólen extraído a seco	86,23	2,30

Obs.: Incubação por 24 horas.

A análise dos dados por intermédio do teste de χ^2 evidenciou os valores: para *E. tereticornis* 1358,09 e para *E. urophylla* 30,84, sendo significativos ao nível de 1%.

Verificou-se, portanto, que para ambas as espécies observadas a extração do pólen em água prejudicou a sua capacidade germinativa. Esse fato pode ser explicado pela eluição das proteínas, como foi observado por Stanley & Search, citados por GRIFFIN et alii (1982). Neste caso, o processo tornou-se prolongado por desconhecer-se os possíveis efeitos depreciativos. Deve-se evitar este tipo de extração a menos que o processo seja rápido o suficiente para não afetar a capacidade germinativa. GRIFFIN et alii (1982) apesar de não te-

rem observado redução na germinação do pólen de *E. regnans* aconselham minimizar o tempo durante o qual o mesmo permanece em suspensão.

Outra possível hipótese seria a formação de um ambiente anaeróbico inadequado à germinação do pólen como consequência de aplicação sobre o meio germinativo em suspensão. A água componente da suspensão pode ter dificultado o contato mais estrito do pólen com o meio germinativo.

4.5. EMPREGO DE DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS NA EXTRAÇÃO DO PÓLEN VISANDO AO ARMAZENAMENTO

4.5.1. Éter etílico e éter de petróleo

4.5.2. Acetona

Na Tabela 12 tem-se a análise dos dados através do teste χ^2 .

Tabela 13. Germinação do pólen (%) para o *E. regnans* extraído com acetona e valor de χ^2 para comparação de 18 dias de tratamentos.

Tratamento	Valor de
Testemunha (Extração em água)	χ^2
3,70	103,95**
Acetona	0,28

Obs.: Incubação por 18 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Tabela 12. Valores de χ^2 para comparação de médias (%) de germinação do pólen de *E. camaldulensis* extraído com diferentes solventes orgânicos.

Tratamento (média)	Testemunha (12,89)	Éter etílico (0,24)	Éter de petróleo (0,41)
Testemunha	-	222,98**	182,74**
Éter etílico	-	-	0,81ns

Obs.: Incubação por 24 horas.

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

ns = não significativo

Analisando a Tabela 12 ao nível de 1% detecta-se a superioridade da testemunha sobre os tratamentos de extração do pólen com solventes (média 12,89%). Não houve diferença significativa entre os solventes.

4.5.2. Acetona

Na Tabela 13 tem-se a germinação média observada e o valor de χ^2 obtido.

Tabela 13. Germinação do pólen (%) para o *E. urophylla* extraído com acetona e valor de χ^2 para comparação de médias de tratamentos.

Tratamento	Valor de
Testemunha (Extração em água)	χ^2
7,70	102,35**
Acetona	
0,28	

Obs.: Incubação por 18 horas

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Ficou evidente o efeito negativo da acetona sobre a germinação do pólen.

A redução do poder germinativo em decorrência do emprego de solventes orgânicos (acetona, éter etílico e éter de petróleo) pode ser devido a desidratação excessiva detectada, pois os grãos de pólen apresentavam aspecto de murchamento. Deve-se observar a resposta a outros tipos de solventes, ou proceder a diluição dos solventes já empregados.

4.6. EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM NA GERMINAÇÃO DO PÓLEN RECÉM-COLHIDO

4.6.1. Redução de umidade

Através do acompanhamento da perda de água sofrida pelo pólen e demais estruturas estaminais por intermédio de pesagens, verificou-se a velocidade de redução de umidade para cada tratamento. Nas Figuras 1, 2, 3 e 4, estão ilustrados os resultados obtidos para as diferentes espécies de *Eucalyptus* estudadas.

Eucalyptus camaldulensis

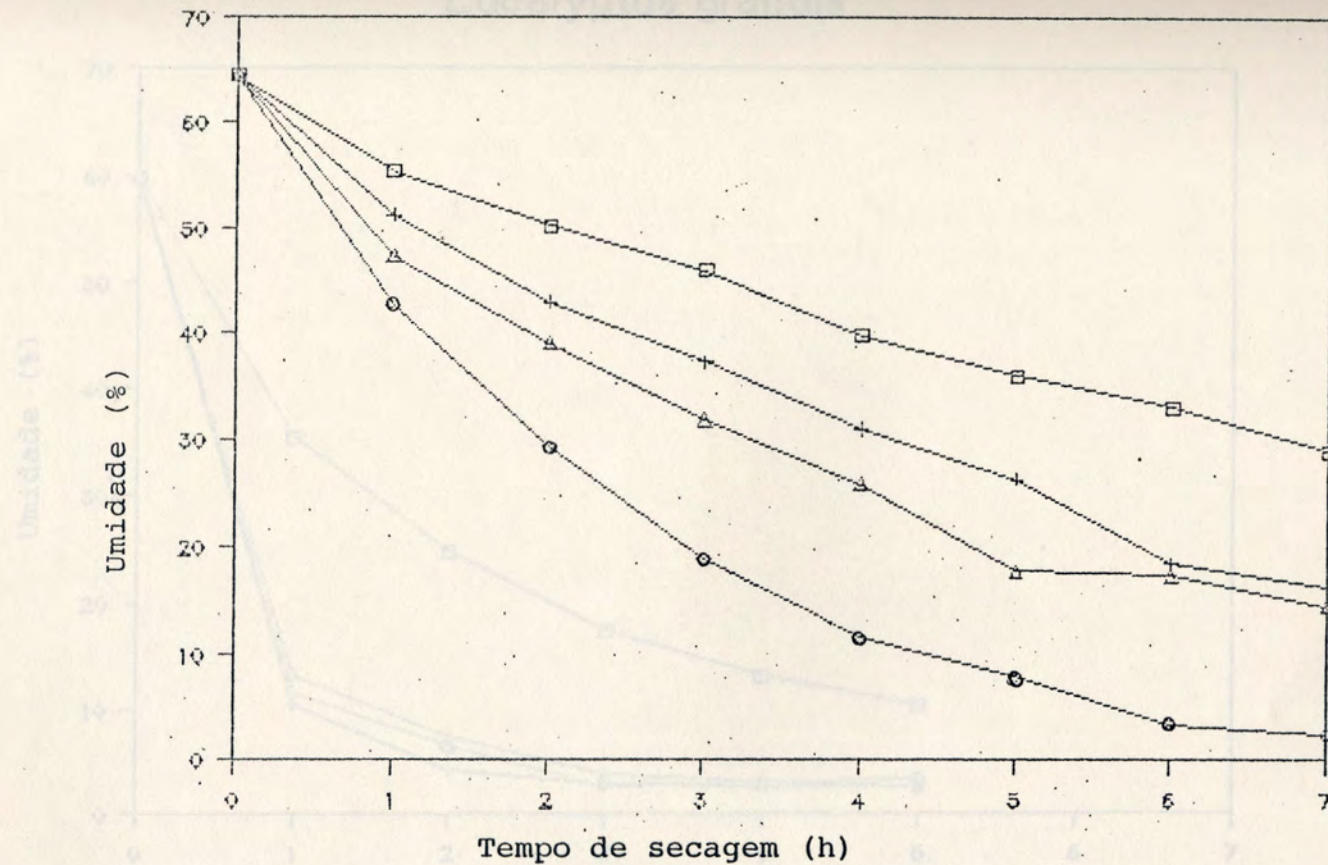


Figura 1. Velocidade da perda de água para o pólen de *E. camaldulensis* sob diferentes tratamentos de secagem.

- - câmara seca (22°C constante)
- + - estufa (35°C constante)
- Δ - vácuo sob sílica-gel (temperatura ambiente)
- - estufa (40°C constante)

Eucalyptus grandis

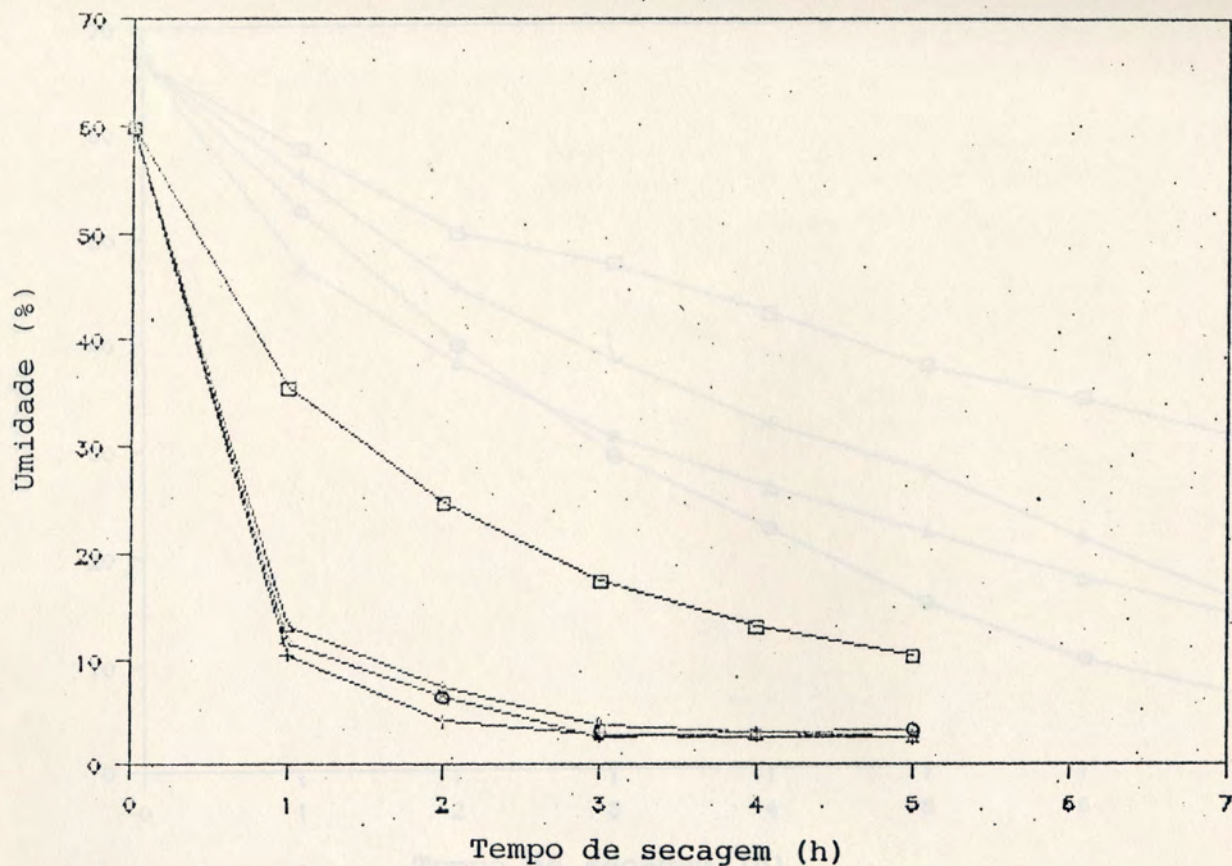


Figura 2. Velocidade da perda de água para o pólen de *E. grandis* sob diferentes tratamentos de secagem.

- - câmara seca (22°C constante)
- + - estufa (35°C constante)
- Δ - vácuo sob sílica-gel (temperatura ambiente)
- - estufa (40°C constante)

Eucalyptus tereticornis

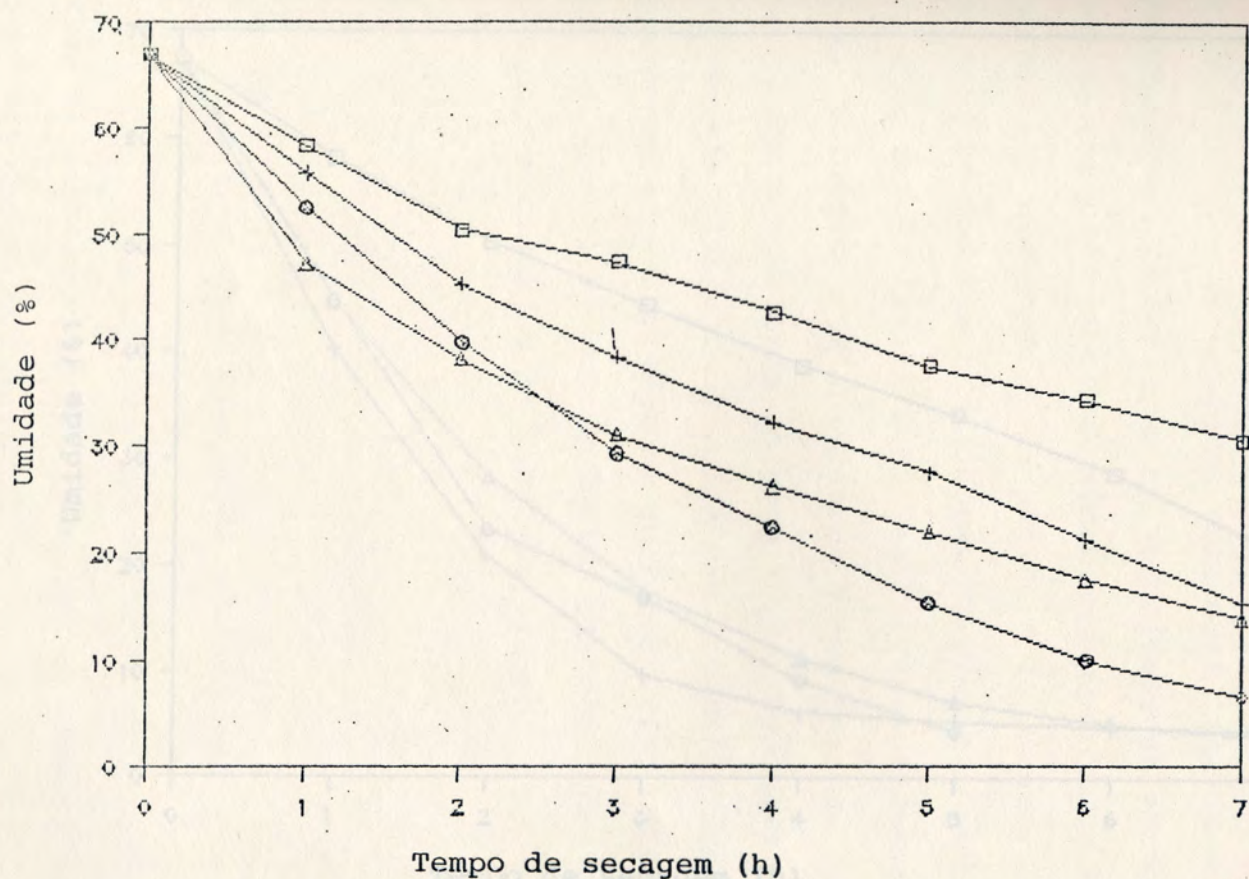


Figura 3. Velocidade da perda de água para o pólen de *E. tereticornis* sob diferentes tratamentos de secagem.

- - câmara seca (22°C constante)
- + - estufa (35°C constante)
- Δ - vácuo sob sílica-gel (temperatura ambiente)
- - estufa (40°C constante)

Eucalyptus urophylla

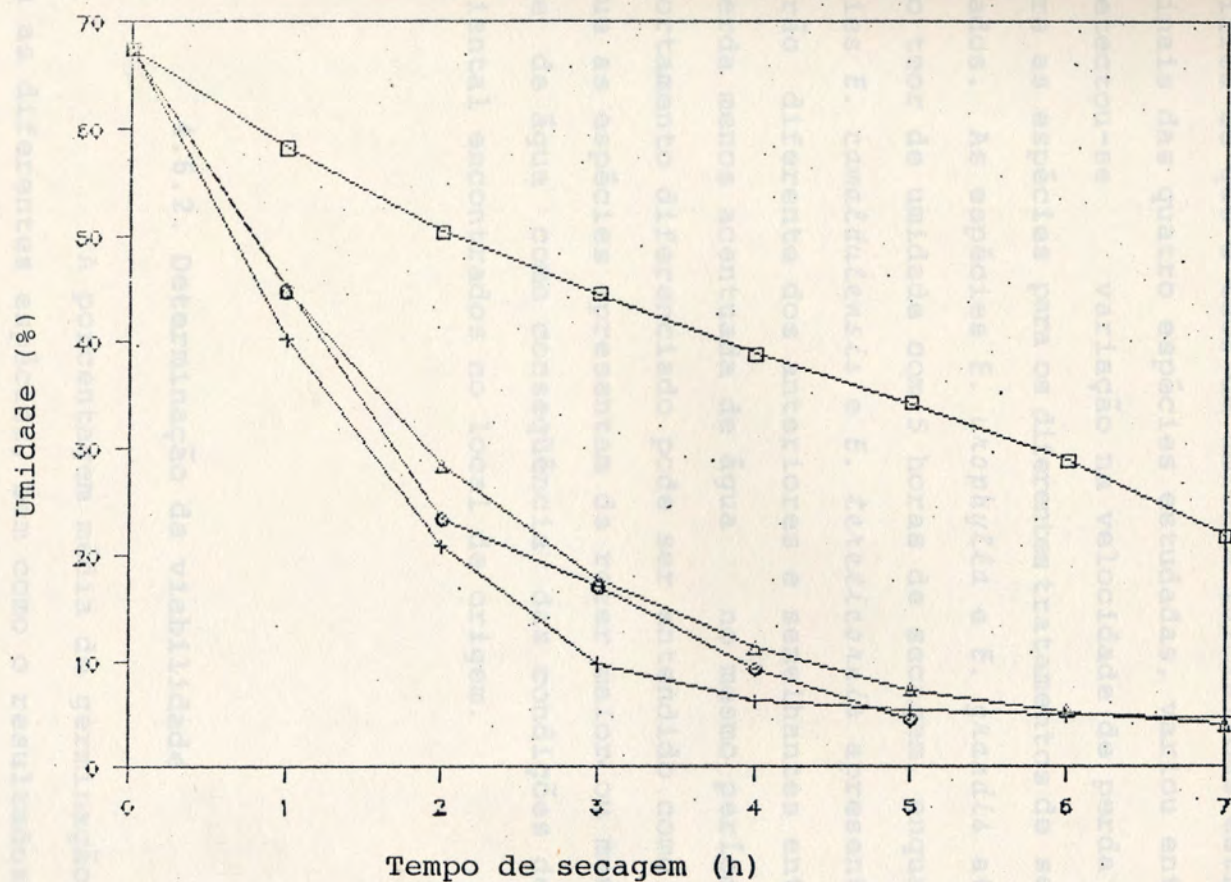


Figura 4. Velocidade da perda de água para o pólen de *E. urophylla* sob diferentes tratamentos.

- - câmara seca (22°C constante)
- + - estufa (35°C constante)
- Δ - vácuo sob sílica-gel (temperatura ambiente)
- - estufa (40°C constante)

De acordo com as Figuras 1, 2, 3 e 4, verifica-se que o teor de umidade inicial das estruturas estaminais das quatro espécies estudadas, variou entre 60% e 70%. Detectou-se variação na velocidade de perda de água entre as espécies para os diferentes tratamentos de secagem utilizados. As espécies *E. urophylla* e *E. grandis* atingiram baixo teor de umidade com 5 horas de secagem, enquanto as espécies *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* apresentaram um padrão diferente dos anteriores e semelhantes entre si, com perda menos acentuada de água no mesmo período. Esse comportamento diferenciado pode ser entendido como um mecanismo que as espécies apresentam de reter maior ou menor quantidade de água como consequência das condições de estresse ambiental encontrados no local de origem.

4.6.2. Determinação da viabilidade

A porcentagem média de germinação do pólen para as diferentes espécies, bem como o resultados da análise do χ^2 são dados na Tabela 14.

Tabela 14. Germinação do pólen (%) das espécies de *Eucalyptus* sob diferentes procedimentos de redução de umidade e valores de χ^2 para comparação de médias dos tratamentos.

Tratamento de secagem	E S P É C I E			
	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>
Câmara seca (22 ^o C)	20,83	15,25	19,75	9,67
Estufa (35 ^o C)	24,00	17,50	26,91	8,41
Estufa (40 ^o C)	12,08	25,75	25,42	3,67
Vácuo (temperatura ambiente)	25,92	9,50	28,83	8,00
Testemunha (umidade inicial)	20,68	20,17	25,72	7,65
Valor de χ^2 entre tratamentos	28,46**	39,79**	11,29*	11,37*

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

Verifica-se, portanto, diferença significativa ao nível de 5% entre tratamentos para todas as espécies.

Estão expressos na Tabela 15 os valores de χ^2 obtidos para as espécies em função dos tratamentos.

Analisando-se as Tabelas 14 e 15 para o *E. camaldulensis*, verifica-se que apenas o tratamento de secagem em estufa (40°C) afetou visivelmente a viabilidade do pólen quando comparado aos demais tratamentos, ao nível de 5%.

Com respeito ao *E. grandis*, evidenciou-se que o tratamento de secagem a vácuo sob sílica-gel propiciou menor germinação em relação aos demais tratamentos ao nível de 5%. A maior porcentagem de germinação foi observada para o pólen seco em estufa (40°C).

Já o pólen de *E. tereticornis* processado em câmara seca (22°C) e também em estufa (40°C) apresentou menor germinação em relação aos demais tratamentos de secagem ao nível de 5%. O pólen seco a vácuo sob sílica-gel exibiu a maior porcentagem de germinação.

O resultado relativo ao *E. urophylla* evidencia que a secagem em estufa (40°C) mostrou-se mais uma vez prejudicial à germinação do pólen.

Tabela 15. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação (%) do pólen das espécies de *Eucalyptus* submetido aos diversos tratamentos de secagem.

Tratamento de secagem		Câmara seca	Estufa	Estufa	Vácuo	Testemunha
		(22°C)	(35°C)	(40°C)		
Trat. de secagem/ Espécie						
Câmara seca (22°C)	<i>E. camaldulensis</i>	-	1,41ns	11,18**	3,08ns	0,031ns
	<i>E. grandis</i>	-	0,74ns	13,53**	6,10*	3,43ns
	<i>E. tereticornis</i>	-	6,31*	3,81ns	9,35**	7,54**
	<i>E. wrophylla</i>	-	0,39ns	10,69**	0,39ns	0,24ns
Estufa (35°C)	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	20,22**	0,33ns	1,85ns
	<i>E. grandis</i>	-	-	8,03**	10,96**	0,99ns
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	0,32ns	0,31ns	0,06ns
	<i>E. wrophylla</i>	-	-	7,18**	0,00ns	0,02ns
Estufa (40°C)	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	25,47**	10,07**
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	36,38**	3,42ns
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	1,24ns	0,64ns
	<i>E. wrophylla</i>	-	-	-	7,18**	7,85**
Vácuo	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	-	3,72ns
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	18,25**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	0,10ns
	<i>E. wrophylla</i>	-	-	-	-	0,02ns

Obs.: Testemunha = sem secagem

** = significativo ao nível

* = significativo ao nível

ns = não significativo

$\alpha = 0,01$

$\alpha = 0,05$

Analisando-se, portanto, o efeito dos tratamentos de secagem sobre a germinação do pólen das diferentes espécies notou-se que a secagem em estufa (40°C) propiciou as menores médias de germinação para as duas espécies: *E. camaldulensis* (12,08%) e *E. urophylla* (3,67%); a secagem a vácuo sob sílica-gel propiciou a média de germinação mais elevada para o *E. camaldulensis* (25,92%) e a pior germinação para o *E. grandis* (9,50%).

Verificou-se também que o tratamento secagem em câmara seca (22°C) mostrou a maior média para o *E. urophylla* (9,67%) e a menor média para o *E. tereticornis* (19,75%).

Na Tabela 16, tem-se o resultado do χ^2 referente a comparação entre médias das espécies.

Tabela 16. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação (%) do pólen entre as diferentes espécies.

Espécie (média)	<i>E. camaldulensis</i> (20,58)	<i>E. grandis</i> (17,63)	<i>E. tereticornis</i> (25,72)	<i>E. urophylla</i> (7,63)
<i>E. camaldulensis</i>	-	0,81ns	2,81ns	25,76**
<i>E. grandis</i>	-	-	7,52**	17,98**
<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	46,47**

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

ns = não significativo

Como se observa na Tabela 16 ao nível de 5%, o *E. tereticornis* e *E. camaldulensis* apresentaram a maior porcentagem de germinação, 25,72% e 20,58%, respectivamente. A menor porcentagem foi detectada para o *E. urophylla* com um valor médio de 7,63%. O *E. grandis* comportou-se de forma intermediária com 17,63% de germinação.

4.6.3. Crescimento do tubo polínico

Tem-se na Tabela 17, o comprimento médio (μm) do tubo polínico para as diversas espécies em função dos tratamentos de redução de umidade. Analisando os dados não se verificou homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett de acordo com SOKAL & ROHLF (1981) e STEEL & TORRIE (1980). Além disso, observou-se uma tendência do desvio padrão ser proporcional à média e neste caso STEEL & TORRIE (1980) aconselham a transformação logarítmica. A análise portanto, foi feita com dados transformados em $\log x$.

Verifica-se que o *E. urophylla* apresentou um comprimento médio inferior às demais espécies, com 178,16 μm . O *E. grandis* apresentou média de 219,36 μm . O *E. tereticornis* 235,58 μm . Não se detectou o efeito dos tratamentos de secagem sobre o comprimento do tubo polínico.

Tabela 17. Comprimento médio do tubo polínico (μm) em função das diferentes espécies e tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey.

Tratamento de secagem	ESPÉCIE				Média (grupamento do teste de Tukey)
	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tetricornis</i>	<i>E. urophylla</i>	
Testemunha (unidade inicial)	287,51	207,13	198,45	248,18	5,437 a
Câmara seca (22°C)	229,60	233,10	203,32	180,32	5,337 a
Estufa (35°C)	195,52	249,47	208,33	170,97	5,309 a
Estufa (40°C)	218,83	219,04	193,10	158,89	5,264 a
Vácuo (temperatura ambiente)	246,43	188,08	203,47	132,43	5,270 a
Média (grupamento do teste de Tukey)	5,446 a	5,373 a	5,325 a	5,149 b	

Resultados de ANAVA	F tratamento	F espécie	F tratamento x espécie	CV(%)
	2,33 ns	0,61 ns	3,04**	3,43

Sendo: ** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

ns = não significativo

CV (%) = coeficiente de variação experimental.

Obs.: Os dados de médias para as espécies e tratamentos, bem como as análises pelo teste F e de Tukey referem-se a dados transformados em log x.

4.7. VIABILIDADE DO PÓLEN RECÉM-COLHIDO E SUBMETIDO AOS TRATAMENTOS DE SECAGEM VISANDO AO ARMAZENAMENTO

4.7.1. Determinação da viabilidade

Os dados referentes à porcentagem de germinação do pólen para as diferentes espécies, são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Germinação média (%) do pólen recém-colhido e submetido à secagem prévia e valores de χ^2 para comparação entre médias de tratamentos das diferentes espécies.

Tratamento de secagem	ESPÉCIE			
	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>
Testemunha	36,58	10,58	7,92	31,25
Estufa (35°C)	39,50	7,67	26,67	32,08
Vácuo	44,33	10,83	32,17	30,67
Valor de χ^2 entre tratamentos	5,08ns	3,02ns	73,62**	0,21ns

ns = não significativo

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Na Tabela 19, tem-se os valores de χ^2 obtidos para as espécies em função dos diferentes tratamentos e na Tabela 20, os valores de χ^2 em função das diferentes espécies.

Tabela 19. Valores de χ^2 entre tratamentos de secagem para a germinação do pólen das diferentes espécies de *Eucalyptus*.

Trat. de secagem/espécie		Trat. de secagem			
		Estufa (35°C)	Vácuo	Testemunha	
Estufa (35°C)	<i>E. camaldulensis</i>	-	1,85ns	0,76ns	
	<i>E. grandis</i>	-	2,55ns	2,20ns	
	<i>E. tereticornis</i>	-	2,66ns	48,98**	
	<i>E. urophylla</i>	-	0,21ns	0,052ns	
Vácuo	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	4,98*	
	<i>E. grandis</i>	-	-	0,013ns	
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	72,00**	
	<i>E. urophylla</i>	-	-	0,053ns	

Obs.: testemunha = sem secagem

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

Tabela 20. Valores de χ^2 para comparação de médias de germinação do pólen (%) referentes às diferentes espécies.

Espécie (média)	<i>E. camaldulensis</i> (40,14)	<i>E. grandis</i> (9,69)	<i>E. tereticornis</i> (22,25)	<i>E. wrophylla</i> (31,33)
<i>E. camaldulensis</i>	-	99,23**	30,16**	7,05**
<i>E. grandis</i>	-	-	23,25**	56,73**
<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	8,27**

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Analisando-se as Tabelas 18 e 19 com respeito às espécies envolvidas, verifica-se:

- Para o *E. camaldulensis* não se detectou o efeito negativo dos dois tratamentos de secagem empregados sobre a germinação do pólen. Surpreendentemente notou-se uma maior porcentagem de germinação do pólen seco a vácuo sob sílica-gel em relação à testemunha (umidade inicial).
- Não se detectou diferença estatística significativa ao nível de 5% entre os tratamentos de secagem e também entre esses e a testemunha para o *E. grandis*.
- Com relação ao *E. tereticornis* não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% para os dois tratamentos de redução de umidade. Todavia, a testemunha exibiu uma germinação inicial inferior ao pólen que sofreu qualquer tipo de secagem.

- d) Não houve diferença estatística significativa ao nível de 5% entre os tratamentos.

Analisando-se os dados da Tabela 20, detecta-se diferenças significativas ao nível de 1% entre todas as espécies. Mais uma vez o *E. camaldulensis* se destacou com a maior porcentagem de germinação, isto é: 40,14%. O *E. grandis* exibiu a menor porcentagem, ou seja, 9,69%. Já o *E. urophylla* e *E. tereticornis* apresentaram germinação intermediária: 31,33% e 22,25%, respectivamente.

É importante salientar que no teste preliminar visando detectar o efeito de diferentes métodos de secagem sobre a germinação do pólen a testemunha (pólen com umidade inicial) nunca apresentou germinação inferior ao pólen seco por qualquer processo.

No caso específico do teste por ocasião do armazenamento, devido a aderência do pólen às paredes da antera em decorrência do alto conteúdo de umidade, aliado à pequena quantidade de estruturas disponíveis para o teste inicial, empregou-se uma rápida extração com água.

Pelos motivos expostos nos testes preliminares verificamos então uma queda no poder germinativo para a testemunha em relação ao pólen seco através de qualquer um dos métodos de secagem.

Esse fato evidencia mais uma vez a necessidade de coletar-se quantidades adequadas de estruturas para proceder-se a extração à seco. Qualquer método de redução da umidade facilita a liberação do pólen. Portanto, a quantidade de estruturas estaminais com umidade relativamente alta deve ser tal que propicie um teste adequado de viabilidade.

4.7.2. Crescimento do tubo polínico

Tem-se na Tabela 21 o comprimento médio (μm) do tubo polínico para as diversas espécies em função dos tratamentos de redução de umidade.

Neste caso, o *E. camaldulensis* apresentou o comprimento médio do tubo polínico superior às demais espécies (314,56 μm) a exemplo do outro experimento envolvendo secagem do pólen. Todavia, observou-se as menores médias para o *E. grandis* e *E. tereticornis* com valores de 171,98 μm e 176,75 μm , respectivamente, enquanto que no outro caso a menor média foi apresentada pelo *E. urophylla*.

Existem fatores que podem ter influenciado nessa mudança de comportamento como: época de coleta, posição de coleta, estado nutricional da planta doadora de pólen. Acresce-se a isso, o fato de não se conhecer com precisão as necessidades qualitativas e quantitativas de elementos adicionais ao meio de incubação para permitir uma germinação e alongação do tubo polínico ótimos.

Tabela 21. Comprimento médio do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes e de Tukey.

Tratamento de secagem	E S P É C I E				Média (grupoamento do teste de Tukey)
	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>	
Estufa (35°C)	321,25	162,16	192,17	219,79	5,379 a
Testemunha	297,55	189,01	134,30	240,70	5,365 a
Vácuo	324,89	164,78	203,79	215,42	5,326 a
Média (grupoamento do teste de Tukey)	5,747 a	5,126 c	5,141 c	5,411 b	

Resultados da ANAVA	F tratamento	F espécie	F tratamento x espécie	CV(%)
	0,44 ns	36,95**	2,84*	3,10

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

CV(%) = coeficiente de variação experimental

Obs.: resultados obtidos no armazenamento

- Os dados de médias para espécies e tratamentos, bem como as análises pelo teste F e de Tukey referem-se a dados transformados em log x.

Não detectou-se efeito dos tratamentos de secagem sobre a elongação do tubo polínico.

4.7.3. Avaliação do estilete e seu respectivo estigma para algumas espécies estudadas

Observou-se para o *E. camaldulensis* um comprimento médio de 115,2 mm, para o *E. tereticornis* de 185 mm, e para o *E. grandis* 67,3 mm. Verificou-se também que o comprimento do tubo polínico médio observado para o pólen recém-colhido foi: *E. camaldulensis* 314,56 μm (0,31456 mm); *E. tereticornis* 176,75 μm (0,17675 mm) e *E. urophylla* 225,30 μm (0,2253 mm).

A relação entre o desenvolvimento do tubo polínico "in vitro" e o comprimento das estruturas do estilete e estigma foi então: *E. camaldulensis* - 0,27%; *E. tereticornis* 0,10%; *E. urophylla* - 0,33%.

Esse resultado está de acordo com a observação de STANLEY & LINSKENS (1974) com respeito ao crescimento do tubo polínico "in vitro". Segundo os autores, ocorre a interrupção do crescimento antes de atingir o tamanho alcançado no estilete. VASIL (1974) atribui isso à deficiência de ácidos, auxinas, giberelinas e enzimas existentes "in vitro".

Constatou-se que as espécies com maior porcentagem de germinação "in vitro" e maior desenvolvimento do tubo polínico apresentaram o comprimento do conjunto estilete e

estigma maior. Esse comportamento tornou-se evidente para o *E. tereticornis* e *E. camaldulensis*.

4.8. VIABILIDADE DO PÓLEN ARMAZENADO POR UM MÊS

4.8.1. Determinação da viabilidade

Tem-se a porcentagem de germinação média do pólen das diferentes espécies na Tabela 22.

Na Tabela 23 tem-se os valores de χ^2 obtidos para as espécies em função dos dados de germinação de acordo com os diferentes tratamentos de secagem e armazenamento.

Os dados relativos ao χ^2 obtidos entre as espécies encontram-se na Tabela 24.

Tabela 22. Germinação média (%) sob as diferentes condições (Secagem e armazenamento) e valores de χ^2 obtidos entre as espécies.

Tratamento	Amostramento	<i>E. camaldulensis</i>
Sol	"Fresco"	3,00
Estufa (25°C)	"Fresco"	11,17
Vácuo	"Fresco"	29,75
Sol	Refrigerado	4,00
Estufa (25°C)	Refrigerado	12,92
Vácuo	Refrigerado	32,92
Valor de χ^2		280,62**

** - significativo ao nível $\alpha = 0,01$.

Tabela 22. Germinação média (%) sob as diferentes condições (secagem e armazenamento) e valores de χ^2 obtidos entre tratamentos para as espécies.

Tratamento		ESPÉCIE			
Secagem	Armazenamento	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>
Sem	"Freezer"	3,00	5,83	1,17	1,33
Estufa (35°C)	"Freezer"	11,17	9,83	11,42	10,08
Vácuo	"Freezer"	29,75	10,17	18,75	19,34
Sem	Refrigerador	1,00	0,58	1,17	0,92
Estufa (35°C)	Refrigerador	12,92	12,50	0,34	12,67
Vácuo	Refrigerador	32,92	8,09	1,50	21,25
Valor de χ^2		280,62**	49,63**	211,27**	157,55**

Obs.: armazenamento por um mês em "freezer" (-16°C) e em refrigerador (4°C)

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Tabela 23. Resultados de χ^2 para médias de germinação (%) do pólen entre os diferentes tratamentos de secagem e armazenamento.

Trat. de secagem/ armazenamento	Trat. de secagem/ espécie	Estufa (35°C)	Vácuo	Testemunha	Estufa (35°C)	Vácuo	Testemunha
		"Freezer"	"Freezer"	"Freezer"	Refrigerador	Refrigerador	Refrigerador
Estufa "Freezer"	<i>E. camaldulensis</i>	-	42,00**	20,57**	0,43ns	54,91**	34,80**
	<i>E. grandis</i>	-	0,056ns	4,48*	1,53ns	0,55ns	33,34**
	<i>E. tereticornis</i>	-	8,19**	35,21**	42,91**	32,91**	33,52**
	<i>E. urophylla</i>	-	14,36**	28,85**	0,82ns	19,20**	31,17**
Vácuo "Freezer"	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	104,51**	34,54**	0,98ns	127,06**
	<i>E. grandis</i>	-	-	5,50*	1,00ns	0,95ns	37,38**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	68,06**	76,58**	65,40**	68,06**
	<i>E. urophylla</i>	-	-	71,64**	8,48**	0,38ns	77,27**
Testemunha "Freezer"	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	26,21**	121,95**	4,08*
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	10,99**	1,92ns	18,21**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	1,30ns	0,09ns	0,00ns
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	37,36**	80,13**	0,51ns
Estufa Refrigerador	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	-	46,49**	43,13**
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	3,89*	47,39**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	2,02ns	1,30ns
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	-	10,35**	42,41**
Vácuo Refrigerador	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	-	-	145,15**
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	-	28,71**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	-	0,09ns
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	-	-	85,85**

Obs.: testemunha = sem secagem; armazenamento por um mês em "freezer" (-16°C) e em refrigerador (4°C)

** = significativo ao nível
* = significativo ao nível
ns = não significativo

$\alpha = 0,01$
 $\alpha = 0,05$

De acordo com as Tabelas 22 e 23 verifica-se quanto a germinação:

- a) *E. camaldulensis*: houve diferença significativa ao nível de 5% entre os tratamentos que sofreram secagem a vácuo e os demais, evidenciou-se uma superioridade na germinação para os mesmos independentemente da temperatura de armazenamento. Observou-se a germinação de 32,92% para o pólen armazenado em refrigerador e 29,75% para aquele armazenado em "freezer". Em seguida destacou-se o pólen seco em estufa (35°C) com germinação média equivalente tanto para "freezer" (-16°C) quanto para refrigerador (4°C), respectivamente 11,17% e 12,92%. O pólen que não sofreu redução de umidade exibiu uma queda drástica no poder germinativo após um mês de armazenamento.

A temperatura de 4°C mostrou-se menos adequada do que -16°C para o *E. camaldulensis*, tendo sido observada uma média de germinação de 1% para 4°C e 3% para -16°C.

Como observou-se para o *E. camaldulensis*, quando se praticou a redução de umidade a vácuo ou em estufa (35°C) pôde-se armazenar o pólen com sucesso no "freezer" ou refrigerador.

Tornou-se evidente a maior eficácia da redução de umidade através do vácuo.

- b) *E. grandis*: as diferenças detectadas entre médias de germinação do pólen que sofreu secagem em estufa (35°C) e vácuo, não são evidentes ao nível de 5%. Vale salientar todavia, que o pólen armazenado com conteúdo de umidade original apresentou uma maior queda do poder germinativo, especialmente aquele armazenado em refrigerador que atingiu uma germinação de 0,58%.
- c) *E. tereticornis*: verifica-se que o tratamento secagem do pólen a vácuo seguido de armazenamento em "freezer" propiciou uma vez mais a maior porcentagem de germinação, 18,75%. A testemunha armazenada em "freezer" exibiu uma germinação tão baixa estatisticamente, ao nível de 1% quanto todos os tratamentos de secagem armazenados em refrigerador. Neste caso, evidenciou-se mais uma vez a maior adequação da temperatura -16°C sobre 4°C para a maioria dos tratamentos.
- d) *E. urophylla*: verifica-se ao nível de 1% que o pólen seco a vácuo e armazenado em refrigerador (4°C) apresentou a maior porcentagem de germinação. A testemunha armazenada em "freezer" e refrigerador exibiu a menor porcentagem de germinação, respectivamente: 1,33% e 0,92%.

Tabela 24. Valores de χ^2 para a germinação média (%) do pólen entre as espécies de *Eucalyptus* sob os diversos tratamentos de secagem prévia e armazenamento.

Espécie (média)	<i>E. camaldulensis</i> (15,13)	<i>E. grandis</i> (7,83)	<i>E. tereticornis</i> (5,72)	<i>E. urophylla</i> (10,82)
<i>E. camaldulensis</i>	-	11,05**	19,21**	3,58ns
<i>E. grandis</i>	-	-	1,27ns	2,14ns
<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	6,61*

Obs.: armazenamento por um mês em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C)

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

Nota-se através da Tabela 24 que ao nível de 5% mais uma vez o *E. camaldulensis* apresentou a maior porcentagem de germinação, 15,13%. O *E. grandis* e *E. tereticornis* exibiram as menores porcentagens de germinação, 7,83% e 5,72%, respectivamente. O *E. urophylla* comportou-se estatisticamente como o *E. camaldulensis* com uma germinação média de 10,82%.

4.8.2. Crescimento do tubo polínico

Tem-se na Tabela 25 o comprimento médio (μm) do tubo polínico para as diversas espécies em função dos tratamentos de redução de umidade e temperatura.

Tabela 25. Comprimento médio do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey.

Tratamento		ESPÉCIE				Média (grupamento do teste de Tukey)
Secagem	Armazenamento	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>	
Sem	"Freezer"	158,04	162,82	-	141,15	-
Estufa (35°C)	"Freezer"	188,81	182,12	198,93	170,89	5,174 a
Vácuo	"Freezer"	209,82	218,16	153,66	148,44	5,173 a
Sem	Refrigerador	171,78	-	-	-	-
Estufa (35°C)	Refrigerador	238,46	190,73	150,00	152,27	5,252 a
Vácuo	Refrigerador	223,88	134,42	-	179,46	-
Média (grupamento do teste de Tukey)		5,356 a	5,162 b	-	7,077 b	-

Resultados da ANAVA	F tratamento	F espécie	F tratamento x espécie	CV (%)
	0,52ns	5,64**	2,70*	3,82

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

CV(%) = coeficiente de variação experimental

Obs.: Armazenamento por um mês em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C) os dados de médias para espécies e tratamentos, bem como as análises pelo teste F e de Tukey referem-se a dados transformados em $\log x$

Verifica-se pela Tabela 25, que o *E.camaldulensis* novamente apresentou comprimento médio, 198,47 μm . Não se detectou diferença entre média dos tubos polínicos para o pólen armazenado em "freezer" e refrigerador em função dos diferentes tratamentos de secagem prévia.

4.9. VIABILIDADE DO PÓLEN ARMazenADO DURANTE 2 MESES

4.9.1. Determinação da viabilidade

Na Tabela 26 encontram-se os dados de porcentagem de germinação para as diferentes espécies.

Na Tabela 27, encontram-se os valores de χ^2 obtidos para as espécies em função dos dados de germinação, de acordo com os diferentes tratamentos de secagem e armazenamento. Os dados relativos ao χ^2 obtidos entre as espécies encontram-se na Tabela 28.

Tabela 26. Germinação média (%) sob as diferentes condições de secagem e armazenamento e valores de χ^2 obtidos entre tratamentos para as espécies.

Tratamento		E S P É C I E			
Secagem	Armazenamento	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>
Sem	"Freezer "	4,08	1,59	0,92	4,17
Estufa (35°C)	"Freezer "	34,67	2,92	9,67	33,84
Vácuo	"Freezer "	23,50	7,42	25,57	42,67
Sem	Refrigerador	1,42	0,00	0,17	0,83
Estufa (35°C)	Refrigerador	33,42	2,75	0,25	30,25
Vácuo	Refrigerador	25,00	6,92	3,08	48,50
Valor de χ^2 entre tratamentos		255,05**	46,19**	326,20**	404,94**

Obs.: Armazenamento por 2 meses em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C)

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Tabela 27. Resultados de χ^2 para médias de germinação (%) do pólen entre diferentes tratamentos de secagem e armazenamento.

Trat. de secagem/ armazenamento	Trat. de secagem/ espécie	Estufa (35°C)		Vácuo		Testemunha	
		"Freezer"	"Freezer"	"Freezer"	Refrigerador	Refrigerador	Refrigerador
Estufa - "Freezer"	<i>E. camaldulensis</i>	-	12,26**	121,06**	0,14ns	9,08**	146,17**
	<i>E. grandis</i>	-	7,43**	1,35ns	0,00ns	6,07*	12,18**
	<i>E. tereticornis</i>	-	35,07**	32,57**	38,00**	15,27**	38,00**
	<i>E. urophylla</i>	-	6,12*	116,96**	1,47ns	17,35**	151,72**
Vácuo - "Freezer"	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	64,13**	9,82**	0,25ns	88,50**
	<i>E. grandis</i>	-	-	14,08**	7,43**	0,08ns	30,09**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	108,75**	114,99**	84,10**	114,99**
	<i>E. urophylla</i>	-	-	166,13**	13,52**	2,90ns	205,67**
Testemunha - "Freezer"	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	114,25**	71,14**	4,67*
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	1,35ns	12,29**	7,06**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	1,01ns	5,50*	1,01ns
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	95,82**	204,58**	9,11**
Estufa - Refrigera- rador	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	-	6,98**	141,85**
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	6,07**	12,18**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	9,46**	0,00ns
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	-	28,71**	131,51**
Vácuo - Refrigera- dor	<i>E. camaldulensis</i>	-	-	-	-	-	96,09**
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	-	27,94**
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	-	9,46**
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	-	-	245,68**

Obs.: Testemunha - sem secagem; armazenamento por dois meses em "freezer" (-16°C) e refrigera-
dor (4°C)

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$
* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$
ns = não significativo

De acordo com as Tabelas 26 e 27 verifica-se:

- a) *E. camaldulensis*: evidenciou-se uma superioridade estatística significativa ao nível de 1% para o pólen seco em estufa (35°C) independente da temperatura de armazenamento. Verifica-se uma média de 34,67% para germinação do pólen armazenado em "freezer" e 33,42% para o pólen armazenado em refrigerador. O pólen seco a vácuo comportou-se de forma intermediária.

É importante notar que ao final do primeiro mês de armazenamento a situação era oposta, ou seja, o pólen seco a vácuo independentemente da temperatura de armazenamento apresentou germinação superior ao pólen seco em estufa.

Ainda detectou-se uma inferioridade na germinação para a testemunha, tanto armazenada em "freezer" quanto no refrigerador. Dentre as duas testemunhas destaca-se com menor média aquela armazenada em refrigerador, 1,42% contra 4,08% da armazenada em "freezer". Essa tendência já era observada ao final do primeiro mês de armazenamento.

- b) *E. grandis*: torna-se evidente ao nível de 5% que o pólen seco a vácuo apresentou as maiores porcentagens de germinação. Observa-se as médias de 7,42% para o pólen armazenado em "freezer" e 6,92% para o pólen armazenado em refrigerador. Os tratamentos envolvendo secagem em estufa (35°C) apresentaram germinação intermediária independente da temperatura de armazenamento com média de 2,92%

para o pólen armazenado em "freezer" e 2,75% para o pólen armazenado em refrigerador. O pólen com conteúdo de umidade inicial apresentou uma germinação muito baixa, especialmente aquele armazenado em refrigerador, apresentando germinação praticamente nula. Por outro lado, o tratamento envolvendo secagem a vácuo e armazenamento em "freezer" ao final do primeiro mês já se colocava entre os mais promissores, mantendo essa tendência até o final do segundo mês.

- c) *E. tereticornis*: ao comparar as Tabelas 26 e 27 com as Tabelas 22 e 23 (23 e 27 ao nível de 5%) verifica-se que as mudanças ocorridas relativas ao comportamento dos diferentes tratamentos foram pequenas do primeiro para o segundo mês de armazenamento. Os grãos de pólen secos em estufa (35°C) e a vácuo seguido de armazenamento em "freezer" mantiveram o maior poder germinativo, respectivamente, 25,59% e 9,67%. Já os tratamentos envolvendo armazenamento à umidade inicial novamente apresentaram baixa porcentagem de germinação, destacando-se aquele armazenado em "freezer" com apenas 0,17%.

Outra curiosidade observada refere-se ao maior índice de viabilidade obtido no final do segundo mês para o tratamento secagem a vácuo seguido de armazenamento em "freezer", quando comparado ao final do primeiro mês. Na verdade se esperava resultado oposto, pela própria tendência de deterioração observada ao longo do tempo. Isso se deve ao fato de não se ter aplicado uma reidratação ideal aos tratamentos por um período adequado em câmara úmida. O pólen

permaneceu apenas por um curto período exposto ao ambiente, ficando a sua reidratação à mercê da umidade relativa do ar em que se aplicou o teste. Este é um fato muito importante que deverá ser observado nos próximos testes de germinação.

- d) *E. urophylla*: comparando-se as Tabelas 26 e 27 com as Tabelas 22 e 23 (23 e 27 ao nível de 5%) nota-se basicamente a mesma posição dos tratamentos quanto a retenção da viabilidade. Apenas a testemunha armazenada em refrigerador evidenciou uma queda mais drástica no poder germinativo que a testemunha armazenada em "freezer", com uma média de germinação de apenas 0,83%. Os tratamentos de secagem a vácuo com armazenamento em refrigerador e secagem a vácuo com armazenamento em "freezer" apresentaram o melhor índice de germinação com médias respectivas de 48,50% e 42,67%. Neste caso surpreendentemente também evidenciou-se uma maior porcentagem de germinação ao final do segundo mês em relação ao primeiro mês, pelo mesmo motivo atribuído ao *E. tereticornis*.

Tabela 28. Resultados de χ^2 para germinação média (%) do pólen entre as espécies de *Eucalyptus* sob os diversos tratamentos de secagem prévia e armazenamento

Espécie (média)	<i>E. camaldulensis</i> (20,35)	<i>E. grandis</i> (3,60)	<i>E. tereticornis</i> (6,61)	<i>E. urophylla</i> (26,71)
<i>E. camaldulensis</i>	-	52,04**	31,46**	5,24*
<i>E. grandis</i>	-	-	3,79ns	81,86**
<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	57,72**

Obs.: armazenamento por dois meses em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C).

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

De acordo com a Tabela 28 ao nível de 5%, nota-se que o *E. urophylla* apresentou a maior porcentagem média de germinação com 26,71%, enquanto o *E. camaldulensis* exibiu germinação intermediária de 20,35%. O *E. grandis* e *E. tereticornis* ficaram com as menores médias, respectivamente, 3,60% e 6,61%.

É interessante salientar que nos testes preliminares e outros testes observados pelo autor, o *E. tereticornis* sempre apresentou porcentagem média de germinação tão alta quanto o *E. camaldulensis*. Ocorre, todavia, que neste estudo específico de armazenamento empregou-se árvores de *E. tereticornis* com aproximadamente 15 anos de idade, não dispondo-se de maiores detalhes com respeito à sanidade e ao estado nutricional das mesmas.

4.9.2. Crescimento do tubo polínico

Encontram-se na Tabela 29 os dados de comprimento médio (μm) do tubo polínico para as espécies em função dos tratamentos de redução de umidade e temperatura de armazenamento.

Tabela 29. Comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey.

Secagem	Tratamento Armazenamento	ESPÉCIE				Média (grupamento do teste de Tukey)
		<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>	
Testemunha	"Freezer"	85,92	176,14	206,02	100,28	-
Estufa (35°C)	"Freezer"	173,74	197,73	240,15	201,14	5,302 a
Vácuo	"Freezer"	143,16	180,10	268,75	202,70	5,237 a
Testemunha	Refrigerador	131,24	-	99,99	68,90	-
Estufa (35°C)	Refrigerador	238,15	192,80	175,78	169,62	5,248 a
Vácuo	Refrigerador	175,49	217,65	203,06	182,49	-
Média (grupamento do teste de Tukey)		5,173 b	5,234 ab	5,407 a	5,236 ab	

Resultados de ANAVA	F tratamento	F espécie	F tratamento x espécie	CV(%)
	0,49ns	2,53ns	3,73**	3,61

sendo: ** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* = significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns = não significativo

Obs.: armazenamento por 1 mês em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C).

Os dados de médias para espécies e tratamentos, bem como as análises pelo teste F e de Tukey referem-se a dados transformados em log x.

Neste caso observou-se a maior média do tubo polínico para o *E. tereticornis* (198,96 μm) e a pior média para o *E. camaldulensis* (157,95 μm). Provavelmente com o decorrer do armazenamento a necessidade do acréscimo de certos elementos ao meio de germinação acentuou-se para determinadas espécies. Como não houve esse acréscimo aquelas com maior necessidade não emitiram o tubo polínico adequadamente. O não controle da reidratação pode explicar também a mudança de comportamento na germinação e emissão do tubo polínico.

4.10. VIABILIDADE DO PÓLEN ARMAZENADO DURANTE TRÊS MESES

4.10.1. Determinação da viabilidade

A porcentagem média de germinação do pólen, bem como os resultados das análises pelo χ^2 encontram-se na Tabela 30.

Na Tabela 31 tem-se os valores de χ^2 obtidos para as espécies em função da germinação de acordo com os diferentes tratamentos de secagem e armazenamento.

Os dados relativos ao χ^2 obtidos para as espécies encontram-se na Tabela 32.

Tabela 30. Germinação média (%) sob diferentes condições de secagem e armazenamento e valores de χ^2 obtidos entre tratamentos para as espécies.

Tratamento		ESPÉCIE			
Secagem	Armazenamento	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>
Sem	"Freezer"	0,00	0,17	2,00	0,25
Estufa (35°C)	"Freezer"	36,00	6,75	14,83	29,59
Vácuo	"Freezer"	42,92	21,50	18,67	10,84
Sem	Refrigerador	0,00	4,75	6,25	0,25
Estufa (35°C)	Refrigerador	27,47	8,58	0,75	17,25
Vácuo	Refrigerador	38,75	0,67	0,17	16,17
Valor χ^2 entre tratamentos		411,42**	182,61**	189,48**	233,69**

Obs.: Armazenamento por 3 meses em "freezer" (-16°C) e em refrigerador (4°C)

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

Tabela 31. Resultados de χ^2 para médias de germinação (%) do pólen entre diferentes tratamentos de secagem e armazenamento.

Trat. de secagem/ armazenamento		Trat. de secagem/ espécie	Estufa (35°C)	Vácuo	Testemunha	Estufa (35°C)	Vácuo	Testemunha
			"Freezer"	"Freezer"	"Freezer"	Refrigerador	Refrigerador	Refrigerador
Estufa - "Freezer"	<i>E. canadulensis</i>	-	4,10*	175,61**	7,08**	0,65ns	175,61**	
	<i>E. grandis</i>	-	34,41**	26,08**	0,63ns	20,97**	1,45ns	
	<i>E. tereticornis</i>	-	2,61ns	41,29**	53,68**	62,53**	13,77**	
	<i>E. urophylla</i>	-	43,34**	136,51**	16,63**	20,58**	136,51**	
Vácuo - "Freezer"	<i>E. canadulensis</i>	-	-	219,11**	27,77**	1,50ns	219,11**	
	<i>E. grandis</i>	-	-	93,18**	26,51**	87,09**	49,21**	
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	60,35**	73,64**	82,76**	29,98**	
	<i>E. urophylla</i>	-	-	43,54**	6,92**	4,68**	43,54**	
Testemunha - "Freezer"	<i>E. canadulensis</i>	-	-	-	126,19**	192,25**	0,00ns	
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	32,54**	1,01ns	16,62**	
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	2,30ns	8,08**	8,33**	
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	73,59**	67,64**	0,00ns	
Estufa - Refrigerador	<i>E. canadulensis</i>	-	-	-	-	11,96**	126,19**	
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	27,23**	4,55*	
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	3,01ns	16,90**	
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	-	0,22ns	73,59**	
Vácuo - Refrigerador	<i>E. canadulensis</i>	-	-	-	-	-	192,75**	
	<i>E. grandis</i>	-	-	-	-	-	11,97**	
	<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	-	-	24,74**	
	<i>E. urophylla</i>	-	-	-	-	-	67,64**	

Obs.: testemunha sem secagem; armazenamento por um mês em "freezer" (-16°C) e em refrigerador (4°C)

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$
 * = significativo ao nível $\alpha = 0,05$
 ns = não significativo

De acordo com as Tabelas 30 e 31 verifica-se:

- a) *E. camaldulensis*: o pólen seco a vácuo e armazenado em "freezer" e em refrigerador apresentou as maiores porcentagens de germinação, respectivamente: 42,92% e 38,75%, de acordo com a Tabela 30. Novamente observou-se a tendência da avaliação feita em um mês após o armazenamento, ou seja, o comportamento intermediário do pólen seco em estufa (35°C). Finalmente a testemunha tanto armazenada em "freezer" quanto em refrigerador apresentou germinação nula.
- b) *E. grandis*: comparando-se a Tabela 31 ao nível de 5% com os resultados dos meses anteriores, ou seja, Tabelas 23 e 27, evidencia-se que o pólen seco a vácuo e armazenado em "freezer" sempre destacou-se como o melhor tratamento em todos os casos. Por outro lado, o pólen seco a vácuo e armazenado em refrigerador exibiu uma germinação muito baixa (0,67%). A testemunha, armazenada em "freezer", também apresentou germinação muito baixa, com 0,17%.
- c) *E. tereticornis*: nota-se que os tratamentos: secagem a vácuo e armazenamento em "freezer", bem como secagem em estufa e armazenamento em "freezer" mantiveram as maiores médias de germinação, respectivamente: 18,67% e 14,83%. O desempenho desses tratamentos repetiu-se durante os três meses. Também tornou-se evidente na Tabela 30, que o pólen armazenado no refrigerador independentemente do método de secagem, apresentou baixa viabilidade com valores entre 6,25% e 0,17%. Neste caso, mesmo o pólen que foi seco a vácuo ou em estufa

(35°C) perdeu a viabilidade completamente aos três meses quando armazenado no refrigerador, ao passo que o pólen que sofreu os mesmos tratamentos e foi armazenado em "freezer" exibiu germinação satisfatória.

- d) *E. urophylla*: detecta-se uma superioridade na germinação do pólen seco em estufa e armazenado em "freezer", com valor de 29,59%. Ainda o pólen seco a vácuo ou em estufa (35°C) e armazenado em refrigerador, apresentou germinação intermediária, com médias respectivas de 16,17% e 17,25%. Por sua vez, o pólen armazenado com conteúdo de umidade inicial ("freezer" e refrigerador) mostrou uma viabilidade praticamente nula, 0,25% para ambos os casos.

Tabela 32. Valores de χ^2 para a germinação (%) do pólen entre as espécies de *Eucalyptus* sob os diversos tratamentos de secagem prévia e armazenamento.

Espécie (média)	ESPÉCIE			
	<i>E. camaldulensis</i> (24,19)	<i>E. grandis</i> (7,07)	<i>E. tereticornis</i> (7,11)	<i>E. urophylla</i> (12,39)
<i>E. camaldulensis</i>	-	43,84**	43,84**	17,64**
<i>E. grandis</i>	-	-	0,00ns	6,88**
<i>E. tereticornis</i>	-	-	-	6,86**

Obs.: armazenamento por 3 meses em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C).

** = significativo ao nível $\alpha = 0,01$

ns = não significativo

Segundo a Tabela 32 ao nível de 1%, o *E. camaldulensis* apresentou a maior porcentagem de germinação em relação às demais espécies, com uma média de 24,19%; *E. urophylla* destacou-se logo a seguir com 12,39%; já o *E. tereticornis* e *E. grandis* mostraram as menores médias, 7,11% e 7,07%, respectivamente. É interessante salientar que durante os três meses de avaliação, as espécies *E. camaldulensis* e *E. urophylla* sempre apresentaram melhor germinação que os demais.

Outro fato curioso refere-se à obtenção de uma maior porcentagem de germinação para certas espécies ao final do terceiro mês de armazenamento quando comparada ao primeiro mês. Por exemplo; *E. camaldulensis* germinou 15,13% ao final do primeiro mês e 24,19% ao final do terceiro mês. O *E. urophylla* germinou 10,82% no primeiro mês e 12,39% no terceiro mês. O *E. tereticornis* apresentou viabilidade de 5,72% no primeiro mês e 7,07% no terceiro mês. Este fato novamente pode ser atribuído à não reidratação adequada do pólen em câmara úmida por tempo adequado antes do teste de viabilidade. A reidratação tendo permanecido a cargo da umidade relativa do ar por curto período de tempo, tornou-se heterogênea de teste para teste. Todavia, verificou-se que os métodos empregados para o armazenamento apresentaram bons resultados ao final de três meses.

De qualquer forma, evidenciou-se a necessidade de secagem prévia para o armazenamento. Como foi enfatizado na literatura, essa prática além de permitir a redução da ta-

xa respiratória evita o ataque por microorganismos. Além do mais quando se pretende submeter o pólen à temperatura muito baixa (-16°C) ou menos) a redução de umidade é necessária para evitar o rompimento dos tecidos pelo congelamento intracelular da água contida no pólen, como foi enfatizado na revisão bibliográfica.

Dependendo do tratamento de secagem e da espécie envolvida, ainda pode-se obter boa germinação no refrigerador após três meses de armazenamento como é o caso do *E. urophylla*. Analisando-se, porém, os tratamentos que retiveram o maior poder germinativo destacam-se: *E. grandis* e *E. tereticornis* e secagem em estufa (35°C) com armazenamento em "freezer" (-16°C) para o *E. urophylla*. Verifica-se, portanto, que os melhores tratamentos sempre envolveram armazenamento em "freezer" (-16°C).

4.10.2. Crescimento do tubo polínico

Os dados de comprimento médio (μm) do tubo polínico para as diversas espécies em função dos tratamentos de redução de umidade e temperatura de armazenamento encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33. Comprimento médio do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem prévia e resultados dos testes F e de Tukey.

Tratamento		ESPÉCIE				Média
Secagem	Armazenamento	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. urophylla</i>	(grupamento do teste de Tukey)
Testemunha	"Freezer"	-	-	170,11	379,32	-
Vácuo	"Freezer"	388,10	349,94	305,11	248,77	5,751 a
Estufa (35°C)	"Freezer"	400,88	301,74	252,52	263,45	5,692 a
Testemunha	Refrigerador	-	297,13	94,77	147,91	-
Vácuo	Refrigerador	361,90	195,05	115,47	229,47	-
Estufa (35°C)	Refrigerador	353,92	314,00	119,53	247,46	5,463 b
Média (grupamento do teste de Tukey)		5,929 a	5,765 b	5,341 c	5,507 c	

Resultados de ANAVA	F tratamento	F espécies	F tratamento x espécie	CV(%)
	19,58**	45,75**	8,75**	2,18

sendo: ** significativo ao nível $\alpha = 0,01$

* significativo ao nível $\alpha = 0,05$

ns não significativo

CV(%) coeficiente de variação experimental

Obs.: armazenamento por três meses em "freezer" (-16°C) e refrigerador (4°C)

Os dados de médias para espécies e tratamentos, bem como as análises pelo teste F e de Tukey referem-se a dados transformados em $\log x$.

Evidencia-se o comprimento médio do tubo polínico superior para o *E. camaldulensis* (376,20 μm); já o *E. urophylla* com 253,23 μm e o *E. tereticornis* com 176,25 μm , apresentaram as menores médias de comprimento do tubo polínico. Dentre os tratamentos que retiveram ainda o poder germinativo, verifica-se que o pólen seco em estufa (35°C) e armazenado em refrigerador, apresentou o menor comprimento médio do tubo polínico (258,73 μm). Neste caso, isso se justifica pela deterioração do pólen neste tratamento.

Apesar de que os meios empregados para secagem e armazenamento do pólen foram satisfatórios para o período de três meses, deve-se observar métodos de redução de umidade mais drásticos como o emprego de liofilização. O armazenamento sob temperaturas baixíssimas como -196°C obtidas por meio de gases liquefeitos devem constituir-se em um dos caminhos para o armazenamento a longo prazo.

Deve-se destacar no entanto, que o domínio de técnicas empregadas para avaliar adequadamente o pólen são tão importantes quanto as técnicas de armazenamento. Estudos com respeito a mudança da necessidade do pólen armazenado em relação aos componentes do meio de germinação devem ser conduzidos. Há necessidade de pesquisas mais detalhadas. A literatura evidencia que ao menos a mudança na necessidade de carboidratos existe.

O manejo adequado do pólen é um fator decisivo para o sucesso do armazenamento e de testes de germinação, merecendo melhor consideração, especialmente para o *Eucalyptus*. Por exemplo, o estágio ideal de desenvolvimento do pólen para todas as espécies é considerado quando rompe-se o segundo opérculo. Todavia, não se tem registros de estudos citológicos detalhados e a avaliação, conseqüentemente, tem sido restrita ao aspecto visual.

- É necessária a redução da umidade do pólen visando o armazenamento, mesmo que seja a curto prazo, devido a redução do metabolismo do mesmo e a prevenção de contaminação por microorganismos.
- O armazenamento do pólen em "freezer" (-16°C) foi mais eficiente do que em refrigerador (4°C) no período estudado (3 meses), devido ao pré-tratamento de redução da umidade do pólen.
- As concentrações de 30% de sacarose e 0,8% de ágar mostraram-se satisfatórias à composição do meio de cultura para a germinação do pólen "in vitro".
- A determinação dos elementos químicos necessários à composição do meio de cultura para a germinação do pólen torna-se difícil uma vez que o estado nutricional da planta matriz exerce influência na necessidade ou não de elementos adicionais como boro e cálcio.

5. CONCLUSÕES

- A extração do pólen de *Eucalyptus* spp. a seco é mais adequada do que em água e em solventes orgânicos como: acetona, éter etílico e éter de petróleo.
- É necessária a redução de umidade do pólen visando o armazenamento, mesmo que seja a curto prazo, devido a redução do metabolismo do mesmo e a prevenção de contaminação por microorganismos.
- O armazenamento do pólen em "freezer" (-16°C) foi mais eficiente do que em refrigerador (4°C) no período estudado (3 meses), devido ao pré-tratamento de redução da umidade do pólen.
- As concentrações de 30% de sacarose e 0,8% de ágar mostraram-se satisfatórias à composição do meio de cultura para a germinação do pólen "in vitro".
- A determinação dos elementos químicos necessários à composição do meio de cultura para a germinação do pólen torna-se difícil uma vez que o estado nutricional da planta matriz exerce influência na necessidade ou não de elementos adicionais como boro e cálcio.

- A temperatura de 25°C e umidade relativa de 99% são adequadas aos propósitos de germinação do grão de pólen de *Eucalyptus* "in vitro".
- As avaliações da germinação para as espécies de *Eucalyptus* estudadas devem ser feitas com 24 horas de incubação; avaliações entre 6 e 18 horas são precoces e em período superior a 24 horas sujeitos a contaminação.
- A reidratação do pólen que sofreu pré-tatamento de secagem para o armazenamento é imprescindível antes de submetê-lo a teste de germinação para uma avaliação adequada de viabilidade.
- O pólen de cada espécie apresenta um padrão próprio de germinação. Dentre as espécies estudadas, o *E. camaldulensis* sempre exibiu o maior índice de viabilidade.
- As variações relativas às espécies constituem-se nas principais causas das diferenças no desenvolvimento do tubo polínico. As variações relativas ao manuseio, tal como redução de umidade não são evidentes.

AGARWAL, P. L. Effect of storage in organic solvent on the

viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needle species. *Forestry Science*

1974, 20(2): 101-4.

BARNABAS, B. Effect of water loss on germination ability of maize (*Zea mays* L.) pollen. *Annals of Botany, Oxford*, 58 (2): 361-4, 1985.

BHOJWANT, S. S. & BHATHNAGAR, S. P. *The Embryology of Angiosperms*. New Delhi, Skylark Printers, 1974, 264p.

BODEN, R. W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. *Australian Forestry, Canberra*, 12(2): 73-81, 1958.

BOHRES, C. P.; SILVA, A. A.; FERREIRA, M. Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de *Eucalyptus* spp. *Revista Brasileira de Botânica*, 16(1): 3-32, 1973.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, P.K. Effect of storage in organic solvent on the germination of prapevine pollen. *Journal of Horticultural Science*, London, 58(3):389-92, 1983.
- AHLGREN, C.E. & AHLGREN, I.F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5-needle species. *Forestry Science*, Washington, 24:100-2, 1978.
- AKORODA, M.O. Long-term storage of yam pollen. *Scientia Horticulturæ*, Amsterdã, 20(3):225-30, 1983.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, Geneva, N.Y. 55(1):13-8, 1980.
- BARNABÁS, B. Effect of water loss on germination ability of maize (*Zea mays* L.) pollen. *Annals of Botany*, Oxford, 55(2):201-4, 1985.
- BHOJWANI, S.S. & BHATNAGAR, S.P. *The Embryology of Angiosperms*. New Delhi, Skylark Printers, 1974. 264p.
- BODEN, R.W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. *Australian Forestry*, Canberra, 12(2): 73-81, 1958.
- BORGES, C.P.; SILVA, A.A.; FERREIRA, M. Estudos preliminares sobre a conservação do pólen de *Eucalyptus* spp. *IPEF*, Piracicaba, (6): 3-32, 1973.

- BREWBAKER, J.L. Distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *American Journal of Botany*, New York, 54:1069-83, 1967.
- BREWBAKER, J.L. *Genética na Agricultura*. São Paulo, Editora Polígono, 1969. 217p.
- BREWBAKER, J.L. & KWACK, B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, New York, 50:859-65, 1963.
- CAMPOS, H. *Estatística Experimental Não-Paramétrica*. 4.ed. Piracicaba, ESALQ/USP, 1983. 349p.
- CAUVIN, B. *Eucalyptus* hybridation contrôlée. *Annales de Recherches Sylvicoles*, Paris (1983): 85-118, 1984.
- CHAPERON, H. Breeding improvement of the hybrid *Eucalyptus* species in the Congo-Brazzaville. In: NIKLES, D.G.; BURLEY, J.; BARNES, R.D., ed. *Progress and problems of genetic improvement of tropical forest trees*. Oxford, Commonwealth Forestry Institute, 1978. v. 2, p. 1027-39.
- CHARPENTIER, J.P. & BONNET-MASIMBERT, M. Influence d'une réhydratation préalable sur la germination "in vitro" du pollen de douglas (*Pseudotsuga menziesii*) après conservation. *Annales des Sciences Forestières*, Nancy, 40(3):309-17, 1983.
- CHEN, T.H. & CHEN, J. Test of germinating capacity of tree pollen with TTC. *Journal of Nanjing Technological College of Forest Products*, Nanjing, 4:116-9, 1981. Apud *Forestry Abstracts*, Farham Royal, 45(8):540, aug. 1984.

- COOK, S.A. & STANLEY, R.G. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 9(5):134-6, set./out., 1960.
- DELOUCHE, J.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. *O teste de tetrazólio para viabilidade da semente*. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103p.
- DIAVANSHIR, K. & FECHNER, G.H. Pollen germination and pollen tube growth of Juniperous from autumn and winter collections. *Silvae Genetica*. Frankfurt, 24(1):26-9, 1975.
- DORMAN, K.W. *The genetics and breeding of southern pines*. Washington, USDA, Forest Service, 1976. 407p.
- DUFFIELD, J.W. & SNOW JR., A.G. Pollen longevity of *Pinus strobus* and *Pinus resinosa* as controlled by humidity and temperature. *American Journal of Botany*, New York, 28: 175-7, 1941.
- EENIK, A.H. Preliminary results of research on storage and "in vitro" germination of lettuce pollen as and aid in lettuce breeding. *Euphytica*, Wageningen, 32(2):521-6, jun. 1983.
- EKARATNE, S.N.R. & SENATHI RAJAH, S. Viability and storage of pollen of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. *Annals of Botany*, London, 51(6):661-8, 1983.
- FARMER JR., R.E. & HALL, G.C. In vitro testing and long-term storage of black cherry pollen. In: NORTHEASTERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 22, Syracuse, 1974. *Proceedings*. Syracuse, Upper Darby, USDA/NE, 1975. p.19-22.

- FRANKEL, R. & GALUN, E. *Pollination Mechanism Reproduction and Plant Breeding*. New York, Springer-Verlag, 1977. 281p.
- GABRIELLI, A.C.; CUNHA, R.A.; MAULE, V. Conservação do pólen de diversas espécies de *Eucalyptus* para fins de cruzamento. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 40(2):51-7, 1965.
- GANESHAN, S. Cryogenic preservation of grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*, Geihweilerhorf, 24:169-73, 1985.
- GODDARD, R.E. & MATTHEWS, F.R. Pollen testing. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. p.40-3.
- GOSS, J.A. Development, physiology and biochemistry of corn and wheat pollen. *The Botanical Review*, New York, 34: 333-58, 1968.
- GRABE, D.F. *Manual do Teste Tetrazólio em Sementes*. Brasília, AGIPLAN, 1976. 85p.
- GRIFFIN, A.R.; CHING, K.K.; JOHNSON, K.W.; HAND, F.F.; BUGESS, I.P. Processing *Eucalyptus* pollen for use in controlled pollination. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 31(5/6):198-203, 1982.
- HAUNOLD, A. & STANWOOD, P.C. Long-term preservation of hop pollen in liquid nitrogen. *Crop Science*, Madison, 25 (1): 194-6, 1985.
- HAUSER, E.J.P. & MORRISON, J.H. The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. *American Journal of Botany*, New York, 51(7):748-52, 1964.

- HENNY, R.J. Germination of *Spathiphyllum* and *Vrieesia* pollen after storage at different temperatures and relative humidities. *Hort. Science*, St. Joseph, 13(5):596-7, 1978.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 67(4): 367-75, 1984.
- KANO, N.K.; MARQUES, F.C.M.; KAGEYAMA, P.Y. Armazenamento de sementes de ipê-dourado. *IPEF*, Piracicaba, (13): 13-23, 1978.
- KIRBY, E.G. & SMITH, J.E. Elutable substances of pollen grain walls. In: LINSKENS, H.F. *Fertilization in higher plants*. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1974. p.127-30.
- KLAEHN, F.W. & NEU, R.L. Hardwood pollen study. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 9(2): 44-8, mar./abr. 1960.
- LANNER, R.M. Controlling moisture content of conifer pollen. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 11(4): 114-7, jul./ago. 1962.
- LINSKENS, H.F. *Fertilization in higher plants*. Amsterdam, North-Holland, 1974. 390p.
- LIVINGSTON, G.K. & CHING, K.K. The longevity and fertility of freeze-dried Douglas-fir pollen. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 16: 98-101, 1967.
- MARTINS, M.E.; PRERA, L.E.H.; KAGEYAMA, P.Y. Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. *Circular Técnica*. IPEF, Piracicaba, (128): 1-8, 1981.
- MATTHEWS, F.R. & KRAUS, J. Pollen storage. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. p.37-9.
- OTTERBACHER, A.G.; HELLMAN, E.W.; SKIRVIN, R.M. Long term storage of raspberry pollen. *Fruit Varieties Journal*, 37(3):80-1. Urbana. Apud. Plant Breeding Abstracts, Farnham Royal 54(1): 37, jan. 1984.

- PARFITT, D.E. & ALMEHDI, A.A. A cryogenic storage of grape pollen. *American Journal of Enology and Viticulture Davis* 34(4):227-8, 1983. Apud *Horticultural Abstracts*, Farham Royal, 54(6):324, jun., 1984.
- PERRY, J.L. & MOORE, J.N. Pollen longevity of blackberry cultivars. *Hort. Science*, St. Joseph, 20(4):737-8, 1985.
- PETER, J.K. & STANLEY, R.G. Boron in pollen and pollen cell fractions. In: LINSKENS, H.F. *Fertilization in Higher Plants*. Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1974. p.131-6.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 11.ed. Piracicaba, Livraria Nobel, 1985. 466p.
- SAAVEDRA, E. Influence of pollen grain stage at the time of hand pollination as a factor on fruit set of cherimoya. *Hort. Science*, St. Joseph, 12(2):117-8, 1977.
- SAHAR, N. & SPIEGEL-ROY, P. Citrus pollen storage. *Hort. Science*, St. Joseph, 15(1):81-2, 1980.
- SCHOENIKE, R.E. & STEWART, D.M. Fifth-year results os vacuum drying storage and additives on the viability of some conifer pollens. *Forestry Science*, Washington, 9: 96 - 7, 1963.
- SNYDER, E.B. & CLAUSEN, K.E. Pollen handling. In: USDA FOREST SERVICE. *Seeds of Woody Plants in the United States*. Washington, 1974. p.75-97.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, J. *Biometry*. 2.ed. San Francisco, W. H. Freeman and Company, 1981. 859p.

- SOUSA, V.A. & GONÇALVES, A.N. Efeitos de solventes orgânicos na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 5, Olinda, 1986. *Anais*. p.76.
- SPRAGUE, J. Seed and pollen handling. In: TREE IMPROVEMENT SHORT COURSE. Raleigh, Carolina State University, 1977. p.90-102.
- SPRAGUE, J.R. & JOHNSON, V.W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14, Gainesville, 1977. *Proceedings*. Macon, Eastern Tree Seed, 1977. p.20-7.
- SPRAGUE, J.R. & SNYDER, E.B. Extracting and drying pine pollen. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. p.33-6.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. *Pollen Biology Biochemistry Management*. Berlin, Springer-Verlag, 1974. 307p.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. *Principles and Procedures of Statistics*. 2.ed. New York, McGraw Hill, 1980. 633p.
- VAN WYK, G. Pollen management for eucalypts. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. p.84-8.
- VASIL, I.K. The histology and physiology of pollen germination and tube growth on the stigma and in the style. In: LINSKENS, H.F. ed. *Fertilization in Higher Plants*. Amsterdam, North-Holland, 1974. p.107-19.
- VASILAKAKIS, M. & PORLINGS, I.C. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. *Hort. Science*, St. Joseph, 20(4): 733-5, 1985.
- VIEITEZ, E. El uso del cloruro 2,3,5, trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. *Anales de Edafología y Fisiología Vegetal*, Madrid, 11: 297-308, 1952.

- WANG, B.S.P. The seeds and pollen storage for genetic conservation. Possibilities and limitation. In: FAO. *The Metodology of Conservation of Forest Genetic Resources*. Rome, 1975. p.93-103.
- WANG, Y.J. & ROBINSON, R.W. Influence of temperature and humidity on longevity of squash pollen. *Curcubit Genetics Cooperative*, Geneva, N.Y., 6:91, 1983. Apud *Plant Breeding Abstracts*, Farnham Royal, 54(2/3):172, fev/mar., 1984.
- WIDRLECHNER, M.P.; PELLETT, H.M.; ASCHER, P.D.; FUHRMAN, S.C. "In vivo" pollen germination and vital staining in deciduous azaleas. *Hort. Science*, St. Joseph. 18(1):86-8, 1983.
- WHRIGHT, J.W. *Introduction to Forest Genetics*. New York, Academic Press, 1976. 463p.
- WORSLEY, R.G.F. The processing of pollen. *Silvae Genetica*, Frankfurt, 8(5):143-8, 1959.
- YABUYA, T.; TAKATSUGI, H.; ADACHI, T.; NAGAMOTO, . Effect of organic solvents on the viability of *Iris ensata* Thunb pollen. *Bulletin of the Faculty of Agriculture*, Miyazaki, 29(1): 137-43, 1982.
- YANG, W.P. Investigations on the viability of *Actinia* pollen as affected by storage. *Plant Physiology Communications*, Fujian, 5:31-3, 1983. Apud *Horticultural Abstracts*, Farnham Royal, 54 (12): 862, dez. 1984.

Tabela I. Germinação do pólen (%) sob diferentes concentrações de sacarose.

Repetição	CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE				
	0	20	25	30	35
1	1,58	0,95	3,45	2,32	1,56
2	1,30	1,32	5,92	2,58	1,13
3	2,37	1,35	4,27	1,28	2,18
4	1,70		3,82	0,25	1,02

APÊNDICE

Obs: Incubação por 18 horas

Tabela I. Germinação do pólen (%) sob diferentes concentrações de sacarose.

Tratamentos (ppm de Boro)	Número de Grãos			Germinação (%)
	Germinados	Não Germinados	Total	
0	288	4.338	4.626	6,22
2	84	3.996	4.082	2,06
4	106	3.524	3.630	2,92
8	118	3.412	3.530	3,34
16	72	3.128	3.200	2,25
32	48	2.856	2.904	1,65
64	24	2.584	2.608	0,92
128	12	2.312	2.324	0,52
256	6	2.040	2.046	0,29
512	3	1.768	1.771	0,17
1024	1	1.496	1.497	0,07
2048	0	1.224	1.224	0,00
4096	0	952	952	0,00
8192	0	680	680	0,00
16384	0	408	408	0,00
32768	0	136	136	0,00
65536	0	40	40	0,00
131072	0	12	12	0,00
262144	0	4	4	0,00
524288	0	1	1	0,00
1048576	0	0	0	0,00

Obs: Incubação por 18 horas

Tratamentos (ppm de Boro)	Número de Grãos			Germinação (%)
	Germinados	Não Germinados	Total	
0	815	1.935	2.750	29,64
3	548	1.216	1.762	31,00
4	443	1.004	1.447	30,62
5	457	1.224	1.681	27,20
6	403	1.053	1.456	27,70

Obs: Incubação por 18 horas

Tabela II. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus urophylla* sob diferentes doses de boro.

Tratamentos (ppm de Boro)	Número de Grãos			Germinação (%)
	Germinados	Não Germinados	Total	
0	288	4.338	4.626	6,22
2	84	3.998	4.082	2,06
4	106	3.763	3.869	2,74
6	118	4.544	4.662	2,53
8	86	3.468	3.554	2,42
10	72	5.223	5.295	1,36

Obs: Incubaçãc por 18 horas

Tabela III. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus teretis cornis* sob o efeito de diferentes doses de boro.

Tratamentos (ppm de Boro)	Número de Grãos			Germinação (%)
	Germinados	Não Germinados	Total	
0	815	1.935	2.750	29,64
3	546	1.216	1.762	31,00
4	443	1.004	1.447	30,62
5	457	1.224	1.681	27,20
6	403	1.053	1.456	27,70

Obs: Incubaçãc por 18 horas

Tabela IV. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus tereticornis* sob o efeito de diferentes doses de boro.

Tratamentos (ppm de H ₃ BO ₃)	Número de Grãos										Total	Germinação (%)			
	Germinados					Não Germinados									
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Total	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Total		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
0	97	109	152	73	431	159	291	319	211	980	1.411	37,89	27,25	32,27	25,70
100	19	42	30	33	124	179	401	439	407	1.426	1.550	9,60	9,48	6,40	7,50
150	17	13	25	02	57	324	265	303	319	1.211	1.268	4,99	4,69	7,62	0,62
200	35	29	17	19	100	295	365	613	265	1.538	1.638	10,61	7,36	2,70	6,69
250	37	38	34	22	131	515	430	469	377	1.791	1.922	6,7	8,12	6,76	5,51
300	14	04	11	26	55	754	572	622	594	2.542	2.597	1,82	0,69	1,74	4,19

Obs: Incubação por 24 horas

R = Repetição

Tabela V. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus tereticornis* sob efeito de diferentes doses de cálcio.

Tratamento (ppm de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Número de Grãos			Germinação (%)
	Germinados	Não Germinados	Total	
0	158	1.822	1.980	7,98
110	164	1.186	1.350	12,15
220	494	1.958	2.452	20,15
330	150	2.033	2.183	6,87
440	211	2.317	2.528	8,35

Obs: Incubação por 18 horas

Tabela VII. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus tereticornis* e *Eucalyptus urophylla* sob diferentes métodos de extração.

Tabela VI. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus urophylla* sob diferentes doses de cálcio.

Tratamento (ppm de CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Número de Grãos									Total	Germinação (%)		
	Germinados				Não Germinados				Total		R ₁	R ₂	R ₃
	R ₁	R ₂	R ₃	Total	R ₁	R ₂	R ₃	Total					
0	66	53	80	199	597	414	499	1.510	1.709	10,59	11,35	13,82	
110	185	143	173	501	899	700	971	2.570	3.071	17,07	16,96	15,12	
220	86	147	136	369	382	554	777	1.713	2.082	18,38	20,97	14,90	
330	180	138	145	463	1.011	939	800	2.750	3.213	15,54	12,80	15,34	
440	98	116	56	270	487	340	369	1.196	1.466	16,70	25,40	13,18	

Obs: Incubação por 36 horas

Obs.: Incubação por 24 horas

R - Repetição

Tratamento: 1 - Pólen extraído em água e espalhado sobre o meio germinativo em solução aquosa.

2 - Pólen espalhado a seco sobre o meio germinativo com o auxílio da própria antera.

Tabela VII. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus tereticornis* e *Eucalyptus urophylla* sob diferentes métodos de extração.

Espécie	Tratamento	Número de Grãos										Total	Germinação (%)			
		Germinados					Não Germinados						R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Total	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Total					
<i>E. tereticornis</i>	1	217	264	265	313	1.059	473	609	367	388	1.837	2.896	31,45	30,24	41,93	42,88
	2	610	502	464	543	2.119	81	103	60	95	339	2.458	88,28	82,98	88,55	85,11
<i>E. urophylla</i>	1	3	5	2	5	15	760	846	524	646	2.776	2.791	0,39	0,58	0,38	0,77
	2	11	13	21	10	55	461	586	681	569	2.297	2.352	2,31	2,17	2,99	1,73

Obs.: Incubação por 24 horas

R = Repetição

Tratamento: 1 - Pólen extraído em água e espalhado sobre o meio germinativo em solução aquosa.

2 - Pólen espalhado a seco sobre o meio germinativo com o auxílio da própria antera.

Tabela VIII. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus camaldulensis* sob o efeito de extração com éter etílico e éter de petróleo.

Tratamento (extração)	Número de Grãos										Total	Germinação (%)			
	Germinados					Não Germinados									
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Total	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Total		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Testemunha (água)	19	93	52	37	201	322	346	336	291	1.295	1.496	5,57	21,19	13,40	11,28
Éter etílico	-	2	2	-	4	259	246	690	442	1.637	1.641	0,00	0,81	0,15	0,00
Éter petróleo	1	3	1	1	6	332	415	313	322	1.382	1.388	0,30	0,72	0,31	0,31

Obs: Incubação por 24 horas

R = Repetição

Tabela IX. Germinação (%) para o pólen de *Eucalyptus urophylla* extraído com acetona.

Tratamentos	Número de Grãos			Germinação (%)
	Germinados	Não Germinados	Total	
Testemunha (extração em água)	126	1.517	1.643	7,70
Acetona	4	1.417	1.421	0,28

Obs: Incubação por 18 horas

Tabela X. Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem.

Espécie	Tratamento	Número de Grãos										Germinação (%)				Comprimento do tubo polínico (μm)				Média	
		Germinados					Não Germinados														
		1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	1	2	3	4*		
<i>E. camaldulensis</i>	Câmara seca (22°C)	77	67	72	43	259	223	233	228	257	941	25,67	22,33	21,00	14,33	20,83	241,04	236,50	229,19	211,67	229,60
	Estufa (35°C)	54	83	122	29	288	246	217	178	271	912	18,00	27,67	40,67	9,67	24,00	232,09	203,02	142,19	204,79	195,52
	Estufa (40°C)	16	56	51	22	145	284	244	249	278	1.055	5,33	18,67	17,00	7,33	12,08	222,50	176,98	265,32	210,52	218,83
	Vácuo (temperatura ambiente)	68	80	72	91	311	232	220	228	209	889	22,67	26,67	24,00	30,33	25,92	233,02	255,31	226,77	270,63	246,43
	Testemunha (umidade inicial)	65	59	73	44	241	235	241	227	256	959	21,67	19,67	24,33	14,67	20,08	241,36	295,21	333,01	280,44	235,58
<i>E. grandis</i>	Câmara seca (22°C)	28	14	18	123	183	272	286	282	177	1.017	9,33	4,67	6,00	41,00	15,25	212,61	181,15	195,00	343,65	233,10
	Estufa (35°C)	37	72	27	74	210	263	228	273	226	990	12,33	24,00	9,00	24,67	17,50	220,52	329,86	219,90	227,61	249,47
	Estufa (40°C)	73	71	78	87	309	227	229	222	213	891	24,33	23,67	26,00	29,00	25,75	243,75	234,06	226,88	171,46	219,04
	Vácuo (temperatura ambiente)	37	17	13	47	114	263	283	287	253	1.086	12,33	5,67	4,33	15,67	9,50	208,02	176,88	168,75	198,65	188,08
	Testemunha (umidade inicial)	80	44	28	90	242	220	256	272	210	956	26,67	14,67	9,33	30,00	20,17	244,59	195,31	187,36	201,25	207,13
<i>E. tereticornis</i>	Câmara seca (22°C)	52	40	90	55	237	248	260	210	245	963	17,33	13,33	30,00	18,33	19,75	219,27	149,67	212,09	232,25	203,32
	Estufa (35°C)	38	97	93	95	323	262	203	207	205	877	12,67	32,33	31,00	31,67	26,91	193,36	219,29	191,67	228,99	208,33
	Estufa (40°C)	64	91	89	61	305	236	209	211	239	895	21,33	30,33	29,67	20,33	25,42	221,67	189,29	179,90	181,56	193,10
	Vácuo (temperatura ambiente)	144	88	131	91	454	156	212	169	209	746	12,00	29,33	43,67	30,33	28,83	303,64	224,79	-	212,17	183,20
	Testemunha (umidade inicial)	36	128	26	34	224	264	172	274	266	976	48,00	42,67	8,67	11,33	27,67	130,42	244,48	165,42	253,48	198,45
<i>E. urophylla</i>	Câmara seca (22°C)	24	15	43	34	116	276	285	257	266	1.084	8,00	5,00	14,33	11,33	9,67	163,86	181,46	195,52	180,42	180,32
	Estufa (35°C)	34	26	13	28	101	266	274	287	272	1.099	11,33	8,67	4,33	9,33	8,41	169,17	143,54	187,09	184,07	170,97
	Estufa (40°C)	6	10	14	14	44	294	290	286	286	1.156	2,00	3,33	4,67	4,67	3,67	136,36	172,82	166,15	160,21	158,89
	Vácuo (temperatura ambiente)	26	14	17	39	96	274	286	283	261	1.104	8,67	4,67	5,67	13,00	8,00	91,80	114,27	120,11	203,54	132,43
	Testemunha (umidade inicial)	27	27	32	15	101	273	273	268	285	1.099	9,00	9,00	10,67	5,00	8,42	240,11	239,88	265,01	247,71	248,18

* Repetições

Tabela XI. Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem.

Espécie	Tratamento	Número de Grãos										Germinação (%)				Comprimento do tubo polínico (μm)					
		Germinados					Não Germinados					Média				Média					
		1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	1	2	3	4*		
<i>E. camaldulensis</i>	Testemunha (sem secagem)	104	107	111	117	439	196	193	189	183	761	34,66	35,67	37,00	39,00	36,58	317,50	289,68	300,00	283,01	297,55
	Secagem em estufa (35°C)	101	113	135	119	468	199	187	165	181	732	35,67	37,67	45,00	39,67	39,50	367,39	344,06	278,22	295,31	321,25
	Secagem à vácuo	113	138	117	164	532	187	162	183	136	668	37,67	46,00	39,00	54,67	44,33	334,79	295,10	305,83	363,83	324,89
<i>E. grandis</i>	Testemunha (sem secagem)	31	36	40	20	127	269	264	260	280	1.073	10,33	12,00	13,33	6,67	10,58	158,44	182,82	203,54	211,25	189,01
	Secagem em estufa (35°C)	19	23	34	16	92	281	277	266	284	1.108	6,33	7,67	11,33	5,33	7,67	181,57	139,06	144,06	183,95	162,16
	Secagem à vácuo	33	41	37	19	130	267	259	263	281	1.070	11,00	13,67	12,33	6,33	10,83	173,13	101,63	152,81	231,56	164,78
<i>E. tereticornis</i>	Testemunha (sem secagem)	29	41	9	16	95	271	259	291	284	1.105	9,67	13,67	3,00	5,33	7,92	134,39	138,33	112,82	151,66	134,30
	Secagem em estufa (35°C)	44	67	131	78	320	256	233	169	222	880	14,67	22,33	43,67	26,00	26,67	209,01	135,63	257,87	166,15	192,17
	Secagem à vácuo	109	96	73	108	386	191	204	227	192	814	36,33	32,00	24,33	36,00	32,17	149,48	204,33	211,88	249,48	203,79
<i>E. urophylla</i>	Testemunha (sem secagem)	107	143	58	67	375	193	157	242	233	825	35,67	47,67	19,33	22,33	31,25	255,93	205,62	229,69	271,56	240,70
	Secagem em estufa (35°C)	144	96	57	88	385	156	204	243	212	815	48,00	32,00	19,00	29,33	32,08	213,33	207,50	185,62	272,71	219,79
	Secagem à vácuo	145	117	30	76	368	155	183	270	224	832	48,33	39,00	10,00	25,33	30,67	232,71	206,35	210,41	212,19	215,42

* Repetições

Tabela XII. Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem e armazenamento por um mês.

Espécie	Tratamento	Número de Grãos					Germinação (%)					Comprimento do tubo polínico										
		Germinados					Não Germinados					Média										
		1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	Média						
<i>E. camelotortosa</i>	#Freezer ¹ (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	2	32	1	1	36	298	268	295	299	1.164	0,67	10,67	0,33	0,33	3,00	137,51	247,44	175,59	71,62	158,04
		Secagem em estufa (35°C)	62	67	2	3	134	238	233	296	297	1.066	20,67	22,33	0,67	1,00	11,17	183,99	222,71	228,23	120,32	188,81
		Secagem à vácuo	104	58	111	84	357	196	242	189	216	843	34,60	19,33	37,00	28,00	29,75	222,29	194,06	218,75	204,17	209,82
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	0	9	3	0	12	300	291	297	300	1.188	0,00	3,00	1,00	0,00	1,00	-	143,99	198,96	-	171,48
		Secagem em estufa (35°C)	4	81	49	21	155	296	219	251	279	1.045	1,33	27,00	16,33	7,00	12,92	277,29	214,89	264,89	196,77	238,46
		Secagem à vácuo	131	91	113	60	395	169	209	187	240	805	43,67	30,33	37,67	20,00	32,92	224,48	254,16	228,23	188,65	223,88
<i>E. grandis</i>	#Freezer ¹ (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	10	8	36	16	70	290	292	264	284	1.130	3,33	2,67	12,00	5,33	5,83	129,08	146,36	218,44	157,40	162,82
		Secagem em estufa (35°C)	45	22	18	33	118	255	278	282	267	1.082	15,00	7,33	6,00	11,00	9,83	201,88	166,98	205,32	182,29	182,12
		Secagem à vácuo	26	40	20	36	122	274	260	280	264	1.078	8,67	13,33	6,67	12,00	10,17	243,86	168,55	223,65	236,56	218,16
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	6	0	0	1	7	294	300	300	299	1.193	2,00	0,00	0,00	0,33	0,58	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	40	37	29	44	150	260	263	271	256	1.050	13,33	12,33	9,67	14,67	12,50	169,27	178,86	242,39	172,40	190,73
		Secagem à vácuo	19	23	17	38	97	281	277	283	262	1.103	6,33	7,67	5,67	12,67	8,09	101,56	126,67	153,85	155,63	134,42
<i>E. tetralicoides</i>	#Freezer ¹ (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	0	2	5	7	14	300	298	295	293	1.186	0,00	0,67	1,67	2,33	1,17	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	28	35	5	59	127	272	265	295	241	1.073	9,33	11,67	5,00	19,67	11,42	205,00	213,33	132,50	244,59	198,93
		Secagem à vácuo	8	55	54	108	225	292	245	246	192	975	2,67	18,33	18,00	36,00	18,75	76,66	109,55	223,83	204,58	153,66
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	2	3	7	2	14	298	297	293	298	1.186	0,67	1,00	2,33	0,67	1,17	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	2	2	0	0	4	298	298	300	300	1.196	0,67	0,67	0,00	0,00	0,34	150,00	-	-	-	150,00
		Secagem à vácuo	0	3	10	5	18	300	297	290	295	1.182	0,00	1,00	3,33	1,67	1,50	-	-	-	-	-
<i>E. uruguayica</i>	#Freezer ¹ (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	7	3	1	5	16	293	297	299	295	1.184	2,33	1,00	0,33	1,67	1,33	120,63	134,17	-	148,13	141,15
		Secagem em estufa (35°C)	30	10	55	26	121	270	290	245	274	1.079	16,67	20,33	13,67	26,67	19,34	192,92	128,86	150,42	211,36	170,89
		Secagem à vácuo	50	61	41	80	232	250	239	259	220	968	10,00	3,33	18,33	8,67	10,08	188,13	152,81	103,65	149,16	148,44
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	7	1	3	0	11	293	299	257	300	1.189	2,33	0,33	1,00	0,00	0,92	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	54	33	23	34	144	246	267	277	266	1.056	18,00	11,00	7,67	11,33	12,67	163,75	159,90	128,13	157,30	152,27
		Secagem à vácuo	38	76	59	82	255	262	224	241	218	945	12,67	25,33	19,67	27,33	21,25	179,38	196,46	171,04	170,94	179,46

* Repetições

Tabela XIII. Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem e armazenamento por 2 meses.

Espécie	Tratamento	Número de grãos													Germinação (%)				Comprimento do tubo polínico				Média		
		Germinados				Não Germinados									Média				Média						
		1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	Total	1	2	3	4*	1	2	3	4*	1	2	3		4*	
<i>E. canadensis</i>	Testemunha (sem secagem)	3	16	11	19	49	297	284	289	281	1.151	1,00	5,33	3,67	6,33	4,08	43,75	94,79	111,11	94,03	85,92				
	Secagem em estufa (150C)	131	105	80	100	416	169	195	220	200	784	43,67	35,00	26,67	33,33	34,67	182,28	150,72	197,60	164,37	173,74				
	Secagem à vácuo	30	110	58	84	282	270	190	242	216	918	10,00	36,67	19,33	28,00	23,50	157,81	104,58	118,53	191,70	143,16				
	Testemunha (sem secagem)	0	0	0	17	17	300	300	300	283	1.183	0,00	0,00	0,00	0,00	5,67	1,42	-	-	131,24	131,24				
<i>E. grandis</i>	Secagem em estufa (150C)	143	129	9	120	401	157	171	291	180	799	47,67	43,00	3,00	40,00	33,42	210,41	200,10	365,97	176,14	238,15				
	Secagem à vácuo	57	92	73	78	300	243	208	227	222	900	19,00	30,67	24,33	26,00	25,00	158,96	162,91	191,66	188,43	175,49				
	Testemunha (sem secagem)	4	5	8	2	19	296	295	292	298	1.181	1,33	0,67	2,67	1,67	1,67	175,20	178,64	174,47	176,24	176,14				
	Secagem em estufa (150C)	6	12	8	9	35	294	288	292	291	1.165	2,00	3,00	2,67	4,00	2,92	189,47	166,16	208,33	226,97	197,73				
<i>E. tetradymia</i>	Secagem à vácuo	59	19	7	4	89	241	281	293	296	1.111	19,67	1,33	2,33	6,33	7,42	159,47	125,75	230,30	204,88	180,10				
	Testemunha (sem secagem)	0	1	0	0	1	300	299	300	300	1.199	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-				
	Secagem em estufa (150C)	14	8	5	6	33	286	292	295	294	1.167	4,67	2,00	1,67	2,67	2,75	164,79	175,51	229,26	202,05	192,90				
	Secagem à vácuo	36	25	9	13	83	264	275	291	287	1.117	12,00	4,33	3,00	8,33	6,92	213,22	153,85	274,58	228,95	217,65				
<i>E. tetradymia</i>	Testemunha (sem secagem)	7	1	3	0	11	293	299	297	300	1.189	2,33	0,33	1,00	0,00	0,92	146,42	-	265,62	-	206,02				
	Secagem em estufa (150C)	16	35	38	30	119	284	265	262	270	1.081	5,33	10,67	12,67	10,00	9,67	218,63	238,33	269,49	241,14	240,15				
	Secagem à vácuo	54	83	123	47	307	246	217	177	253	893	18,00	27,67	41,00	15,67	25,59	276,56	276,38	271,76	250,28	268,75				
	Testemunha (sem secagem)	0	2	2	0	4	300	298	298	300	1.196	0,00	0,67	0,00	0,00	0,17	-	99,99	-	99,99	-	99,99			
<i>E. wrightii</i>	Secagem em estufa (150C)	0	2	0	1	3	300	298	300	299	1.197	0,00	0,67	0,00	0,33	0,25	-	132,81	-	218,75	175,78				
	Secagem à vácuo	11	13	10	3	37	289	287	290	297	1.163	3,67	4,33	3,33	1,00	3,08	235,55	230,51	130,51	215,68	203,06				
	Testemunha (sem secagem)	12	1	1	36	50	288	299	299	264	1.150	4,00	0,33	0,33	12,00	4,17	101,73	58,03	58,33	183,04	100,28				
	Secagem em estufa (150C)	130	95	74	107	406	170	205	226	193	794	43,33	31,67	24,67	35,67	33,84	168,96	240,31	203,22	192,08	201,14				
<i>E. wrightii</i>	Secagem à vácuo	183	99	136	94	512	117	201	164	206	688	61,00	33,00	45,33	31,33	42,67	208,22	195,93	155,31	251,35	202,70				
	Testemunha (sem secagem)	9	1	0	0	10	291	299	300	300	1.190	3,00	0,33	0,00	0,00	0,83	81,55	56,25	-	68,90	-				
	Secagem em estufa (150C)	90	79	79	115	363	210	221	221	185	837	30,00	26,33	26,33	38,33	30,25	177,49	134,46	147,29	219,26	169,62				
	Secagem à vácuo	148	95	233	106	582	152	205	67	194	618	49,33	31,67	77,67	35,33	48,50	210,51	129,78	205,72	183,95	182,49				

* Injetiva

Tabela XIV. Germinação (%) e comprimento do tubo polínico (μm) para as diferentes espécies em função dos tratamentos de secagem e armazenamento por 3 meses.

Espécie	Tratamento	Número de Grãos					Germinação (%)				Comprimento do tubo polínico				Média							
		Germinados				Total	Não Germinados				Média	tubo polínico										
		1	2	3	4*		1	2	3	4*		1	2	3		4*						
<i>E. caradulensis</i>	#Freezer (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	0	0	0	0	0	300	300	300	300	1.200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	99	106	111	116	432	201	194	189	184	768	33,00	35,33	37,00	38,67	36,00	490,83	372,28	406,97	333,43	403,68
		Secagem à vácuo	120	80	145	170	515	180	220	155	130	685	40,00	26,67	48,33	56,67	42,92	461,56	321,35	442,42	327,08	388,10
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	0	0	0	0	0	300	300	300	300	1.200	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	48	97	76	109	330	252	203	224	191	870	16,00	32,23	25,33	36,33	27,47	404,26	310,51	413,22	287,69	353,02
		Secagem à vácuo	99	140	150	77	466	201	160	150	223	734	33,00	46,33	50,00	25,67	38,75	431,13	273,22	423,57	319,68	361,90
<i>E. grandis</i>	#Freezer (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	0	2	0	0	2	300	298	300	300	1.198	0,00	0,67	0,00	0,00	0,17	-	-	-	-	-
		Secagem em estufa (35°C)	12	23	26	20	81	288	277	274	280	1.119	4,00	7,67	8,67	6,67	6,75	274,62	310,39	282,28	339,68	301,74
		Secagem à vácuo	46	66	81	65	258	254	234	219	235	942	15,33	22,00	27,00	21,67	21,50	343,01	308,01	341,45	407,28	349,94
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	24	19	2	12	57	276	281	298	288	1.143	8,00	6,33	0,67	4,00	4,75	258,54	304,26	318,96	306,77	297,13
		Secagem em estufa (35°C)	0	12	73	7	92	300	288	227	293	1.108	3,67	4,00	24,33	2,33	8,58	249,06	279,78	346,24	380,92	314,00
		Secagem à vácuo	11	8	0	0	19	289	292	300	300	1.181	0,00	2,67	0,00	0,00	0,67	-	195,05	-	-	195,05
#Freezer (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	5	4	2	13	24	295	296	298	287	1.176	1,67	1,33	0,67	4,33	2,00	117,64	255,93	144,79	162,08	170,11	
	Secagem em estufa (35°C)	34	25	58	61	178	266	275	242	239	1.022	11,33	8,33	19,33	20,33	14,83	251,04	211,77	274,89	272,39	252,52	
	Secagem à vácuo	48	65	56	85	254	252	235	244	215	946	16,00	21,67	8,67	28,33	18,67	310,41	338,74	302,11	269,58	305,21	
Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	4	48	10	13	75	296	252	290	287	1.125	1,33	16,00	3,33	4,33	6,25	82,80	96,41	-	105,11	94,77	
	Secagem em estufa (35°C)	0	8	1	0	9	300	292	299	300	1.191	0,00	2,67	0,33	0,00	0,75	-	123,43	115,62	-	119,53	
	Secagem à vácuo	1	1	0	0	2	299	299	300	300	1.198	0,33	0,33	0,00	0,00	0,17	159,37	186,71	-	-	115,47	
<i>E. utopliifla</i>	#Freezer (-16°C)	Testemunha (sem secagem)	1	2	0	0	3	299	298	300	300	1.197	0,33	0,67	0,00	0,00	0,25	-	379,32	-	-	379,32
		Secagem em estufa (35°C)	89	81	84	101	355	211	219	216	199	845	29,67	27,00	28,00	33,67	29,59	223,43	257,81	210,41	362,18	263,45
		Secagem à vácuo	36	51	23	20	130	264	249	277	280	1.070	12,00	17,00	7,67	6,67	10,84	194,37	273,43	190,31	336,97	248,77
	Refrigerador (4°C)	Testemunha (sem secagem)	0	0	0	0	3	300	300	297	300	1.197	0,00	0,00	1,00	0,00	0,25	-	-	147,91	-	147,91
		Secagem em estufa (35°C)	54	8	47	98	207	246	252	253	202	993	18,00	2,67	15,67	32,67	17,25	227,80	172,91	211,76	327,39	247,46
		Secagem à vácuo	91	32	23	48	194	209	268	277	252	1.006	30,33	10,67	7,67	16,00	16,17	257,18	262,91	200,10	197,70	229,47

* Repetições