

## EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA VIABILIDADE POLÍNICA DE DIFERENTES CULTIVARES DE MAMONA.

**TAVARES, Vinícius R.S.<sup>1</sup>; BOBROWSKI, Vera L.<sup>2</sup>; FONSECA, Viviane B.<sup>3</sup>; DODE, Luciana B.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>UFPel, Biotecnologia (Bacharelado); <sup>2</sup>UFPel, IB. Endereço [vera.bobrowski@gmail.com](mailto:vera.bobrowski@gmail.com); <sup>3</sup>UFPel, Ciências Biológicas (Licenciatura); <sup>4</sup>UFPel, CDTec.

### 1 INTRODUÇÃO

Nos estudos pela busca de matéria-prima ideal para a produção de biodiesel, a Mamoneira (*Ricinus communis* L.) se destacou pela alta produtividade e em função do alto teor de óleo encontrado nas suas sementes que pode ser explorado industrialmente (JUSTO *et al.*, 2008). Botanicamente, a Mamoneira é uma oleaginosa dicotiledônea da família *Euphorbiaceae* se desenvolvendo em climas quentes como o característico do clima semi-árido brasileiro, porém no sul do país, apesar das condições climáticas frias, a mamoneira se adapta muito bem e com boa produtividade (AZEVEDO; LIMA, 2001; SILVA, 2009).

De acordo com Cuchiara *et al.* (2012) o armazenamento do grão de pólen para uso nos programas de melhoramento é requerido por várias situações, como a correção da não coincidência de florações, o intercâmbio com outros países ou outras regiões do país ou apenas para ser utilizado em cultivares de floração tardia. Para tanto é importante proporcionar-lhe condições ótimas, de forma a manter seu poder germinativo, vigor e integridade genética original.

O método de preservação em nitrogênio líquido surge como uma alternativa de preservação do pólen que, na temperatura de -196°C, terá seu metabolismo reduzido a quase zero, assim, a sua viabilidade seria, teoricamente, mantida por um tempo indefinido (SOUSA, 1990).

Para estimar a viabilidade do pólen existem quatro métodos: 1) Teste de germinação *in vitro*; 2) Avaliação com o uso de corantes; 3) Teste de germinação *in vivo*; 4) Avaliar a formação de sementes após polinização normal. Os dois primeiros são os mais acessíveis de serem realizados em um laboratório, porém, considera-se que o método do corante superestima a porcentagem de germinação enquanto o método de germinação *in vitro* subestima (GALLETA, 1983)

O presente estudo objetivou comparar os efeitos das baixas temperaturas na viabilidade polínica em diferentes cultivares de Mamona, e diferentes tempos de criopreservação, utilizando dois diferentes testes de avaliação da viabilidade polínica.

### 2 METODOLOGIA

No presente estudo, foram criopreservados polens de três diferentes cultivares de Mamona (CNPAM, BRS-Energia e CPACT 040) durante 30 dias, com avaliações da viabilidade nos dias zero (controle), 15 e 30, com o uso do corante azul de tripan para diferenciar células viáveis de não-viáveis. As cultivares utilizadas foram cedidas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS no ano de 2012.

Foram coletadas de forma aleatória inflorescências das três cultivares e mantidas no laboratório em água destilada à temperatura ambiente sobre papel vegetal. No dia seguinte, o pólen foi coletado de inflorescências recém abertas com auxílio de um pincel.

Para o teste com corante, um criotubo de cada cultivar foi avaliado fresco como controle, enquanto os outros foram submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido, numa temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  durante 30 dias, com avaliações aos 15 e 30 dias.

A avaliação da viabilidade polínica do teste de corante foi feita pela coloração com azul de tripan, que colore o pólen inviável, devido a sua capacidade de penetrar nas células mortas. O pólen fresco foi transferido para uma lâmina de microscopia, acrescido uma gota de corante e coberto com lamínula, para posterior observação em microscópio ótico com aumento de 40x. Foram realizadas quatro lâminas/tratamento, sendo contados 100 polens por lâmina totalizando 400 polens por tratamento. Cada lâmina contou como uma repetição, com um total de quatro repetições. Para os polens congelados, os criotubos foram descongelados a temperatura ambiente (TA) por uma hora antes da visualização.

O pólen da variedade BRS-Energia também foi testado com avaliações de teste de germinação *in vitro* aos 15, 30 e 60 dias.

A avaliação da viabilidade do pólen pelo teste de germinação *in vitro* foi realizado utilizando-se meio de cultura constituído de 10g de sacarose, 1g de ágar para 100 ml de água destilada e  $4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido bórico, com pH ajustado para 6, os quais foram aquecidos para total diluição do ágar. Ainda quente, o meio foi distribuído em lâmina escavada de Kline com doze poros. O pólen foi polvilhado sobre o meio frio com um pincel.

O pólen criopreservado foi descongelado a TA e avaliado após 24 horas de cultivo. A contagem de grãos de pólen germinados foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes, onde foram considerados como germinados aqueles que apresentassem tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen num total de 100 polens/cavidade da placa. Cada cavidade foi considerada uma repetição, com um total de seis repetições.

O delineamento estatístico foi inteiramente casual, em arranjo fatorial 3x3 (3 cultivares x 3 tempos em baixa temperatura) para o teste com corante e 1x3 (1 variedade x 3 tempos em baixa temperatura) para o teste de germinação *in vitro* e a comparação das médias pelo teste de Duncan pelo programa SANEST (ZONTA *et al.*, 1984).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De posse dos resultados, observou-se que não houve diferença estatística entre os tempos de congelamento dentro da mesma cultivar, Isto é, para a cultivar CNPAM, quando utilizamos o teste de corante não houve diferença estatística aos 0, 15 ou 30 dias de congelamento obtendo-se uma viabilidade de 52,3; 63 e 67,3% respectivamente. Já para a cultivar BRS Energia os valores foram de 34, 35,3 e 46% enquanto para cv. CFACT 040 os valores foram de 29; 31,3 e 35% respectivamente. Com o teste de viabilidade polínica podemos observar que o nitrogênio líquido mantém a viabilidade do pólen para posterior uso nos programas de melhoramento.

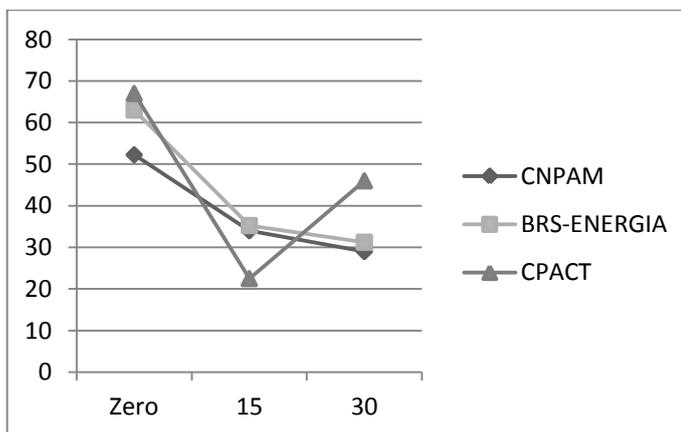
Quando analisamos as diferentes cultivares dentro de cada tempo de congelamento observamos diferenças estatísticas entre cultivares, onde na

contagem inicial com pólen fresco a cultivar CNPAM apresentou maior viabilidade polínica com 52,3% diferindo estatisticamente da cv CPACT 040 com 29% de viabilidade polínica enquanto a BRS Energia com 34% não diferiu das demais.

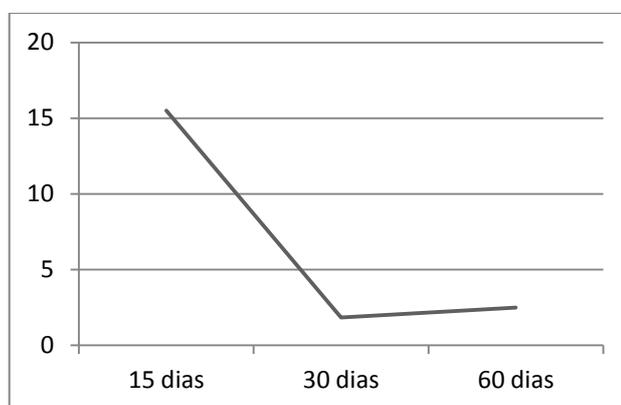
Aos 15 e 30 dias de conservação em nitrogênio líquido foi observada uma diferença estatística apenas entre a CNPAM e as cvs BRS Energia e a CPACT 040. (Fig. 1)

No teste de germinação *in vitro*, os resultados se mostraram mais baixos em relação ao teste de coloração. Na avaliação do 15º dia, o pólen de BRS-Energia mostrou viabilidade de 15,5%, no dia 30 de 1,83% e, por fim, no dia 60 de 2,5%. (Fig. 2)

No teste de germinação *in vitro*, houve um grande decréscimo na viabilidade polínica em relação com o tempo de armazenamento no nitrogênio. Ao observar os resultados obtidos entre os dois testes de viabilidade polínica para a cultivar BRS-Energia, percebe-se uma grande diferença de resultados, com os números do corante sendo altamente superiores aos de germinação *in vitro*, confirmando que a avaliação por corante superestima a viabilidade, enquanto a germinação *in vitro* subestima conforme descrito por Galleta.



**Figura 1** – Número médio da porcentagem de pólen de mamoneiro viável testado com corante azul de tripan após período de preservação em nitrogênio líquido de zero, 15 e 30 dias (representado pelo eixo y), com as cultivares CNPAM, BRS-Energia e CPACT em função do tempo de armazenagem (representado pelo eixo x). UFPel, 2012.



**Figura 2** – Número médio da porcentagem de pólen de mamoneiro da cultivar BRS-Energia viável testado em germinação *in vitro* após 24 horas em meio MS com 1% em 15, 30 e 60 dias.

de sacarose, 0,1% de ágar e 4mg.L<sup>-1</sup> de ácido bórico (representado pelo eixo y) em função do tempo (representado pelo eixo x). UFPel, 2012.

#### 4 CONCLUSÃO

A criopreservação mantém a viabilidade polínica para posterior uso em programas de melhoramento. A metodologia utilizada para avaliação da viabilidade polínica pode superestimar bem como subestimar os valores reais de viabilidade.

#### 5 REFERÊNCIAS

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

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

CUCHIARA, Cristina C.; SILVA, Sérgio D. A.; BOBROWSKI, Vera L. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Rev. Ceres**. Viçosa. v. 59, n.1. p. 82-87. jan/fev, 2012.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (ed.) **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.

JUSTO, Patrícia S.; CUCHIARA, Cristina C.; SILVA, Sérgio D. A.; BOBROWSKI, Vera L. Análise da viabilidade do pólen de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidas à radiação gama. In: **III CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA**, Salvador, Bahia. 2008.

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

SOUSA, Valderês A. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 21, p15-19, dez. 1990.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.D. & SILVEIRA JÚNIOR. P. **Sanest: Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Registrado na secretaria especial de informática sob número 066060 – categoria A. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 1984.