UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Curso de Ciências Biológicas Licenciatura

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise da viabilidade polínica de três espécies de plantas medicinais nativas do RS

Rejane Peter

Pelotas, 2015.

Rejane Peter

Análise da viabilidade polínica de três espécies de plantas medicinais nativas do RS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Vera Lucia Bobrowski

Pelotas, 2015.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P478a Peter, Rejane

Análise da viabilidade polínica de três espécies de plantas medicinais nativas do RS / Rejane Peter. – 40f. : il. - Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador Vera Lucia Bobrowski.

1.Biologia. 2.Asteraceae. 3.Melhoramento genético. 4.Influência da temperatura. 5.Extração exploratória. 6.Celastraceae. I.Bobrowski, Vera Lucia. II.Título.

CDD: 581.634

Dedico este trabalho, esta parte de minha vida, de quando aprendi a amar as plantas à minha orientadora Dra. Vera Lucia Bobrowski.

Agradecimentos

A Deus, por minha existência e cada realização de um sonho.

Aos meus pais, Ilmar e Arlinda Peter pelo amor incondicional, ajuda e incentivo.

As minhas queridas irmãs Graceane, Cristiane, Letícia e meus sobrinhos: Bruna, Vitória,Leandra, Lara, Leandro, Lucas, Lauren, Matheus, Manuela e á meu cunhado Juca pelo carinho, compreensão e incentivo que me fazem continuar sempre.

A minha orientadora Dra. Vera Lucia Bobrowski, pelo apoio, por ter acreditado em mim, e por essa enorme generosidade. Foste essencial em minha formação pessoal e profissional, será sempre um exemplo a ser seguido em minha vida.

A Beatriz Helena Rocha Gomes, uma professora, amiga, parceira; que eu tenha um terço da tua alegria e disposição.

As minhas colegas e amigas, Débora B. Dutra e Taís Madeira, vocês foram meu porto seguro ao longo destes anos.

Aos meus colegas e amigos do LabGen, Marcela, Mônica, Alison, Isabel, Maíra, Gustavo, Milene e meu “filho” Henrique, pela ajuda e incentivo. Vocês foram responsáveis por dias mais amenos e muitas risadas.

Aos meus colegas, pelo apoio e pelas lembranças alegres que levarei deste tempo.

A Iara Valquide Oliveira, Tângela Perleberg, Álvaro Martins, Gládis Aver e Paulo Romeu, Edison Zefa, Cristiano Agra Iserhard e César J. Drehmer pelo tempo e trabalho dedicados ao meu aprendizado e pela motivação e força nos momentos de indecisão.

Aos meus colegas do centro cirúrgico, pelo apoio e incentivo a mim despendido.

Aos meus professores pelo privilégio de termos compartilhado esse período de aprendizagem.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que este momento se concretizasse, meus mais sinceros agradecimentos.

Obrigada.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência,

e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é

preciso dominar a força, mas a razão. É preciso

antes de mais nada, querer."

(Amyr Klink)

Resumo

PETER, Rejane. **Análise da viabilidade polínica de três espécies de plantas medicinais nativas do RS**. 40 pag., 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Este trabalho foi realizado com objetivo de selecionar condições de pH, temperatura e meio de cultura ideais para germinação de grãos de pólen *in vitro* de marcela (*Achyrocline satureioides*), carqueja (*Baccharis trimera*) e espinheira santa *(Maytenus ilicifolia*) com finalidade de estabelecer os parâmetros adequados para estas espécies, bem como os corantes mais eficientes para avaliar a viabilidade polinica. Foram testados os corantes carmim propiônico 1%, carmim acético 2%, alexander, *Trypan blue* e orceína 2%, utilizando-se flores em antese de 10 inflorescências de cada espécie estudada, utilizadas 5 anteras de cada flor por lâmina. As anteras foram maceradas sobre lâmina, coradas e visualizado sob microscopia óptica com aumento de 400X; utilizando-se 6 lâminas para cada corante. Os grãos foram classificados como viáveis e inviáveis de acordo com a indicação técnica para os diferentes corantes. A variação foi analisada pelo método ANOVA e a comparação de médias foi efetuada através do teste de Tukey a 1% de probabilidade. Para germinação *in vitro* foram realizados três experimentos testando-se diferentes parâmetros: pH (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), temperatura (20, 25 e 30ºC) e meio de cultura. Para selecionar as melhores condições de temperatura e pH foi utilizado meio básico com água, agar ($1gL^{-1}$) e sacarose ($10gL^{-1}$). Após a determinação das condições de pH e temperatura foram testados o meio básico e o meio básico suplementado com ácido bórico ($500mgL^{-1}$). Em todos os experimentos o meio de cultura foi aquecido até total diluição do ágar e os valores de pH ajustados. Os meios foram distribuídos em lâminas escavadas de Kline com doze poros, o pólen foi disperso na superfície, incubados nas diferentes temperaturas a serem testadas e as avaliações realizadas 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 24 horas após a inoculação pela contagem de grãos germinados. Foram contados 100 pólens/cavidade e quatro repetições por tratamento. Para os resultados de viabilidade polínica pelo método colorimétrico observou-se alta taxa de pólens funcionais com os corantes nucleares, sendo os maiores valores obtidos com carmim acético. No experimento para germinação *in vitro* podemos observar que o pH para germinação *in vitro* dos três gêneros foi baixo, sendo que no meio com pH 5 tivemos o melhor percentual de germinabilidade para marcela enquanto que para carqueja e espinheira santa foi no pH 6. Para os três gêneros a temperatura ideal observada foi de 30°C assim como o meio de cultivo básico. No entanto, as três espécies *Achyrocline satureioides*, *Baccharis trimera* e *Maytenus ilicifolia* apresentaram baixa porcentagem de pólens viáveis *in vitro,* diferente dos valores obtidos pelo método colorimétrico.

Palavras-Chave: Asteraceae; melhoramento genético; influência da temperatura; extração exploratória; Celastracea

Abstract

PETER, Rejane. **Pollen viability analysis of three species of native medicinal plants of the RS.** 40 pp., 2015. Work Completion of course (Graduation in Biological Sciences), Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2015.

This work was conducted to select pH conditions, temperature and means of ideal culture for germination of pollen grains in vitro Marcela (*Achyrocline satureioides*), carqueja (*Baccharis trimera*) and espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) in order to establish the appropriate parameters for these species as well as the most efficient dyes to evaluate pollen viability. The propionic carmine dye were tested 1%, 2% Acetic Carmine, Alexander, Trypan blue and 2% orcein, using flower anthesis 10 inflorescences of each test species used 5 anthers of each flower per slide. The Panthers were ground on a slide, stained and viewed under light microscope with magnification of 400X; using blades 6 for each dye. The grains were classified as viable and non-viable according to the technique indicated for the different dyes. The variation was analyzed by ANOVA and the comparison of means was performed by Tukey test at 1% probability. For in vitro germination experiments were carried out by testing different parameters: pH (5.0; 6.0; 7.0 and 8.0), temperature (20, 25 and 30 ° C) and culture medium. To select the best pH and temperature conditions, a medium with basic water, agar ($1gL^{-1}$) and sucrose ($10gL^{-1}$). After the determination of pH and temperature conditions were tested basic medium and the basic medium supplemented with boric acid ($500mgL^{-1}$). In all experiments the culture medium was heated until complete agar dilution and the pH adjusted. The media were distributed into twelve wall excavated plate Kline, pollen were dispersed on surface incubated at different temperatures to be tested and evaluations carried out 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6 and 24 hours after inoculation the sprouted grain counting. They were counted 100 pollen / cavity and four replicates per treatment. For the results of pollen viability by colorimetric method observed high rate of functional pollen with nuclear dyes, with the highest values obtained with acetic carmine. In the experiment for germination in vitro we observed that pH for germination in vitro of three genera was low, and in the medium with pH 5 had the best percentage of germination for marcela while for carqueja and espinheira santa was at pH 6. For three genera optimum temperature observed was 30° C as well as the basic culture medium. However, the three species satureioides Achyrocline, trimera and Maytenus Maytenus Baccharis showed low percentage of viable pollen in vitro, different from the values obtained by the colorimetric method.

Keywords: Asteraceae; genetical enhancement; influence of temperature; Exploratory extraction; Celastracea

Lista de Figuras

Figura 1 Organização do experimento de germinação *in vitro.* A) Microondas para diluição do meio de cultivo*;* B) Flor de *Maytenus ilicifolia*; C) flor de *Maytenus ilicifolia*; D) meio de cultivo em placa escavada; E) BOD: 20, 25 e 30°; F) Caixa de Gerbox com papel germiteste para meio de cultivo em BOD.....22

Figura 2 Pólens corados de *Baccharis* Spp. e *Achyrocline* Spp.(Less).: A) Pólen viável corado com carmim propiônico; B) Pólen viável corado com azul de trypan; C) Pólen viável corado com orceína; D) Pólen viável corado com reativo de alexander; E) Pólen viável com carmim acético.....25

Figura 3 Pólens corados de *Maytenus ilicifolia* (Mart): A) pólen viável corado com orceína; B) pólen viável (roxo no meio) e inviável (verde) corado com alexander; C) pólen viável (mais azul) inviável (mais transparente) corado com *Trypan Blue*; D) pólen viável (roxo) e inviável (transparente no meio) corado com carmim acético.....27

Figura 4 Germinação in vitro de pólen de *Maytenus ilicifolia*. A) grão de pólen germinado; B) grão de pólen germinado; C) grão de pólen estourado; D) grãos de pólen germinados.....28

Lista de Tabelas

Tabela 1 Percentagem de viabilidade polínica de inflorescências coletadas em diferentes meses de marcela (*Achyrocline* satureioides) e carqueja (*Bacharis trimera*) analisadas utilizando-se cinco corantes diferentes.....24

Tabela 2 Percentagem de viabilidade polínica de inflorescências coletadas em diferentes acessos no mês de setembro de 2015 de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) analisadas utilizando-se quatro corantes diferentes.....26

Tabela 3 Percentual de germinação dos grãos de polens cultivados em meio de cultivo sem e com boro submetidos a diferentes condições de pHs e temperaturas. 31

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....13
1.1Objetivo 15
1.1.1Objetivo Geral 15
1. 1.2 Objetivos Específicos 15
2 REVISÃO DE LITERATURA 16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....20
3.1 Coletas de Material Botânico.....20
3.2 Metodologia.....20
3.2.1. Experimentos realizados com diferentes corantes para análise de viabilidade polínica:.....20
3.2.2. Experimentos de pH ideal de germinação:.....21
3.2.3. Experimento de temperatura ideal de germinação de germinação: 21
3.2.4. Experimentos de diferentes composições dos meios de cultura:.....21
3.3 Análise Estatística 22
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 23
4.1. Análise da viabilidade polínica pelo método colorimétrico.....23
4.2. Análise da viabilidade polínica através da germinação in vitro de pólen 28
5. CONCLUSÃO.....32
6. REFERÊNCIAS.....33

1. INTRODUÇÃO

O Brasil reúne a flora mais diversificada do mundo, são cerca de 100 mil espécies das quais 70 mil apresentam princípios ativos de interesse farmacológico (MICHALAK, 1997). Frente a esta diversidade, cientistas e empresários de grandes laboratórios de todo o mundo tem voltado seus interesses para o Brasil. Porém, a disseminação do uso medicinal de algumas plantas tem resultado em um intenso extrativismo, colocando em risco de extinção várias espécies nativas, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasmas valiosos, cujo potencial farmacêutico e químico nunca será estudado (FRANÇA, 2002).

Quase todas as plantas medicinais nativas do Brasil ainda não são cultivadas, e se encontram em estado selvagem, crescendo espontaneamente, cujo manejo é apenas o extrativismo. Portanto é preciso entender o processo agrícola para o cultivo destas plantas.

Uma idéia comum é que, se a planta cresce espontaneamente, então também é fácil seu desenvolvimento sob cultivo. Este conceito não é correto, pois a variabilidade genética existente entre os indivíduos de uma população selvagem gera inúmeros problemas técnicos que, se não impossibilitam, aumentam as dificuldades de cultivo. Dessa forma, o entendimento técnico sobre os processos meióticos, formação de grão de pólen, viabilidade polínica e formação de sementes ou mudas fazem parte dos conhecimentos técnicos básicos necessários sobre plantas nativas (MONTANARI, 2002).

À expansão do mercado de plantas medicinais vem causando uma descontrolada devastação das populações das espécies de interesse em ambientes naturais, uma vez que a exploração é, na maioria dos casos, baseada quase que exclusivamente no extrativismo. Neste sentido, um dos pontos importantes a ser estudado refere-se ao pólen e, até o momento, para espécies medicinais nativas não são conhecidas às condições adequadas para testes de viabilidade (FREITAS, 2013).

Em plantas que se reproduzem por sementes, a dupla fertilização é uma etapa muito importante. Na dupla fertilização um núcleo espermático irá se fundir com a oosfera e originar o embrião e o outro núcleo irá se fundir com os núcleos polares dando origem ao endosperma (RUSSEL, 1992). Entretanto é necessário que os grãos de pólen estejam viáveis no momento da polinização, pois o mesmo terá que atingir o estigma receptivo (DAFNI, 1992).

A estimativa da viabilidade do grão de pólen permite inferir sobre a capacidade de germinação e desenvolvimento dos grãos de pólen, sendo importante destacar que estádio de desenvolvimento da flor, a coleta e condições de armazenamento do grão de pólen influenciam sua viabilidade (STANLEY; LINSKENS, 1974).

De acordo com Galetta (1983), a viabilidade polínica pode ser estimada por quatro principais métodos: germinação *in vitro*, métodos colorimétrico, germinação *in vivo* e porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste.

A utilização de corantes para estimar a viabilidade polínica é o método mais rápido e geralmente o mais utilizado por pesquisadores. Entretanto, neste método a viabilidade pode ser superestimada, pois algumas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ser corados, devido à presença suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias (RODRIGUEZ- RIANO; DAFNI, 2002).

Dados sobre a viabilidade e o desenvolvimento de grãos de pólen são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético de plantas medicinais nativas do Brasil, pois permitem maior segurança nos cruzamentos, que são realizados com a finalidade de gerar novos híbridos e/ou aumentar a viabilidade. Várias pesquisas têm sido conduzidas a fim de estabelecer e padronizar meios decultura e condições ambientais para avaliar a viabilidade de pólen em diversas espécies (NUNES et al., 2001).

A germinação *in vitro* é o método mais utilizado em testes de viabilidade de pólen em programas de melhoramento genético (MARCELLÁN; CAMADRO, 1996). Entretanto, este método é influenciado por diferentes fatores. Existem diferenças entre espécies quanto às condições exigidas envolvendo, principalmente, os constituintes do meio de cultura, a temperatura, o pH e o tempo de incubação. Além disso, a viabilidade do pólen também é influenciada pelo estádio de desenvolvimento

da flor quando da coleta do pólen, e pelas condições de armazenamento (STANLEY; LINSKENS, 1974).

Munhoz et al. (2008) compararam a viabilidade polínica no genótipo de mamão, utilizando métodos colorimétricos (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazolio (TTC), solução de alexander, carmin acético, lugol e Sudan IV) e de germinação *in vitro*. Segundo os autores, o teste utilizando TTC forneceu estimativa de viabilidade (67,5%) próxima ao teste de germinação *in vitro* (65%) sendo, portanto, ambos utilizados para que se estime a viabilidade.

Esta aproximação entre métodos colorimétricos e germinação *in vitro* é o ideal para estimar com maior exatidão a viabilidade polínica.

1.1Objetivo

1.1.1Objetivo Geral

Esta pesquisa tem por objetivo geral testar diferentes métodos para análise da viabilidade polínica das plantas medicinais marcela (*Achyrocline satureioides*), carqueja (*Baccharis trimera)* e espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*).

1. 1.2 ObjetivosEspecíficos

- Comparar a viabilidade polínica das plantas medicinais selecionadas utilizando diferentes corantes;
- Analisar o efeito de diferentes temperaturas na germinação *in vitro* dos grãos de pólen das plantas medicinais testadas;
- Selecionar condições de pH ideal para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen das plantas medicinais testadas.
- Avaliar o efeito do boro sobre a germinação *in vitro* de pólen das plantas medicinais testadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O potencial econômico de espécies medicinais nativas no Brasil é grande, tanto que estas espécies são consideradas uma riqueza a ser preservada e utilizada, porém se faz necessário conservar a diversidade genética vegetal disponível. Para garantir o uso adequado dos recursos medicinais nativos de um país, são indispensáveis estudos de caracterização do germoplasma de uma espécie e também propiciar que as mesmas sejam incluídas em um programa de melhoramento genético (HEIDEN et al, 2006; PEREIRA et al, 2006).

Dentre as espécies medicinais nativas do estado do Rio Grande do Sul com potencial econômico e muito utilizadas na medicina popular no tratamento de distúrbios gástricos estão a marcela, a carqueja e a espinheira-santa.

A marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., da família Asteraceae, é um vegetal silvestre e anual, propagando-se geralmente em solos degradados e tem seu uso medicinal para o tratamento caseiro de problemas digestivos e intestinais. Bezerra et al. (2003) relataram que ao longo da fase reprodutiva há produção simultânea de capítulos em diferentes estágios de desenvolvimento (botão floral, capítulos verdes, maduros e secos), caracterizando-se como uma espécie de maturação desuniforme e, portanto, de difícil cultivo agrícola.

A carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC., da família Asteraceae, por ser uma planta dióica, apresenta algumas dificuldades para a produção de mudas via sementes. Além da variabilidade genética resultante da fecundação cruzada, há uma demora na formação das mudas (CASTRO; FERREIRA, 2000) o que dificulta seu uso como planta cultivada. A carqueja é muita usada na farmacopéia popular, atribuindo-se a ela várias propriedades, especialmente a de estimular o sistema digestivo, para combater gripes, febre, problemas intestinais, diabetes, impotência, entre outros (CRUZ, 1962; BALBACH, 1963).

Outra espécie muito utilizada, a *Maytenus ilicifolia (Mart.)* popularmente conhecida como "espinheira-santa", "cancerosa", "cancorosa-de-sete-espinhos" e "maiteno", dentre outros nomes (LORENZI; MATOS, 2002; BRANDÃO et al., 2006),

pertencente à família Celastraceae, possui 55 gêneros e 850 espécies espalhadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No contexto brasileiro, onde seu crescimento é nativo, a espécie *M. ilicifolia* é largamente utilizada na medicina popular (MOSSI et al., 2004). O uso medicinal de *M. ilicifolia* é datado da década de 20 desde quando se tem algum registro escrito de sua utilização (CUNHA et al., 2003). Populações com alta densidade de *M. ilicifolia* têm sido observadas, frequentemente, ocupando pequenas áreas em ambientes de mata ciliar ou de afloramentos de rochas (KLEIN, 1968; ITCF, 1985; CERVI et al., 1989; STEENBOCK, 2003). Apresenta uma significativa plasticidade ambiental, desenvolvendo-se sobre diversas condições de fertilidade e regime hidromórfico de solos e sob distintos ambientes lumínicos (RADOMSKI; BULL, 2010), porém com pouco estudo da sua biologia floral.

Grande parte dos trabalhos realizados em espécies medicinais nativas é sobre seus princípios ativos, mas poucos estudos foram realizados em relação ao seu sistema de cultivo, propagação e principalmente sobre viabilidade de grãos de pólen.

A viabilidade do grão de pólen, que é uma medida de fertilidade masculina, pode ser determinada por método direto, com uso de técnicas de indução da germinação *in vitro* (PIO et al., 2007) ou *in vivo* (FERREIRA et al., 2007) e por método indireto baseado em parâmetros citológicos, como a coloração (COLAS, MERCIER, 2000). No emprego da coloração, é frequente o uso de corantes nucleares como carmim acético e azul de anilina, os quais colorem apenas pólens funcionais.

Apesar de ser um procedimento simples e de baixo custo, não reflete a capacidade de germinação no caso de grãos de pólen viáveis com exina espessa e/ou mucilaginosa, que não se colorem e ocasionam subestimativas (ALEXANDER 1983, 1980), assim como, no caso de grãos de pólen que se colorem, mesmo sendo incapazes de germinar, por problemas no desenvolvimento do tubo polínico, ocasionando superestimativa da viabilidade do pólen (GALLETA, 1983).

A germinação dos grãos de pólen *in vitro* é um dos métodos que permite verificar a sua fertilidade (viabilidade), sendo de grande importância em programas de melhoramento de frutíferas e espécies ameaçadas de extinção ou em status de

vulnerabilidade, como algumas plantas nativas da região sul do Brasil. O método geral consiste em germinar uma pequena amostra em um meio de cultura apropriado e observar em microscópio, após um determinado período, a porcentagem de grão de pólen que desenvolvem o tubo polínico. A maior parte dos tubos polínicos tem seu crescimento interrompido antes de obter o tamanho normalmente alcançado no estigma. A composição do meio e o pH estão entre os fatores que afetam a sua germinação.

A análise da viabilidade polínica através da germinação *in vitro* utiliza meio de cultura para determinar o desenvolvimento do tubo polínico, onde a composição do meio, a temperatura e o pH estão entre os fatores que afetam sua germinação. O pólen das angiospermas precisa de uma fonte de carbono, de boro e frequentemente de outros nutrientes para promover a sua germinação (GALLETA, 1983).

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

A adição de ácido bórico, de um modo geral, aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (ALMEIDA et al., 1987). O boro juntamente com o cálcio são elementos essenciais para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro* (BREWBAKER; KWACK, 1963).

Pio et al. (2004), em algumas cultivares de *Citrus*, observaram que o boro na concentração de 200 mg L^{-1} estimula a germinação de grãos de pólen das cultivares Pêra e Natal. Silva et al. (1999) concluiram que 200 mg L^{-1} de ácido bórico forneceu as melhores condições para germinação dos grãos de pólen do maracujazeiro amarelo. Almeida et al. (1987), trabalhando com grãos de pólen de algodão mostraram que 300 mg L^{-1} de ácido bórico obteve maior porcentagem de germinação. A germinação de grão de pólen de citros, na ausência de boro resulta

em maior rompimento das membranas do tubo polínico, liberando o conteúdo citoplasmático para o meio exterior (Pio et al., 2004).

É sabido que temperaturas altas ou baixas podem causar danos em todas as fases de desenvolvimento da planta (ZINN et al. 2010) com especial referência a fase reprodutiva. O estresse devido à alta ou baixa temperatura pode reduzir a produção de sementes, também pode ocorrer à falta de sincronismo no desenvolvimento de órgãos reprodutivos (HERRERO, 2003; HEDHLY et al. 2008), defeitos na estrutura e na função dos tecidos da corola, dos carpelos (HEDHLY, 2011). Altas temperaturas podem afetar a quantidade e morfologia do pólen, bem como sua composição química, o metabolismo do grão de pólen, a viabilidade polínica, a capacidade de germinação e o crescimento do tubo polínico (HEDHLY et al. 2008).

As altas temperaturas também aceleram o desenvolvimento do gametófito feminino, estigma e óvulo, reduzindo o tempo de receptividade ao grão de pólen, por outro lado das baixas temperaturas desaceleram o desenvolvimento do gametófito feminino prolongando a receptividade do estigma e a longevidade dos óvulos (HEDHLY et al. 2003; CEROVIC et al. 2000).

O cálcio adicionado ao meio de cultura para germinação de grãos de pólen propicia características fisiológicas como tubo polínico e grãos de pólen de menor sensibilidade a variações do meio básico, com menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do mesmo com forma linear e aparência rígida (BHOJAWANI; BHATNAGAR, 1974). Brewbaker e Kwack (1963), trabalhando com 86 espécies e 39 famílias, mostraram que a adição de cálcio e boro atuam como um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro.*

Em trabalho sobre germinação de grãos de pólen de três cultivares de citros, após um período de um ano de armazenamento, Sahar e Spiegellroy (1980), estimularam a germinação utilizando ácido bórico e cálcio. Silva et al. (1999), constatou que o melhor meio para a germinação de pólen de maracujazeiro é composto por 50gL^{-1} de sacarose; 0,2gL^{-1} de ácido bórico e 1,0gL^{-1} de nitrato de cálcio. Tunstra e Wendel (2000), em experimentos com sorgo observaram que em meio de cultura contendo 0,9M de sacarose, 2,43mM de ácido bórico e 2,12mM de nitrato de cálcio a germinação de grãos de pólen foi aumentada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coletas de Material Botânico

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética, do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas. Para realização dos ensaios foram utilizadas amostras de acessos de pólen de espinheira santa, do Banco Ativo de Germoplasma de Espinheira Santa da Embrapa Clima Temperado/ IFSUL, Campus Pelotas Visconde da Graça, Pelotas, Rio Grande do Sul (RS), coletadas flores em estádio de antese. As flores em antese de Carqueja e Marcela foram coletadas no Campus Capão do Leão, UFPEL, conforme período de floração da espécie.

3.2 Metodologia

3.2.1 Experimentos realizados com diferentes corantes para análise de viabilidade polínica

Foram utilizados flores de 10 inflorescências de cada espécie estudada, e utilizadas 5 anteras de cada flor por lâmina. Nas espécies *Achyrocline satureioides* e *Baccharis trimera*, foi necessário a retirada da flor de sua inflorescência em capítulos, e a utilização de uma agulha 40x12mm para retirada das anteras sob visualização em esteromicroscópio com aumento de 10x. Após retiradas, as anteras foram maceradas sobre lâmina com bastão de vidro e coradas com diferentes corantes: carmim propiônico 1%, carmim acético 2%, solução de alexander, solução de *Trypan Blue*® e orceína acética 2%. Após a maceração foi colocada uma lamínula e visualizado sobre microscopia óptica com aumento de 400X. Foram feitas seis repetições para cada corante.

Os grãos foram classificados como viáveis e inviáveis de acordo com a indicação técnica para os diferentes corantes. Foram contados aleatoriamente um número de 100 grãos de pólen.

A viabilidade dos grãos de pólen de marcela e carqueja foi avaliada mensalmente de março a junho de 2015. Para a espinheira santa, foram utilizados três acessos, sendo estes, acessos 123, 133, 135, cuja floração ocorreu no mês de setembro de 2015.

3.2.2 Experimento de pH ideal de germinação

Para selecionar as melhores condições de pH foi utilizado meio básico com água, ágar ($1gL^{-1}$) e sacarose ($10gL^{-1}$). Os pHs testados foram 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 em delineamento inteiramente casualizado.

3.2.3 Experimentos de temperatura ideal de germinação

Para selecionar as melhores condições de temperatura foi utilizado meio de cultura básico com água, agar ($1gL^{-1}$) e sacarose ($10gL^{-1}$) e foram mantidos em temperatura de controlada de 20, 25 e 30ºC, em delineamento inteiramente casualizado.

3.2.4. Experimentos de diferentes composições dos meios de cultura

A partir dos dados anteriormente obtidos foram testadas as seguintes variáveis meio básico água, agar ($1gL^{-1}$) e sacarose ($10gL^{-1}$) e o meio básico suplementado com $500mgL^{-1}$ de ácido bórico.

O experimento de temperatura e pH foram realizados como um fatorial (AxB).

Em todos os experimentos o meio de cultura teve seus valores de pH ajustados, os quais foram aquecidos até total diluição do agar e ainda quente, os meios foram distribuídos em lâminas escavadas de Kline. Após foram colocados em caixas de gerbox com fundo coberto por papel germiteste umedecido (simulando

uma câmara úmida) e levadas para incubação em câmaras de germinação tipo BOD.

As avaliações foram realizadas a 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6 e 24 horas após a inoculação do pólen pela contagem de grãos germinados cujos tubos polínicos emitidos tinham tamanho igual ou superior ao grão de pólen (Pasqual et al. 1982). Foram contados 100 pólens/cavidade da placa em quatro repetições.

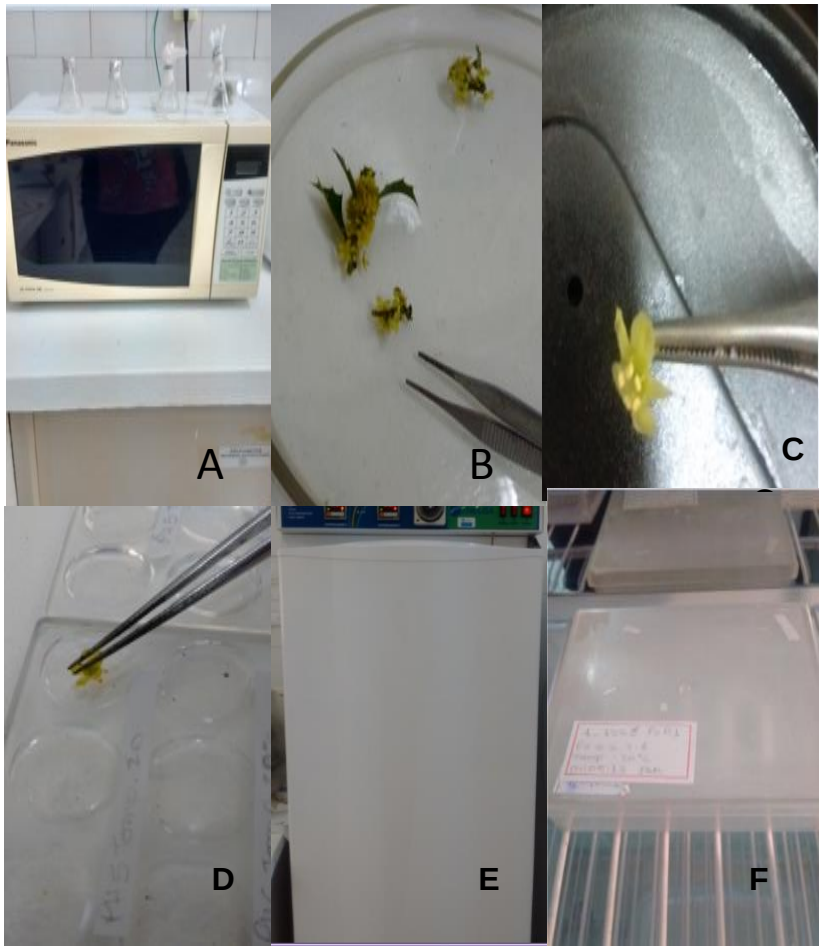

FIGURA 1 – Organização do experimento de germinação *in vitro.* A) Microondas para diluição do meio de cultivo*;* B) Flor de *Maytenus ilicifolia Mart.*; C) Flor de *Maytenus ilicifolia Mart.*; D) meio de cultivo em placa escavada; E) BOD:20, 25 e 30°; F) Caixa de Gerbox com papel germiteste para meio de cultivo em BOD

3.3 Análise Estatística

A variação foi analisada pelo método ANOVA e a comparação de médias foi efetuada através do teste de Tukey a 1% de probabilidade para análise do experimento com corantes. Para germinação *in vitro* a análise foi qualitativa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise da viabilidade polínica pelo método colorimétrico

Os resultados obtidos a partir do método colorimétrico demonstram uma alta viabilidade para as três espécies estudadas, *Achyrocline satureioides (Lam.)*, *Baccharis trimera* (Less.) e *Maytenus ilicifolia (Mart.).* No entanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com diferentes corantes para as espécies analisadas.

Em relação á marcela (*Achyrocline satureioides*) os dados apresentados na tabela 1 permitem observar que o corante carmim acético 2%, indicou maior viabilidade polínica quando comparado aos outros corantes e estes dados se reproduziram durante os meses de estudo (de março a junho de 2015). Enquanto a solução *Trypan Blue*® demonstrou uma diminuição acentuada no mês de maio. O carmim propiônico 1% indicou menor viabilidade polínica no mês de junho, além de sua viabilidade ser menor que o carmim acético 2% em todos os meses. A orceína acética 2% também obteve sua menor taxa de viabilidade no mês de junho, mas foi o corante que mostrou maior viabilidade depois do carmim acético 2%. Já a solução de alexander, foi a que demonstrou menores valores em relação a taxa de viabilidade polínica e o que obteve uma redução constante desses valores ao longo dos meses estudados.

Em relação à carqueja (*Baccharis trimera Less.*), a Tabela 1 é possível observar que o corante carmim acético 2%, indicou maior viabilidade polínica quando comparado com os demais corantes e com pouca oscilação entre os meses estudados. A solução *Trypan Blue*® demonstrou oscilação entre todos os meses e um aumento na taxa de viabilidade no mês de junho. O carmim propiônico 1% demonstrou uma diminuição da taxa de viabilidade polínica ao longo de todos os meses analisados. A solução de alexander mostrou igualmente menor taxa de viabilidade polínica, porém, indicando um pequeno aumento no mês de abril e uma redução nos meses seguintes. A orceína acética 2% mostrou uma diminuição da

taxa de viabilidade polínica no mês de abril, e depois podemos visualizar um aumento da viabilidade.

Tabela 1. Percentagem de viabilidade polínica de flores coletadas em diferentes meses de marcela (*Achyrocline satureioides Lam.*) e carqueja (*Baccharis trimera Less.*) analisadas utilizando-se cinco corantes diferentes.

Marcela (%)				
	Meses de coleta			
Corantes	Março	Abril	Maio	Junho
Carmim acético2%	79.67a A	74.50a A	79.83a A	81.67a A
Azul de tripan	46.17 b A	43.50 bA	27.67 b B	54.33 b A
Carmim propionico1%	59.00 b A	61.50a A	67.67a A	42.67 b B
Sol. de Alexander	54.83 b A	34.67 b B	23.17 b BC	21.50 c C
Orceina acética2%	77.33a A	68.50a A	74.50a A	68.17a A
Carqueja (%)				
Carmim acético2%	71.33 a A	86.50 a A	72.33a A	79.17a A
Azul de tripan	35.33 bA	44.67 bcA	24.33 bA	44.00 b A
Carmim propiônico1%	50.00 abA	31.33 cAB	26.50 b B	25.83 bc B
Sol. de Alexander	35.83 bAB	44.67 bcA	36.00 bAB	16.83 c B
Orceina acética 2%	63.17 a A	57.17 b A	65.17 a A	69.83 a A

Letras iguais minúsculas nas colunas ou maiúsculas nas linhas indicam que não houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Na comparação entre os cinco corantes, constatamos que o corante carmim acético e orceína acética superestimaram a viabilidade polínica da marcela e da carqueja, pois coram polens viáveis e inviáveis com a mesma intensidade (Figura 2C, 2E). Nos pólens corados com carmim propiônico 1%, os considerados viáveis mostraram uma coloração vermelha mais intensa e os inviáveis uma cor mais fraca. Como não existe outro parâmetro comparativo, às vezes adistinção entre viáveis e inviáveis torna-se duvidosa (Figuras 2A, 2B).

O corante solução de alexander é o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen de marcela e na carqueja, pois permitiu distinguir com mais segurança pólen viável do inviável. O viável apresenta parede celulósica de cor verde, pelo fato de possuir afinidade com o corante verde-malaquita, que em reação química cora a celulose e hemicelulose presentes na parede da célula. O protoplasma celular do pólen reage quimicamente com a fucsina ácida tornando-se púrpura (Figura1D). O pólen inviável apresenta a parede celulósica verde e o protoplasma, mal distribuído, pouco corado e não raramente ausente (Figura 1E).

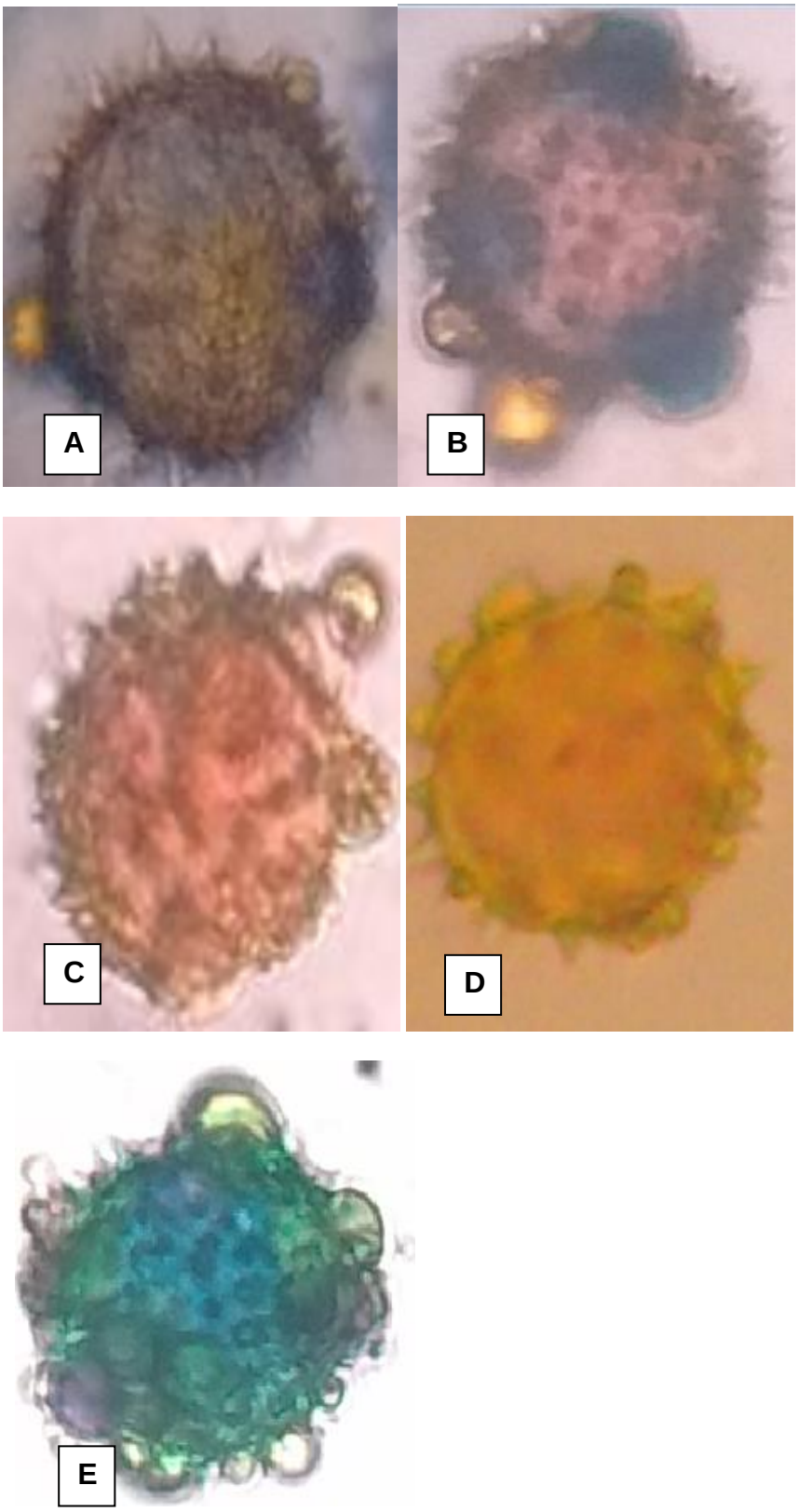

FIGURA 2 – Pólens corados de *Baccharis trimera (* e *Achyrocline satureiroides* (Less).: A) Pólen viável corado com carmim propiônico;B) Pólen viável corado com *Trypan Blue*®; C) Pólen viável corado com orceína; D) Pólen viável corado com reativo de alexander; E) Pólen viável com carmim acético

Em relação á espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), os dados apresentados na tabela 2 permitem observar que o corante solução de alexander, indicou maior viabilidade polínica quando comparado aos outros corantes e estes dados se reproduziram nos três acessos utilizados (acesso 133, acesso 135, acesso 123 em setembro de 2015). Enquanto a solução *Trypan Blue*® se mostrou menos eficaz e com uma diminuição acentuada no acesso 123, no caso do *Trypan Blue*® os grãos corados, são os inviáveis, e os viáveis ficam levemente coloridos. O carmim acético 2% mostrou menor viabilidade polínica no acesso 135, além de sua viabilidade ser menor que a solução de alexander em todos os acessos analisados. Com orceína acética 2% o acesso 133 mostrou menor taxa de viabilidade.

Tabela 2- Percentagem de viabilidade polínica proveniente de flores coletadas em diferentes acessos de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) no mês de setembro de 2015, utilizando-se quatro corantes diferentes.

	Espinheira santa (%)		
Corantes	Acesso 133	Acesso 135	Acesso 123
Carmim acético2%	72.50abA	69.17a A	75.33a A
Azul de tripan	58.00 b B	74.50a A	68.17a AB
Alexander	84.50a A	72.50a A	72.17a A
Orceína2%	58.50 b B	79.67a A	76.67a A

Letras iguais minúsculas nas colunas ou maiúsculas nas linhas indicam que houve diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Analisando ainda a Tabela 2, quanto aos acessos testados observamos uma variação estatisticamente significativa da viabilidade polínica obtida com os corantes *Trypan Blue*® e orceina acética 2% entre o acesso 133 e os demais.

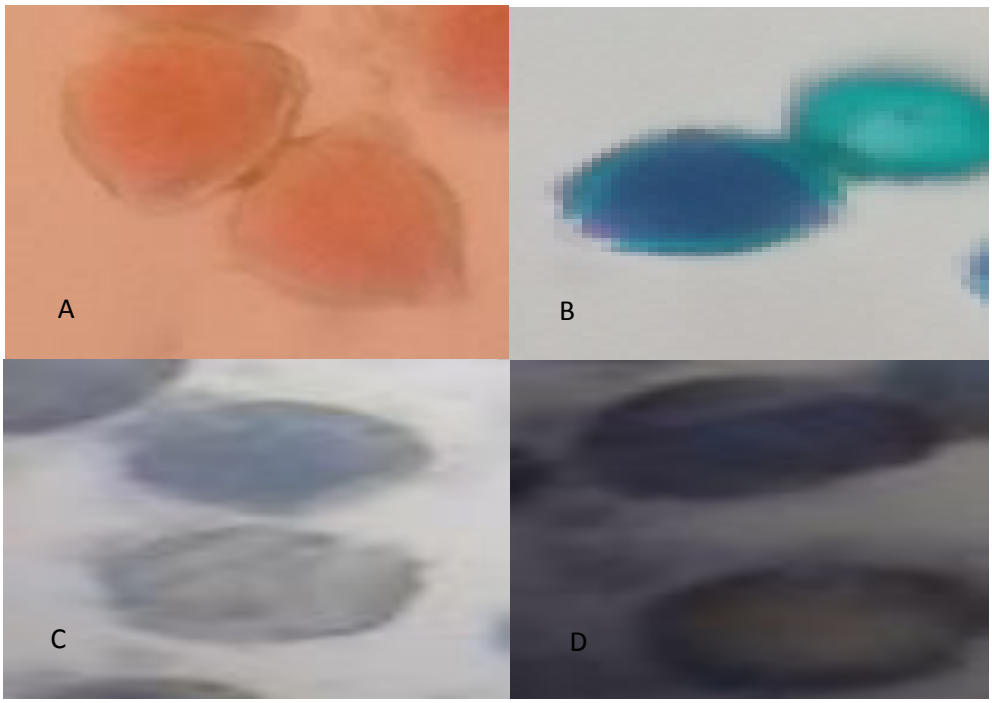

FIGURA 3 – Pólens corados de *Maytenus ilicifolia* (Mart): A) viável corado com orceína 2%; B) pólen viável (roxo no meio) e inviável (verde) corado com alexander; C) pólen viável (mais azul) inviável (mais transparente) corado com *Trypan Blue*®; D) pólen viável (roxo) e inviável (transparente no meio) corado com carmim acético 2%.

A taxa de viabilidade polínica é um fator importante para o melhoramento, conservação e cultivo de plantas, pois em espécies alógamas, como a marcela, a carqueja, a espinheira santa, o fluxo gênico através do pólen aumenta a possibilidade de formação de diferentes combinações entre alelos, e, em última análise, de variabilidade genética.

Os resultados observados neste trabalho corroboram o relato de Santos Neto et al. (2006) de que a viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo, assim como o período de florescimento e as condições ambientais podem afetar a viabilidade polínica.

O uso de corantes é o método mais rápido, porém, pode superestimar esta viabilidade, pois, muitas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ainda corar, por possuir quantidade suficiente de enzimas, amido, ainda outras substâncias, isto poderia explicar as variações encontradas entre corantes de uma mesma coleta (FRANZON et al., 2006).

4.2. Análise da viabilidade polínica através da germinação *in vitro* de pólen

Este experimento constituiu na determinação do valor de pH que expressasse a mais alta porcentagem de grãos de pólen germinados, ou seja, aqueles que tivessem seus tubos polínicos emitidos (Figura 4A, B, C) e os grãos de pólen que no mesmo horário de observação não obtiveram emissão de tubo polínico foram considerados como não germinados (Figura 4 D).

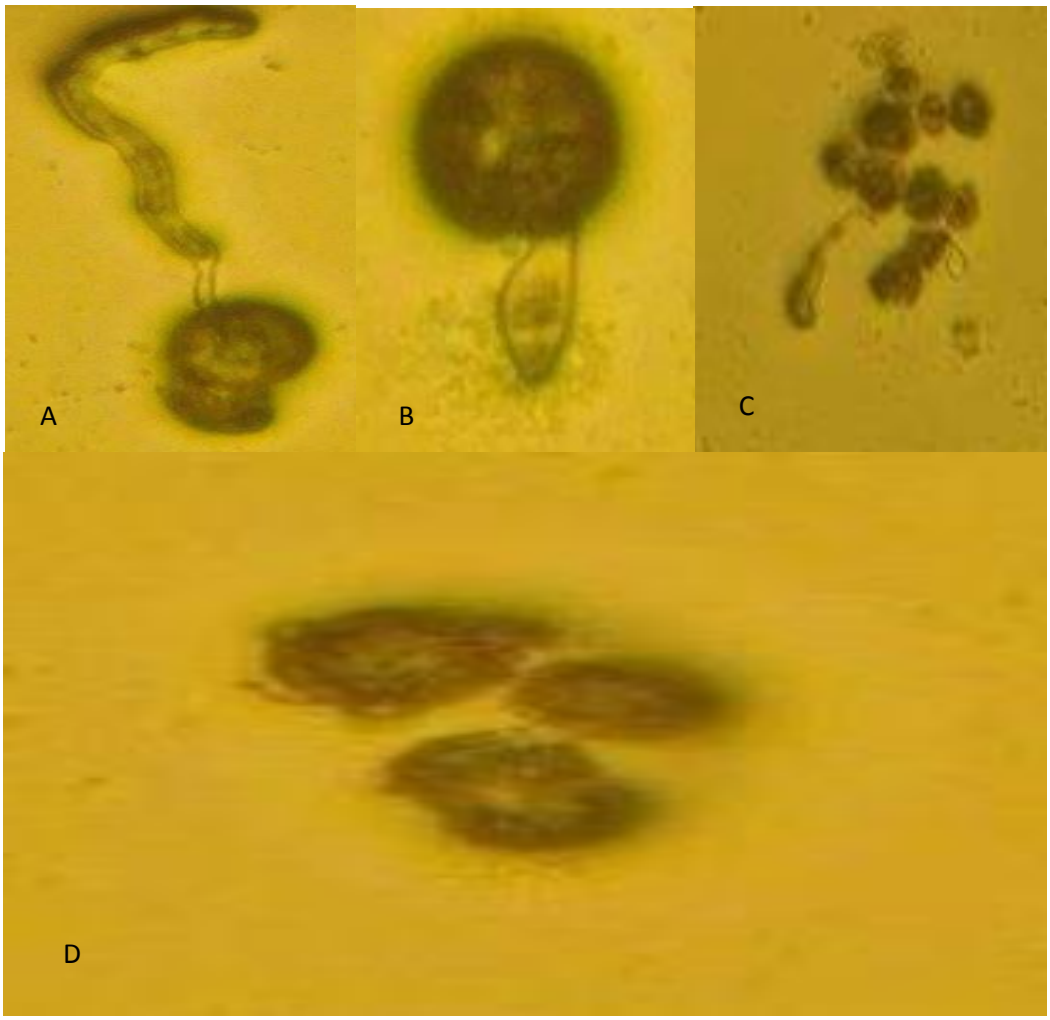

FIGURA 4 – Germinação *in vitro* de pólen de *Maytenus ilicifolia*. A) grão de pólen germinado; B) grão de pólen germinado; C) grão de pólen estourado; D) grãos de pólen germinados.

As três espécies apresentaram um comportamento semelhante, sendo que a germinação ocorreu nos pHs mais ácidos, na temperatura de 30ºC e no meio de cultura básico sem boro (Tabela 3). E de um modo geral podemos observar que

meios de germinação de pólen com pH acima de 6,0 causam uma redução no potencial germinativo das três espécies analisadas.

A germinação do pólen nas três espécies analisadas ocorreu em pH 5,0 e 6,0, estes dados corroboram com os obtidos por Chagas et al. (2009) que obtiveram os maiores valores de germinação de pólen de *Prunus* em pH entre 5 e 6,5. O pH além de influenciar na disponibilidade de nutrientes e fitorreguladores, interfere no grau de solidificação do agar (PASQUAL et al. 2002). Segundo Pierik (1987) o pH que proporciona um crescimento adequado da maioria das espécies, situa-se na faixa de 5 a 6,5 e valores acima desses podem ocasionar uma paralisação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* o que provavelmente ocorreu neste experimento.

Só houve germinação na temperatura de incubação de 30°C, indicando que pode ser utilizadas para testes de germinação *in vitro* de pólen de marcela, carqueja e espinheira santa. Temperaturas de incubação em torno de 25°C são citadas em literatura para diversas espécies, porém diferente da metodologia utilizada os autores não referenciam o uso de câmara úmida para evitar ressecamento. Thompson e Batjer (1950) usaram 24°C para pólen de ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira. Nunes et al. (2001) utilizaram esta mesma temperatura para macieira. A temperatura citada na maioria das literaturas é entre 25 e 30ºC.

Com relação ao meio de cultivo, os resultados obtidos (TABELA 3) concordam com a maioria dos autores, que afirmam que a sacarose é um dos componentes necessários para a germinação de pólen e também exerce a função de equilíbrio osmótico da solução, além de fornecer energia necessária para o crescimento do tubo polínico (GALLETTA, 1983; MIRANDA e CLEMENT, 1990; STANLEY e LINSKENS, 1974). Kobayashi et al. (1991) utilizaram concentração de 200 gL^{-1} de sacarose para obter maior germinação de grão de pólen de um híbrido de *Citrus sinensis* x *Poncirustrifoliata,* Butt et al. (1993) obtiveram melhores resultados em germinação de grão de pólen com 150 gL^{-1} de glicose para várias espécies de citros.

Em contrapartida, Bhattacharya e Mandal (1999), trabalhando com cássia, obtiveram germinação de grãos de pólen utilizando meio de cultura com 100gL^{-1} de sacarose. Derin e Eti (2001) observaram que maiores taxas para germinação de romã foram obtidas em meio de cultura contendo 10 gL^{-1} de sacarose sem boro como as obtidas neste trabalho.

A germinação *in vitro* de grãos de pólen de macieira não teve efeito positivo na presença de ácido bórico (DANTAS et al., 2005). A adição de boro ao meio de cultura mostra respostas variáveis, conforme a espécie e seu mecanismo de ação consistem em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (PFAHLER, 1967; ASKIN et al., 1990).

Pode-se observar uma tendência bastante similar entre as espécies analisadas, onde o meio de cultivo com boro permitiu uma menor quantidade de grãos de pólen germinados em relação ao meio de cultivo sem boro.

Avaliando o pólen de duas cultivares de macieira, Nunes et al. (2001) observaram que duas horas de incubação não foram suficientes para germinação *in vitro*, sendo necessário um período maior que cinco horas. Estas referências confirmam que o tempo de incubação necessário para iniciar a germinação *in vitro* varia de acordo com a espécie, e até mesmo entre cultivares da mesma espécie. Neste trabalho a germinação do pólen começou a ocorrer após 6 horas de incubação.

Tabela 3. Percentual de germinação dos grãos de polens cultivados em meio de cultivo sem e com boro submetidos a diferentes condições de pHs e temperaturas.

	Marcela (*Achyrocline satureioides*)			**Carqueja (*Baccharis trimera*)**			**Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*)**		
Meio de cultivo	Ph	Temp. (ºC)	Germin. (%)	pH	Temp. (ºC)	Germin. (%)	pH	Temp. (ºC)	Germin. (%)
Sem boro	pH 5,0	20	00	pH 5,0	20	00	pH 5,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	**4,16**		**30**	**3,75**		30	00
	pH 6,0	20	00	pH 6,0	20	00	pH 6,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	**1,8**		**30**	**1,4**		**30**	**6,25**
	pH 7,0	20	00	pH 7,0	20	00	pH 7,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	00		30	00		30	00
	pH 8,0	20	00	pH 8,0	20	00	pH 8,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	00		30	00		30	00
Com boro (500 $mg^{-1}L$)	pH 5,0	20	00	pH 5,0	20	00	pH 5,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	**0,6**		**30**	**0,5**		30	00
	pH 6,0	20	00	pH 6,0	20	00	pH 6,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	**0,17**		**30**	**0,13**		30	00
	pH 7,0	20	00	pH 7,0	20	00	pH 7,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	00		30	00		30	00
	pH 8,0	20	00	pH 8,0	20	00	pH 8,0	20	00
		25	00		25	00		25	00
		30	00		30	00		30	00

5. CONCLUSÃO

Entre os corantes utilizados o carmim acético e a orceina acética 2% são aqueles que determinaram um maior percentual de viabilidade polínica para as três espécies avaliadas.

Para análise de germinação *in vitro,* nas condições deste experimento, os melhores parâmetros são o meio básico com pH 5 para *Achyrocline satureioides* (Lam.) e *Baccharis trimera* (Less.) *e* pH 6 para *Maytenus ilicifolia* (Mart.), incubação à temperatura constante de 30° e avaliação após 6 horas de cultivo.

Podemos concluir também que o método colorimétrico superestima a viabilidade enquanto o método de germinação *in vitro* subestima a viabilidade polínica das espécies analisadas.

Porém, mediante os resultados de baixa germinabilidade obtidos neste experimento *in vitro*, se faz necessário a continuidade destes estudos, buscando avaliar outros parâmetros.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria.**Stain Technology**, v. 55, p. 13-18. 1980.

ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras. São Paulo: **Hemus,** 1993.

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

ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise**, Dergise, v.27, n.3, p.105-116, 1990.

BEZERRA, A.M.E; MEDEIROS FILHO, S.; FREITAS, J.B. Maturidade fisiológica e germinação de sementes de macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.) submetidas à secagem. **Horticultura Brasileira,** v. 21, n.3, Brasília July/Sept. 2003.

BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Loss of pollen viability of *Cassia siamea*Lamk. following treatment with arsenic. **Journal of Environmental Biology,** Santiniketan, v. 20, n. 1, p. 67-69, 1999.

BRANDÃO, M.G.L., COSENZA, G.P., MOREIRA, R.A., MONTE-MÓR, R.L.M. Medicinal plants and other products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn** *v.* 16, p. 408-420. 2006.

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

CHAGAS, E., A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; DALL'ORTO, F., A., C.; TIZATO, L., H., G.; SAITO, A.; CHAGAS, P.,C.; Germinação in vitro de grãos de pólen de prunus persica (L.) BATSCH VULGARIS **Biosci. J.,** Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 8-14, Sept./Oct. 2009.

CHAGAS, E.A., PIO, R., CHAGAS, P.C., PASQUAL, M., BETTIOL NETO, J.E. Composição do meio de cultura e condições ambientais para a germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, p. 261- 266. 2010.

CERVI, A. C.; PACIRNIK, E. F. VIEIRA, R. F. e MARQUES, L. C. Espécies vegetais de um remanescente de floresta de araucária (Curitiba, Brasil): Estudo preliminar I**. Acta Biologica Paranaense**, v. 18, p.73-114. 1989.

CEROVIC, R., RIZIC, D., MICIC, N. Viability of plum ovule at different temperatures. **Annual Applied Biology**, v.137, p.53-59. 2000.

COLAS, F. e MERCIER, S. Évaluationetmaintien de la viabilité des pollens utilisésdans le programme d' amélioration des arbres. **ForêtQuebéc,** Charlesbourg, 2000.

CUNHA, A.P., SILVA, A.P., ROQUE, O.R. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian,** 2003.

DAFNI, A. Pollination ecology: a pratical approach. **New York, Oxford University Press.** 23,1992.

DAFNI, A., FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p.113- 132. 2000.

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

DERIN, K.; ETI, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry,** Adana, v. 25, n. 3, p. 169-173, 2001.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. (coord.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis**: Editora da UFRGS/Editora da UFSC**. p.123-146, 2004.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (eds.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Porto Alegre: Ed. UFRS**, p.101-21, 1999.

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

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

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

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

HEDHLY, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 9-16. 2011.

HEIDEN, G; IGANCI, J. R. V.; STEIN, V.C.; BOBROWSKI, V. L. Número Cromossômico de *Baccharis riograndensis* MALAG. & J. E. VIDAL (Asteraceae). **PESQUISAS, BOTÂNICA**, n. 57, p.121-136. São Leopoldo, Instituto Anchietano de Pesquisas, 2006.

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I., HERRERO, M. Global warming and plant sexual reproduction.**Trends in Plant Science**, v. 14, p. 30-36. 2008.

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I., HERRERO, M. Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 81, p.158-164. 2007.

HEDHLY, A., HORMAZA, J.I., HERRERO, M. The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth and stigmatic receptivity in peach (*Prunuspersica*L.Batsch.). **Plant Biology***,* v. 7, p. 476-483. 2005.

HEDHLY, A., HORMAZA, J. I., HERRERO, M. The effect of temperature on stigma receptivity in sweet cherry (*Prunussativum*L.). **Plant Cell Environment**, v. 26, p. 1673-1680. 2003.

HERRERO, M. Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants.Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: **Biological Sciences***,* v. 358, p.1019-1024. 2003.

IMANI, A., BARZEGAR, K., PIRIPIREIVATLOU, S., MASOMI, S.H. Storange of apple pollen and *in vitro* germination. **African Journal of Agricultural Research***,* v.6, p.624-629. 24. 2011.

KLEIN, R. M. Árvores nativas da Mata Pluvial da costa atlântica de Santa Catarina ***In* Anais do Congresso Florestal Brasileiro** – contribuições e trabalhos apresentados e pareceres das comissões. p.65-103. 1968.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, v.1 p.368. 2002.

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

MAZZA, C.A.S., MAZZA, M.C.M. & SANTOS, J.E. Caracterização ambiental da paisagem da Microrregião Colonial de Irati, PR. *In* Faces da polissemia da paisagem: ecologia, planejamento e percepção (J.E. dos Santos, F. Cavalheiro, J.S.R. Pires, C. Henke-Oliveira & A.M.Z.C.R. Pires, org.). **Editora RiMa/Fapesp, São Carlos**, v.2, p.409-424. 2004.

MENDONÇA, V. CHAGAS, P. C. Germinação de grãos de pólen de pereirasob diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico do meio deCultura. In: **CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERALDE LAVRAS. Anais...Lavras, Brasil**, 2006.

MICHALAK, E. Apontamentos fitoterápicos da Irmã Eva Michalak. Florianópolis: **EPAGRI**, 94p. 1997.

MONTANARI, T.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifoli*a Mart. ex. Reiss on spermatogenesis**. Contraception**, v. 57, n. 2, p. 335-339, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673841>. Acessoem: 1º ago. 2011.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice**. Contraception**, v. 65, n. 2, p.171-175, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010782401003018>. Acessoem: 3 set. 2011.

MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO, A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; MAZUTTI, M.; NASCIMENTO FILHO, I.; ECHEVERRIGARAY, S. **Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO2. Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 168-178, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15030921>. Acessoem: 4 set. 2011.

MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M.; PAROUL, N.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009.Disponívelem: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v69n2/15>. Acesso em: 24 set. 2011.

MUNHOZ, M., LUZ, C. F. P. MEISSNER FILHO, P.E., BARTH, O.M., REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica,** v. 31, p. 209-214. 2008.

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

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de O. Cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência,** v. 8, n. 3, p. 199-20, 2002.

PFAHLER, P.L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium and boron effects. **Canadian Journal of Botany***, v.* 45, p. 839-845. 25. 1967.

PEREIRA, L. P. de; LUZ, L. P. da; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F. da Número de cromossomos em populações de Achyrocline satureioides Lam. (marcela) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.678-681, mar-abr, 2006.

PIO, L.A.S.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M.; RAMOS, J.D.; ARAÚJO, A.G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Goiânia, v.10, n.3, p.293-296, 2004. [

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

PIRLAK, L. The effects of temperature on pollen germination and pollen tube growth of apricot and sweet cherry. **Garten bauwissenschaft**, v. 67, p.61-64. 2002.

RADOMASKI, M. L. e BULL, L. T. Caracterização ecológica e fotoquímica de quatro populações naturais de *Maytenus ilicifolia* no estado do Paraná **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 30, p.1-16. 2010.

REIS, R.V., MORAIS, L.S., SILVA, S.O., AMORIM, E.D., LEDO, C.A.S., VIANA, A.P. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bananeira sob diferentes concentrações de ácido bórico e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 35, p.547-553. 2011.

RODRIGO, J., HERRERO, M. Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot**. Scientia Horticulturae**, n. 92, p.125-135. 2002.

RODRIGUEZ-RIANO, T., DAFNI, A. A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, n.12, p.241-244. 2000.

RUSSEL, S. D. Double Fertilization. **International review of Cytology**, n. 140, p.357-388.1992.

SAHAR, N.; SPIEGELROY, P. Citrus pollen Storage**. Horticulturae Science,** St. Joseph, v. 15, n.1,p.81-82.1980.

SCHEFFER, M. C. Sistema de cruzamento e variação genética entre populações e progênies de espinheira santa. **Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.** 2001.

SHARMA, H. C., BAJPAI, P. N. Studies on floral biology of papaya. **Indian Journal of Science,** n.3, p, 28-32. 1969.

SILVA, J. A., T., RASHID, Z. NHUT, D. T., SIVAKUMAR, D., GERA, A., SIMÕES, M. C.; MENTS, L. A. IRGANG, B. F. e STEHMANN, J. R.**Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul,** 1988.

SOUZA, JR., M. T., TENNANTE, P. F. Papaya (*Carica papaya L.)* biology and biotechnology.**Tree and Forest Sciences and Biotechnology**, n.1, p.47-73. 2007.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M. G. et al. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethno. Pharmacol**., v.34,n.1, p. 21-27, 1991.

STANLEY, R. G., LINSKENS, H. F. 1974. Pollen: biology, Biochemistry management. **New York: Springer-Verlag**, p.172. 26. 1974.

STEENBOCK, W. Fundamentos para o manejo de populações naturais de espinheira santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss. (Celastraceae). Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis**. 2003.

STEENBOCK, W. e REIS, M. S. Manejo sustentável de populações naturais de espinheira santa. In plantas medicinais e aromáticas (M. S. REIS e S. R. SILVA. Orgs.). **IBAMA,** Brasilia's. 145-162. 2004.

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

ZINN, K. E., TUNC-OZDEMIR, M., HARPER, J. F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany,** n. 61, p.1959-1968. 2010.