



**CENIR TEODORO VIEIRA**

**MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE  
PÓLEN ARMAZENADOS DE *Toona ciliata* M.  
Roemer (Meliaceae)**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**CENIR TEODORO VIEIRA**

**MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN  
ARMAZENADOS DE *Toona ciliata* M. Roemer (Meliaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado

Coorientador

Dr. Fabrício José Pereira

**LAVRAS – MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Vieira, Cenir Teodoro.

Morfologia e viabilidade de grãos de pólen armazenados de  
*Toona ciliata* M. Roemer (Meliaceae) / Cenir Teodoro Vieira. –  
Lavras : UFLA, 2013.

51 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Sebastião Carlos da Silva Rosado.

Bibliografia.

1. Cedro australiano. 2. Diâmetro do pólen. 3. Polinização  
controlada. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.973250446

**CENIR TEODORO VIEIRA**

**MORFOLOGIA E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN  
ARMAZENADOS DE *Toona ciliata* M. Roemer (Meliaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2013.

Dr. Fabrício José Pereira	UFLA
Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA

Dr. Sebastião Carlos da Silva Rosado  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

À minha família, aos meus amigos e aos apaixonados pela ciência.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, aos meus amigos, aos professores Sebastião Rosado, Fabrício Pereira e Lisete Davide, à empresa Bela Vista Florestal e ao Ministério Público do Estado de Mato Grosso do Sul pela oportunidade de realização do Mestrado.

## RESUMO

A família Meliaceae possui diversas espécies de importância madeireira e o cedro australiano (*Toona ciliata*) tem se destacado como uma das mais promissoras para as condições brasileiras. O melhoramento genético da espécie está em fase inicial e ainda faltam informações básicas para a realização de polinizações controladas. O objetivo com este trabalho foi caracterizar o grão de pólen de *Toona ciliata* e avaliar a viabilidade em função dos estádios da flor durante a antese e do tempo de armazenamento. As inflorescências foram coletadas no município de Campo Belo-MG e os grãos de pólen foram extraídos a seco. Foram separadas anteras de flores funcionalmente masculinas em três estádios: flor fechada (E1), flor em pré-antese (E2) e flor em antese (E3). O volume das tecas das anteras, o número de grãos de pólen por antera, o diâmetro do pólen, a espessura da exina e a viabilidade polínica foram avaliados. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,01$ ). O número de grãos de pólen por antera foi maior em E1 e E2, quando comparados com o E3. O diâmetro dos grãos de pólen aumentou de forma gradativa do E1 para E3 e o diâmetro médio foi de 23,03  $\mu\text{m}$ . Em E1 a espessura da exina foi menor quando comparada aos outros dois estádios. A viabilidade dos grãos de pólen foi alta nos três estádios da flor, mesmo após 12 meses de armazenamento. Foi observado pólen de tamanho maior, provavelmente pólen 2 n. Conclui-se que para a realização de polinizações em programas de melhoramento é mais indicado coletar anteras de flores fechadas.

Palavras-chave: Cedro australiano. Diâmetro do pólen. Polinização controlada.

## ABSTRACT

The family Meliaceae has several important timber species and Australian cedar (*Toona ciliata*) has emerged as the most promising for Brazilian conditions. Breeding programs of Australian cedar is in initial stage and basic information on controlled pollinations are still lacking. The aim of this study was to characterize pollen grains of *Toona ciliata* and to evaluate its viability according to flower stage during anthesis and storage time. The inflorescences were collected in Campo Belo-MG and the pollen grains were dry extracted. We separated anthers of functionally male flowers in three stages: flower buds (E1), pre-anthesis (E2) and anthesis (E3). The volume of the anthers, the number of pollen grains per anther, pollen diameter, the thickness of the exine and pollen viability were evaluated. Data were subjected to analysis of variance and means were compared by Scott-Knott test ( $p < 0.01$ ). The number of pollen grains per anther was higher in E1 and E2, in comparison with E3. The diameter of pollen grains increased gradually in E1 to E3 and the average diameter was 23.03  $\mu\text{m}$ . In E1 exine thickness was lower when compared to the other two stages. The viability of pollen grains was high in all three flower stages, even after 12 months of storage. It was observed pollen of larger size, probably 2 n pollen. We conclude that to carry out pollination in breeding programs is better to collect anthers in flowers buds stage.

Keywords: Australian cedar. Pollen diameter. Controlled pollination.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Posição das flores de <i>Toona ciliata</i> na inflorescência.....	25
Figura 2	Estádios das flores durante a antese .....	25
Figura 3	Anteras e pólen de <i>Toona ciliata</i> .....	32
Figura 4	Eletromicrografia do grão de pólen de uma flor fechada de <i>Toona ciliata</i> .....	37
Figura 5	Viabilidade de pólen de <i>Toona ciliata</i> , em função do tempo, em dois estádios da flor durante a antese .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variações nas médias do volume das tecas das anteras de <i>Toona ciliata</i> em função do estágio da flor durante a antese .....	33
Tabela 2	Variações nas médias do número de grãos de pólen de <i>Toona ciliata</i> , por antera, em função do estágio da flor durante a antese ...	33
Tabela 3	Variações nas médias dos diâmetros dos grãos de pólen de <i>Toona ciliata</i> em função do estágio da flor durante a antese .....	34
Tabela 4	Variações nas médias da espessura da exina do pólen de <i>Toona ciliata</i> em função do estágio da flor durante a antese .....	35
Tabela 5	Percentual de viabilidade dos grãos de pólen de <i>Toona ciliata</i> , avaliada por meio do uso de carmim acético 1%, em função do estágio da flor durante a antese, em dois tempos de armazenamento.....	38
Tabela 6	Viabilidade dos grãos de pólen de <i>Toona ciliata</i> , avaliada por meio do uso da solução Alexander, em função do estágio da flor durante a antese .....	40

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>3.1</b>	<i>Toona ciliata</i> (M. Roemer) .....	15
<b>3.2</b>	Reprodução, biologia floral e reprodutiva de <i>Toona ciliata</i> .....	17
<b>3.3</b>	Viabilidade dos grãos de pólen .....	21
<b>3.4</b>	Melhoramento genético .....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>4.1</b>	Material de estudo .....	24
<b>4.2</b>	Extração dos grãos de pólen .....	24
<b>4.3</b>	Características anatômicas da antera .....	26
<b>4.4</b>	Microscopia eletrônica de transmissão .....	27
<b>4.5</b>	Viabilidade e diâmetro dos grãos de pólen .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

As florestas plantadas no Brasil, em sua maioria, são homogêneas e constituídas por espécies exóticas que alcançaram grande êxito no abastecimento de matérias-primas para os diferentes setores da indústria de base florestal. Notadamente, nestas florestas, há um amplo predomínio das espécies dos gêneros *Eucalyptus* ou *Pinus*, resultante de suas amplas capacidades de adaptação às diferentes condições bioclimáticas e de suas altas taxas de produtividade e qualidade da madeira para abastecer, principalmente, o setor de siderurgia a carvão vegetal e o de celulose e papel (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2012).

Entretanto, alguns setores econômicos brasileiros, tais como o da construção civil e da indústria moveleira, têm apresentado outras demandas de matérias-primas que agreguem mais valores aos seus produtos finais e que possam inserir os seus processos de produção dentro do contexto do desenvolvimento sustentável. Principalmente por essas razões, novas áreas de florestas homogêneas estão sendo plantadas, e o cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) tem se destacado como uma das espécies mais promissoras (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010).

Esta espécie, que também é exótica, apresenta rápido crescimento e encontrou no Brasil condições edafoclimáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (SOUZA et al., 2009). Isso, associado à baixa idade de rotação para produzir toras de alta qualidade e com alto rendimento nas operações de desdobro (NASSUR et al., 2013), tem expandido a área de cultivo principalmente na região sudeste (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010), onde a espécie tem exibido altas taxas de crescimento, em comparação aos locais de origem (ZIECH, 2008).

O cultivo do cedro australiano, quando comparado ao cedro brasileiro (*Cedrela fissilis*), é mais vantajoso, pois a espécie não é atacada por *Hypsipyla grandella*, praga que ataca a gema apical de algumas meliáceas brasileiras, como o mogno (*Swietenia macrophylla*) e o cedro. Esta praga prejudica a forma monopodial do tronco, reduzindo o seu valor comercial (BYGRAVE; BYGRAVE, 2005).

A espécie está em fase inicial de melhoramento para as condições brasileiras, porém, ainda não existem sementes comerciais geneticamente melhoradas. Os atuais testes genéticos demonstram grande variabilidade na produtividade e qualidade das toras (NASSUR et al., 2013). Isso justifica a necessidade de conduzir programas de seleção para melhoramento em gerações avançadas.

Entretanto, em situações onde não há sincronia no florescimento entre os indivíduos de interesse para os cruzamentos ou quando estes se localizam em regiões distintas, o armazenamento de pólen por períodos relativamente longos se torna uma técnica fundamental para viabilizar a hibridação (PIO et al., 2007). Para isso, é importante conhecer o estágio apropriado de coleta do botão floral para obtenção de pólen maduro e viável (MENCK et al., 1990). A extração adequada de pólen também é essencial para o processo de armazenamento, que deve manter seu poder germinativo por maior período possível (CANGIANI, 1988). Desta forma, informações sobre a viabilidade do pólen armazenado e a melhor época para realizar a polinização aumentam as chances de sucesso durante as hibridações artificiais (PEREIRA, 2001; PEREIRA et al., 2002).

Santos (2011), ao estudar 78 progênies de meios irmãos de cedro australiano de origens distintas da Austrália, verificou a existência de grande variabilidade genética na espécie e que ganhos significativos na seleção de procedências, progênies e indivíduos superiores podem ser alcançados. Para dar continuidade aos programas de seleção e melhoramento, os indivíduos

selecionados para diferentes características associadas às distintas origens necessitam ser cruzados para a obtenção de híbridos que reúnam características de boa produtividade com outras de grande importância silvicultural e tecnológica, como por exemplo: forma do fuste, desrama, resistência às pragas e doenças e qualidade de madeira. No entanto, informações preliminares que possam garantir o sucesso desses cruzamentos controlados ainda não estão disponíveis.

## 2 OBJETIVOS

- a) Caracterizar grãos de pólen de *Toona ciliata* e avaliar a viabilidade em função dos estádios da flor durante a antese e do tempo de armazenamento;
- b) Contribuir para a viabilização de polinizações controladas entre genitores selecionados para programas de hibridação de *Toona ciliata*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Toona ciliata* (M. Roemer)

A espécie *Toona ciliata* pertence à família Meliaceae (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003), subfamília Swietenioideae e tribo Cedreleae.

A árvore é caducifólia, pode atingir 50 m de altura, 150 cm de DAP (diâmetro à altura do peito) (LAMPRECHT, 1990), e ocupa o dossel da floresta (GOUVÊA, 2005). A espécie apresenta tronco cilíndrico, com casca suberosa de cor marrom. As folhas são compostas paripinadas, com 30-50 cm de comprimento e 10-16 folíolos membranáceos, medindo de 5-15 cm de comprimento, com ambas as faces de cor verde-clara (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003).

Sua área de ocorrência natural abrange a Índia, Bangladesh, Birmânia, Tailândia, China Meridional, Indonésia, Malásia, Filipinas, além de parte da Austrália. A espécie coloniza locais com até 1.500 m de altitude, com precipitação média anual entre 800 e 1.800 mm e temperatura média anual de 20° a 26 °C (LAMPRECHT, 1990).

A árvore apresenta crescimento rápido e necessita de altos níveis de radiação solar, embora seu estabelecimento inicial seja favorecido pelo sombreamento (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010). *Toona ciliata* ocorre em solos bem drenados, profundos e eutróficos (LAMPRECHT, 1990) e não tolera alagamento por longos períodos e nem geadas (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010).

Na Austrália, a espécie é conhecida como cedro vermelho e também ouro vermelho, devido à excelente qualidade de sua madeira (BYGRAVE; BYGRAVE, 2005), que durante a colonização da Austrália, foi bastante



utilizada pelos ingleses para a fabricação de móveis (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003).

A madeira marrom-avermelhada é de fácil desdobro e processamento, além de exalar um odor agradável (LAMPRECHT, 1990). A densidade da madeira pode variar de 0,33 a 0,6 g cm<sup>-3</sup> (CIFLORESTAS, 2011). No entanto, Ziech (2008) encontrou valor de densidade básica média de 0,306 g cm<sup>-3</sup> em árvores com 4 anos de idade, no sul de Minas Gerais; em árvores com 18 anos de idade, cultivadas no Espírito Santo, Nassur (2010) encontrou densidade média de 0,314 g cm<sup>-3</sup>. O mesmo autor relatou que o rendimento volumétrico da madeira atingiu 62%, o que é considerado um valor alto. Soragi (2009), estudando árvores de 18 anos, concluiu que a espécie é adequada para a fabricação de produtos sólidos, pois a madeira exibiu superfícies usinadas de boa qualidade. Conforme Gonçalves e Oliveira (2006), a madeira de cedro australiano apresenta desgaste superficial moderado ao ataque pelo cupim da madeira seca (*Cryptotermes brevis*).

A madeira é empregada na construção civil, marcenaria, instrumentos musicais, produção de caixas de charutos (LAMPRECHT, 1990), esculturas, fabricação de aviões (CIFLORESTAS, 2011), barcos, além de ser utilizada como substrato na cultura do cogumelo shiitake (ORWA et al., 2011).

A árvore, em função de sua beleza, pode ser utilizada no paisagismo de parques e grandes jardins (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003). A espécie é bastante utilizada na produção de mel em Bangladesh, já que é muito atrativa para as abelhas. Por outro lado, extratos da casca da árvore possuem propriedades que repelem insetos (ORWA et al., 2011).

O plantio de *Toona ciliata* tem sido amplamente difundido em países tropicais e subtropicais (GRAU; ZAPATER; NEUMANN, 2006). Na América Latina *Toona* parece não ser atacada por *Hypsipyla* spp. nativos, que são de espécies diferentes daquelas que ocorrem naturalmente na área de distribuição

geográfica do cedro australiano (STYLES, 1972). Enquanto a praga *H. grandella* prefere *Cedrela* e *Swietenia*, a *H. robusta* tem preferência por *Toona*, *Khaya*, *Chukrasia* e *Xylocarpus* spp. (BYGRAVE; BYGRAVE, 2005). A fêmea de *Hypsipyla* põe seus ovos principalmente nos meristemas apicais da árvore e o ataque das larvas resulta na morte do ápice, o que causa bifurcações no tronco e diminui o valor comercial da madeira (BYGRAVE; BYGRAVE, 2001; NEWTON et al., 1993).

### **3.2 Reprodução, biologia floral e reprodutiva de *Toona ciliata***

Os frutos são cápsulas lenhosas elipsoides, deiscentes, marrom-avermelhados, medindo de 2,0 a 2,8 cm de comprimento (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003).

As sementes, que têm de 10 a 20 mm de comprimento e 3 mm de largura, são aladas (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010) e dispersas pelo vento (ORWA et al., 2011). Em talhões entre 9 e 12 anos, foram obtidas 220.000 sementes kg<sup>-1</sup>, em média (SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010). De acordo com Scocchi et al. (2006), as sementes podem ser armazenadas em freezer (-18 °C) para manter o poder germinativo por cerca de um ano e; para períodos mais longos as sementes podem ser conservadas em nitrogênio líquido. Portanto, suas sementes são ortodoxas. Conforme Souza, Barroso e Carneiro (2010), sementes recém-coletadas apresentam percentagem de germinação entre 70% e 90% e a germinação ocorre entre 7 e 21 dias. De acordo com Braga (2011), as mudas são dependentes de saturação por bases no solo, além de serem exigentes em enxofre.

A reprodução de *Toona ciliata* é realizada por meio de sementes (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003), porém, nos últimos anos, algumas empresas têm investido na produção de mudas clonais. De acordo com Souza et

al. (2009), a miniestaquia, sem aplicação de auxina, é uma técnica viável para a propagação do cedro australiano, além de assegurar a produção de mudas durante o ano inteiro.

De acordo com Souza, Barroso e Carneiro (2010) a espécie floresce entre os meses de setembro a novembro e os frutos aparecem de janeiro a março, no entanto, estes eventos podem ser antecipados em mais de um mês.

A inflorescência é do tipo tirso (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008), com flores perfumadas de cor creme ou branca de aproximadamente 0,5 cm de comprimento (LORENZI; SOUZA; TORRES, 2003). A inflorescência pode alcançar 90 cm de comprimento (STYLES, 1972), e seus ramos contêm cimas secundárias e, mais raramente, de terceira ordem (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008).

As plantas são monoicas, e a distribuição de sexo dentro das inflorescências da tribo Cedreleae não é aleatória (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008). *Cedrela*, *Toona* e *Swietenia* apresentam geralmente flores funcionalmente masculinas e femininas na mesma inflorescência, e apenas a flor do centro de uma cima ou de uma cícula de 3 flores é feminina, enquanto as flores laterais são masculinas (STYLES, 1972) (Figura 1). Às vezes, entretanto, cimas podem ter apenas flores funcionalmente masculinas ou, mais raramente, todas podem ser femininas (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008; STYLES, 1972).

Na antese, as flores maduras de *Cedrela* e *Toona* são morfologicamente bissexuais, porém funcionalmente unissexuais, com estaminoides ou pistiloides nas flores funcionalmente femininas ou masculinas, respectivamente. Para Hawk e Tepedino (2007), estaminoides são estames que perderam a função reprodutiva, pois não produzem pólen viável e pistiloides são carpelos que não produzem óvulos viáveis.

As pétalas das flores funcionalmente femininas de cedro australiano são um pouco menores que as das flores masculinas (STYLES, 1972). Flores funcionalmente femininas de *Cedrela* e *Toona* apresentam estaminoides (Figura 1), que têm cerca de metade do comprimento dos estames férteis e suas anteras são enrugadas e de cor marrom escuro. Os poucos grãos de pólen eventualmente formados nestas anteras são deformados e não funcionais. Nas flores funcionalmente femininas o estigma é capitado e discoide (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008), e na superfície estigmática as papilas glandulares são bem evidentes (STYLES, 1972). Cada lóculo do ovário é preenchido com duas séries de 6-12 óvulos anátropos e bitegumentados (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008), estes óvulos são grandes, carnosos e preenchem totalmente os lóculos do ovário (STYLES, 1972). O gineceu é sincárpico e a placentação é axial (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008).

Em flores funcionalmente masculinas o carpelo pode ter tamanho e forma normal, no entanto os óvulos são pequenos, rudimentares, acastanhados e abortados (STYLES, 1972). Gouvêa, Dornelas e Rodriguez (2008) ressaltam que, embora alguns óvulos apresentem morfologia normal, cortes histológicos mostram diferentes graus de degeneração. De acordo com Styles (1972), estes óvulos não enchem completamente os lóculos do ovário. Este ovário estéril, conhecido como pistiloide, geralmente mais fino e menos glandular que em flores funcionalmente femininas, é incapaz de se desenvolver depois. Segundo Gouvêa, Dornelas e Rodriguez (2008), em *Toona*, a largura média do ovário de flores masculinas é cerca de metade da observada em flores femininas.

Nas flores funcionalmente masculinas as anteras são grandes, amarelas e cheias de pólen (STYLES, 1972) (Figura 1), os quais são bem formados, com citoplasma denso e núcleos evidentes (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008).

Na antese, a porção terminal das anteras toca as papilas estigmáticas. Tais papilas estão restritas à parte inferior do estigma, e apenas nesta região foram observados grãos de pólen germinando. Esta estratégia pode estar relacionada com os mecanismos de polinização, ainda desconhecidos (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008).

Um nectário vermelho intenso discoide está presente na base do gineceu nas flores masculinas e femininas de *Toona* (GOUVÊA; DORNELAS; RODRIGUEZ, 2008). Durante a antese, um néctar viscoso e açucarado é secretado destes nectários, atraindo insetos que se alimentam de néctar (GOUVÊA, 2005). A estrutura de flores de Meliaceae sugere que elas são entomófilas. A maioria das espécies tem um perfume doce, que pode ser extremamente poderoso, permitindo ser percebido a uma distância considerável (STYLES, 1972). De acordo com Carvalho (2007), abelhas e mariposas são polinizadores comuns em espécies da família Meliaceae.

*Toona ciliata* é uma espécie alógama (PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003), e as possibilidades de fecundação cruzada em alguns gêneros monoicos de Swietenioideae são maiores, pois flores masculinas e femininas não se abrem ao mesmo tempo (STYLES, 1972).

Em *Cedrela*, as flores femininas se abrem antes do período de floração completa, mas só raramente parece haver uma mistura dos dois sexos abertos ao mesmo tempo em qualquer árvore individual (STYLES, 1972).

Em *Toona*, o perianto é formado por 5 tépalas, que são livres, mas não se abrem completamente; os cinco estames são livres, mas estão unidos na base do ovário súpero (GOUVÊA, 2005).

### 3.3 Viabilidade dos grãos de pólen

O planejamento de hibridações artificiais em programas de melhoramento demanda o conhecimento da viabilidade dos grãos de pólen durante o armazenamento (FERREIRA et al., 2007). No entanto, o uso de técnicas inadequadas de coleta, transporte, extração e armazenamento de pólen podem comprometer sua viabilidade e, conseqüentemente, dificultar a produção de híbridos (MENCK et al., 1990). Os principais fatores que afetam a viabilidade do pólen são umidade, temperatura de extração e temperatura de armazenamento (SIREGAR; SWEET, 2000). Normalmente o armazenamento de pólen envolve a redução do teor de umidade e sua manutenção em temperatura baixa, a fim de reduzir o metabolismo e assegurar maior longevidade (PIO et al., 2007).

Técnicas como germinação *in vitro* e *in vivo* e uso de corantes químicos são bastante utilizadas para se estimar a viabilidade de grãos de pólen (FERREIRA et al., 2007).

Na germinação *in vitro*, o meio de cultura deve simular as condições do estigma para induzir a germinação do tubo polínico, portanto, cada espécie requer um meio de cultura específico para a obtenção de uma boa germinação (FERREIRA et al., 2007).

A germinação do pólen *in vivo* pode ser avaliada mediante a capacidade de produção de sementes (FERREIRA et al., 2007). No entanto, além da viabilidade dos grãos de pólen, fatores como esterilidade, incompatibilidade e receptividade do estigma podem influenciar a produção de frutos (MENCK et al., 1990).

O uso de corantes é um método relativamente seguro para estimar a quantidade de grãos de pólen viáveis, o que permite fazer inferências importantes sobre a integridade dessas estruturas (MENCK et al., 1990).

O carmim acético indica a integridade cromossômica (MUNHOZ et al., 2008), considerando-se viáveis os grãos de pólen corados de vermelho e inviáveis aqueles não corados. Na solução Alexander, o verde de malaquita reage com a celulose da parede do pólen, enquanto a fucsina ácida reage com o protoplasma. Assim, grãos de pólen abortados coram-se de verde, e os não abortados, de roxo (ALEXANDER, 1980).

### **3.4 Melhoramento genético**

Na agricultura, a hibridação tem sido um método de melhoramento amplamente utilizado, resultando em aumento de produtividade, melhoria da qualidade dos produtos, além de resistência às pragas, doenças, seca e frio (ASSIS, 1997). Por meio da polinização controlada é possível conhecer a capacidade geral e específica de combinação das matrizes, além de possibilitar o cruzamento entre progenitores que não apresentam sincronia no florescimento (MENCK et al., 1990) ou quando estes se encontram em regiões diferentes (PEREIRA, 2001).

Em espécies arbóreas, dado o longo período de tempo demandado para produzir gerações avançadas de melhoramento, a polinização controlada constitui uma importante ferramenta para gerar indivíduos com boas características tecnológicas e adaptativas provenientes de genitores distintos. Um exemplo de sucesso é o cruzamento entre *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. O primeiro possui boa capacidade de brotação, resistência ao cancro e à seca, além de maior densidade; já o segundo, apresenta rápido crescimento (ASSIS, 1997). Para espécies de *Eucalyptus*, o aproveitamento da heterose associado à propagação clonal, tornou a hibridação uma importante ferramenta na produção de florestas clonais de qualidade superior (ASSIS; BAUER; TAFAREL, 1993).

Algumas espécies da família Meliaceae, como o cedro e o mogno, são reconhecidas pelo potencial madeireiro, no entanto, são atacadas pela praga *Hypsipyla* spp., o que constitui o maior desafio para a implantação de plantios homogêneos (BYGRAVE; BYGRAVE, 2005). Newton et al. (1993) sugerem o manejo integrado da praga, associando material resistente e controle biológico.

Programas de melhoramento genético de *Toona ciliata* estão sendo conduzidos em Minas Gerais, onde já foram selecionados genótipos de maior produtividade (SANTOS, 2011) e no Rio de Janeiro (FERREIRA et al., 2012). Futuramente, estes genótipos serão cruzados em esquema de dialelo parcial ou completo, como sugerido por Zobel e Talbert (1984) para a obtenção de híbridos mais adaptados e produtivos.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material de estudo**

As inflorescências de cedro australiano foram coletadas em 22 indivíduos com idade de cinco, oito e nove anos, no plantio da empresa Bela Vista Florestal, no município de Campo Belo, Sul de Minas Gerais, coordenadas 20°53'58,89"S, 45°17'33,04"W e altitude média de 945 m. A precipitação pluviométrica média anual é de 1.250 mm, com chuvas bem distribuídas e temperatura média anual de 23,5 °C.

### **4.2 Extração dos grãos de pólen**

A extração dos grãos de pólen foi feita a seco. Foram separadas anteras de flores funcionalmente masculinas em três estádios durante a antese: flor fechada (botão floral – E1), flor em pré-antese (com estigma aparente – E2) e flor em antese (aberta – E3). As anteras de cada um dos estádios foram colocadas em placas de Petri separadas e permaneceram 48 horas em dessecador com sílica gel. Posteriormente, as anteras foram transferidas para tubos tipo *Eppendorf* de 1,5 ml e armazenadas a -16 °C, por 12 meses.

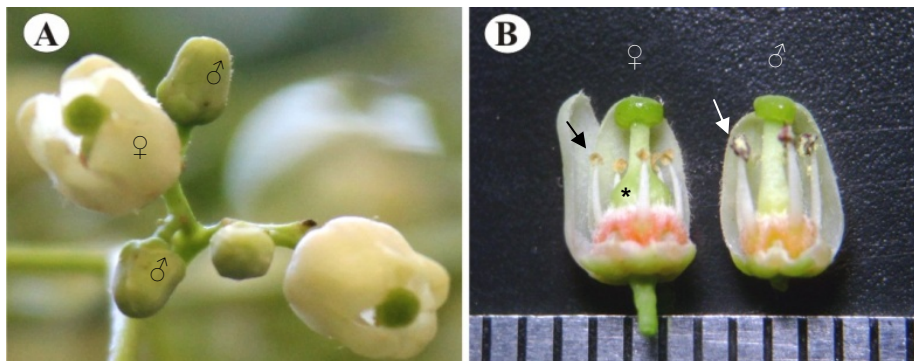


Figura 1 Posição das flores de *Toona ciliata* na inflorescência

Nota: (A) flor funcionalmente feminina (♀) em antese, no centro, e flores funcionalmente masculinas (♂) fechadas, nas laterais. (B) detalhe de flor funcionalmente feminina (♀), com ovário dilatado (\*) e estaminoides (seta), à esquerda; flor funcionalmente masculina (♂), à direita, com grandes anteras (seta) contendo grãos de pólen.

Foto: Eduardo Stehling.



Figura 2 Estádios das flores durante a antese

Nota: (A) flor fechada, estágio E1. (B) flor em pré-antese, estágio E2. (C) flor em antese, estágio E3.

Foto: Cenir Teodoro Vieira.

### 4.3 Características anatômicas da antera

Flores nos três estádios durante a antese foram fixadas em etanol 70% por 72 horas, submetidas à desidratação em série etanólica (etanol 80, 90 e 100% em intervalos de 2 horas para cada série, no vácuo), posteriormente foram pré-infiltradas em resina base (etanol 100% e resina base na proporção de 1:1 v v<sup>-1</sup>) por 24 horas no vácuo e, por fim, colocadas em resina base pura por 24 horas no vácuo. A resina foi submetida à polimerização por adição do catalisador (endurecedor), colocada em moldes de polietileno e deixada em estufa a 34 °C por 72 horas para finalizar a polimerização. Os blocos foram removidos do molde, fixados em cubos de madeira e seccionados em micrótomo rotatório na espessura de 10 µm. As secções foram colocadas sobre lâminas em placa aquecedora a 40 °C, coradas com azul de toluidina (0,05%) e cobertas por bálsamo do Canadá e lamínula.

As anteras foram fotografadas com uma câmera digital conectada a um microscópio *Olympus CX41*. As fotomicrografias foram utilizadas na quantificação das características anatômicas das anteras nos três estádios da flor durante a antese. A quantificação foi realizada por meio do *software UTHSCSA-Imagetool*.

O diâmetro dos grãos de pólen (µm), o diâmetro equatorial das anteras (µm), a área das anteras (µm<sup>2</sup>) e o número dos grãos de pólen por teca foram medidos diretamente por meio do uso do *software UTHSCSA-Imagetool*.

A partir do diâmetro do pólen e da antera, foram obtidos seus respectivos raios. Para a medição do volume do pólen (µm<sup>3</sup>) foi utilizada a Equação 1, onde V representa o volume do grão de pólen e r o raio do grão de pólen.

$$V = \frac{4}{3} (\pi r^3) \quad (1)$$

As tecas das anteras foram consideradas aproximadamente retangulares em secção transversal, e o diâmetro polar da antera ( $\mu\text{m}$ ) foi calculado pela Equação 2, onde DP representa o diâmetro polar da teca da antera.

$$\text{DP} = \text{área da antera} / \text{diâmetro equatorial da antera} \quad (2)$$

O volume de cada teca da antera ( $\mu\text{m}^3$ ) foi calculado pela Equação 3, onde VA representa o volume total da teca da antera.

$$\text{VA} = \text{área da antera em secção transversal} * \text{diâmetro polar} \quad (3)$$

Conhecendo-se o volume total da teca da antera e do grão de pólen, o número de grãos de pólen por teca foi estimado dividindo-se o volume da teca pelo volume médio dos grãos de pólen. O número de grãos de pólen por antera foi estimado multiplicando-se por 2 o número de grãos de pólen por teca.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos (estádios da flor durante a antese) e 13 repetições, totalizando um n de 39, tanto para a quantificação do volume da antera quanto para a do número de pólen por antera. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,01$ ).

#### **4.4 Microscopia eletrônica de transmissão**

Anteras frescas de flores funcionalmente masculinas nos três estádios da flor durante a antese foram separadas. Estas amostras foram imersas em fixador (Karnovisk modificado) por 24 horas, lavadas três vezes em tampão cacodilato e fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora, em capela. Posteriormente, as amostras foram lavadas duas vezes em água destilada, transferidas para a

solução de acetato de uranila 0,5% durante 12 horas a 4 °C e depois lavadas novamente em água destilada por três vezes. As amostras foram desidratadas em gradiente de acetona (em solução de água e acetona a 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 95 e 100%, por 10 minutos em cada concentração) e incluídas em soluções crescentes de resina Spurr/acetona (1:3, 1:2, 1:1, 2:1 por 12 horas cada, e resina pura por duas vezes, 24 horas cada). Posteriormente, as amostras foram montadas em moldes de silicone e colocadas para polimerizar em estufa a 70 °C por 8 horas. Após a polimerização, os blocos de resina contendo a amostra foram desbastados para retirar o excesso de resina e, em seguida, foram cortados em ultramicrotomo modelo Leica MT-Ultracut. Os cortes foram coletados em telas de cobre, contrastados em acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2%, por 3 minutos cada. Após a secagem, as amostras foram fotografadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo LEO 906 Zeiss.

As fotomicrografias foram avaliadas no *software* UTHSCSA-*Imagetool*, para a medição da espessura da exina e diâmetro dos núcleos, além da visualização da forma dos núcleos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos (estádios da flor durante a antese), 40 repetições, totalizando um número amostral de 120. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,01$ ).

#### **4.5 Viabilidade e diâmetro dos grãos de pólen**

A viabilidade dos grãos de pólen armazenados em *freezer* (-16 °C) foi testada por meio de coloração com carmim acético 1% e solução Alexander. Os grãos de pólen foram fixados em *Carnoy* por 48 horas, e posteriormente armazenados em etanol 70% até o momento das avaliações.

Para as análises com carmim acético 1%, anteras dos três estádios foram colocadas sobre uma lâmina com uma gota do corante, durante 5 minutos. Após este período, as anteras foram cobertas com lamínula e esmagadas para a extração dos grãos de pólen, que foram fotografados com uma câmera digital conectada a um microscópio *Olympus CX41*. As fotomicrografias foram utilizadas para quantificar o número de grãos de pólen viáveis (corados de vermelho) e não viáveis (não corados), nos diferentes estádios da flor durante a antese, por meio do uso do *software* de análise de imagem *UTHSCSA-Imagetool*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos (estádios da flor durante a antese), 7 repetições, com 4 campos por repetição, totalizando um número amostral de 84. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,01$ ). Foram realizadas quatro medições de viabilidade no período de um ano, em intervalos irregulares, aos 3,98, 9,47, 10,78 e 12,23 meses.

Além das avaliações de viabilidade, as fotomicrografias de grãos de pólen corados com carmim acético 1% foram utilizadas para a medição dos diâmetros dos grãos de pólen, por meio do uso do *software* *UTHSCSA-Imagetool*.

O delineamento experimental utilizado para a medição dos diâmetros foi o inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos (estádios da flor durante a antese), 2 repetições, com 28 campos por repetição, totalizando um número amostral de 168. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,01$ ).

Para as análises com a solução Alexander, anteras dos três estádios, com dois e 12 meses de armazenamento, foram colocadas separadamente sobre uma lâmina com duas gotas do corante, depois cobertas com lamínula e esmagadas. As lâminas foram vedadas com resina de nitrocelulose e armazenadas em caixas

úmidas dentro da geladeira (8 °C) por 24 horas. Após este período as lâminas foram avaliadas em microscópio *Olympus CX41* acoplado a uma câmera digital, sendo fotomicrografadas. O número de grãos de pólen viáveis (roxo) e não viáveis (verde) foram contados a partir das fotomicrografias no software de análise de imagens *UTHSCSA-Imagetool*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 3 tratamentos (estádios da flor durante a antese), 2 repetições, com 5 campos por repetição, totalizando um número amostral de 30. Para cada tratamento foram observados 1000 grãos de pólen. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott* ( $p < 0,01$ ).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Mesmo nas flores fechadas, os grãos de pólen já estavam perfeitamente formados no interior das anteras (Figuras 3C e 3D). Ao longo dos estádios da flor durante a antese ocorreram variações no volume das tecas das anteras ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 1). Em flores fechadas e em flores em pré-antese o volume das tecas não diferiu estatisticamente; já em flores em antese o volume das tecas foi menor. A redução do volume pode ser explicada devido à desidratação das anteras durante a deiscência, com consequente rompimento do estômio para a liberação dos grãos de pólen.



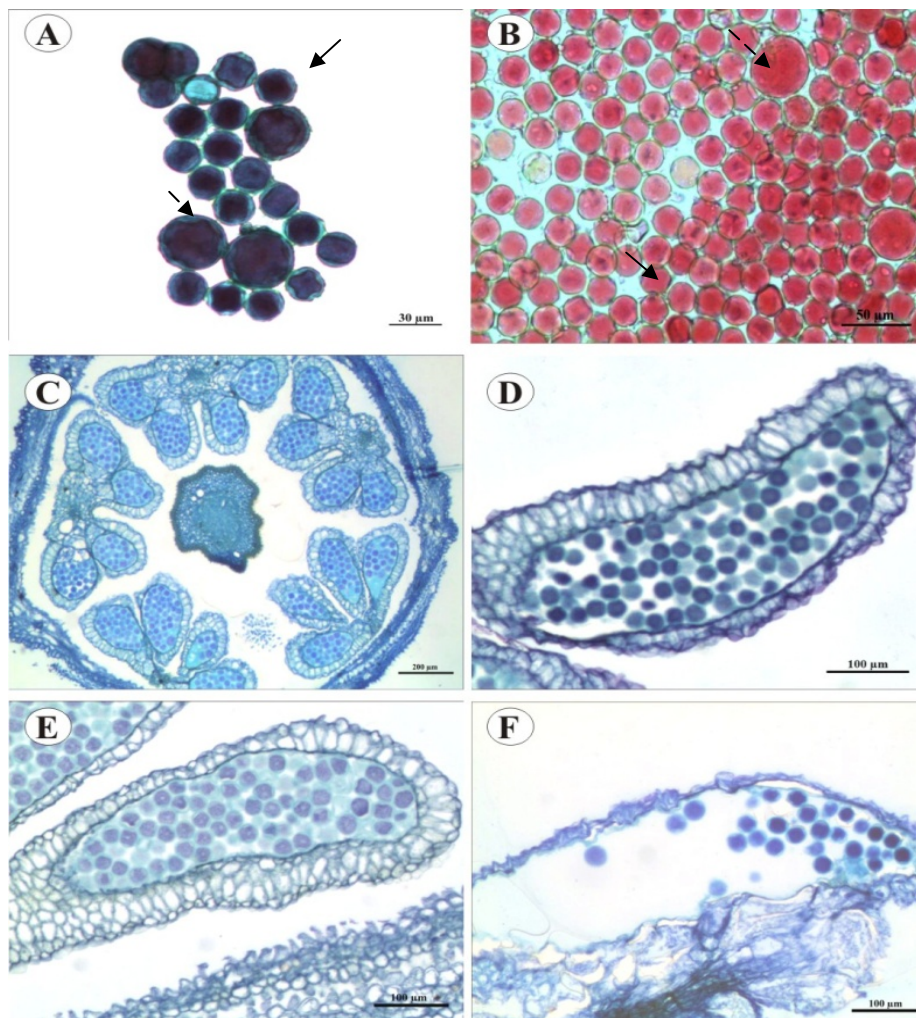


Figura 3 Anteras e pólen de *Toona ciliata*

Nota: (A) grãos de pólen  $n$  (seta) e  $2n$  (seta tracejada) corados com solução Alexander. A cor roxa indica que o pólen é viável, a azul indica pólen abortado. (B) grãos de pólen  $n$  (seta) e  $2n$  (seta tracejada) corados com carmim acético 1%. O vermelho intenso indica pólen viável; a cor clara, pólen inviável. (C) 5 anteras com duas tecas cada, em flor fechada e já mostrando a presença de grãos de pólen completamente formados. (D) detalhe de uma teca da antera de flor fechada em secção longitudinal, contendo grande quantidade de grãos de pólen. (E) detalhe de antera de flor em pré-antese, em secção longitudinal. (F) detalhe de antera de flor em antese em secção longitudinal, onde parte do pólen já foi disperso naturalmente.

Tabela 1 Variações nas médias do volume das tecas das anteras de *Toona ciliata* em função do estágio da flor durante a antese

Estádio	Volume (mm <sup>3</sup> )	Desvio padrão
E1	8473,72 a	1661,03
E2	8684,12 a	3963,70
E3	5550,97 b	2364,88

E1= flor fechada; E2= flor em pré-antese; E3= flor em antese. As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,01$ ).

Durante a antese também foram verificadas alterações no número de grãos de pólen por antera, nos diferentes estádios da flor ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 2). Estatisticamente, não houve diferença no número de grãos de pólen entre flores fechadas e flores em pré-antese. Contudo, flores em antese apresentaram menor número de grãos de pólen por antera, pois grande parte do pólen destas anteras já havia sido disperso naturalmente, como mostrado na Figura 3F. Anteras de flores fechadas e de flores em pré-antese abrigam 130% mais pólen que as anteras das flores em antese.

Tabela 2 Variações nas médias do número de grãos de pólen de *Toona ciliata*, por antera, em função do estágio da flor durante a antese

Estádio	Número de pólen por antera	Desvio padrão
E1	2.692 a	404
E2	3.276 a	1.570
E3	1.418 b	442

E1= flor fechada; E2= flor em pré-antese; E3= flor em antese. As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,01$ ).

Albuquerque Júnior et al. (2010) relataram médias de 3.431 e 2.981 grãos de pólen por antera, em duas cultivares de macieira. Esses valores são semelhantes aos encontrados em *Toona ciliata*. Nesta espécie cada flor contém 5

anteras e essa grande quantidade de pólen por antera é desejável para otimizar o processo de extração. Griffin et al. (1982) ressaltam que é desejável que o pólen esteja livre de tecidos da antera, para que se possa controlar a quantidade a ser aplicada.

Houve um aumento gradual no diâmetro dos grãos de pólen de acordo com o estágio durante a antese ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3). O acréscimo em diâmetro do E1 para o E2 pode ser atribuído ao aumento da espessura da exina na parede do grão de pólen. Este fato é reforçado por Pacini (1990), que relata que o volume do pólen aumenta durante a formação das camadas de exina e intina. O aumento em diâmetro do pólen observado do E2 para o E3 pode ser explicado pela expansão do pólen devido à presença de vacúolos, como relatado por Pacini, Jacquard e Clement (2011). Esse autor ressalta que a exina desempenha um papel fundamental na acomodação do volume do pólen durante a absorção e perda de água.

Tabela 3 Variações nas médias dos diâmetros dos grãos de pólen de *Toona ciliata* em função do estágio da flor durante a antese

Estádio	Diâmetro do pólen ( $\mu\text{m}$ )	Desvio padrão
E1	22,49 c	0,87
E2	23,07 b	1,03
E3	23,52 a	1,37

E1= flor fechada; E2= flor em pré-antese; E3= flor em antese. As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,01$ ).

O diâmetro dos grãos de pólen variou de 19,96 a 26,78  $\mu\text{m}$ , com média de 23,03  $\mu\text{m}$ . De acordo com a classificação de Walker e Doyle (1975), este diâmetro é considerado pequeno. Para azevém, Nunes et al. (2012) encontraram grãos de pólen variando entre 26,01 e 36,78  $\mu\text{m}$ . O pólen do abeto chinês apresenta diâmetro equatorial de 39,9  $\mu\text{m}$  e diâmetro polar de 37,4  $\mu\text{m}$

(ZHUOWEN, 2004). Para espécies do gênero *Manihot*, Vieira et al. (2012) observaram que os grãos de pólen são muito grandes, variando entre 129 e 163  $\mu\text{m}$ . Os grãos de pólen de *Cucurbita pepo* também são grandes, variando de 180-200  $\mu\text{m}$  (NEPI; PACINI, 1993).

A presença de nectários e de odor atrativo nas flores de *Toona ciliata* sugere que a espécie é polinizada por pequenos insetos, como ocorre em *Swietenia humilis*, conforme observado por Rosas et al. (2011). O tamanho reduzido do pólen pode facilitar sua dispersão por pequenos insetos, garantindo a polinização.

Houve diferença na espessura da exina ( $p < 0,0001$ ), de acordo com o estágio da flor durante a antese (Tabela 4). Na flor fechada, a espessura da exina do pólen foi menor, quando comparada com flores em pré-antese e em antese, as quais não apresentaram diferença na espessura.

Tabela 4 Variações nas médias da espessura da exina do pólen de *Toona ciliata* em função do estágio da flor durante a antese

Estádio	Espessura da exina ( $\mu\text{m}$ )	Desvio padrão
E1	0,94 b	0,08
E2	1,06 a	0,11
E3	1,08 a	0,16

E1= flor fechada; E2= flor em pré-antese; E3= flor em antese. As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,01$ ).

Furness (2007) sugere que a menor espessura da exina pode oferecer menor resistência à germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico. Portanto, a utilização do pólen coletado em flores fechadas pode representar uma vantagem durante a polinização de *Toona ciliata*.

A exina é composta de esporopolenina, um biopolímero elástico e resistente, que fornece proteção contra radiação ultravioleta, desidratação e ataque de patógenos (DOBRITSA et al., 2009).

Nas flores ainda fechadas o grão de pólen já estava com sua estrutura completamente formada, ilustrando a presença de exina, intina e com os dois núcleos já formados, além do citoplasma demonstrar todas as organelas aparentemente funcionais (Figura 4). A primeira divisão do núcleo resulta na formação de um núcleo vegetativo, maior, e outro reprodutivo, menor (TANAKA, 1993; XUE; LI, 2005; ZEE; YE, 2000; YEUNG et al., 2001; ZIENKIEWICZ et al., 2011). O núcleo vegetativo de *Toona ciliata* apresentou formato fusiforme (P/E 2,09), enquanto o reprodutivo foi esférico (P/E 0,92) (Figura 4).

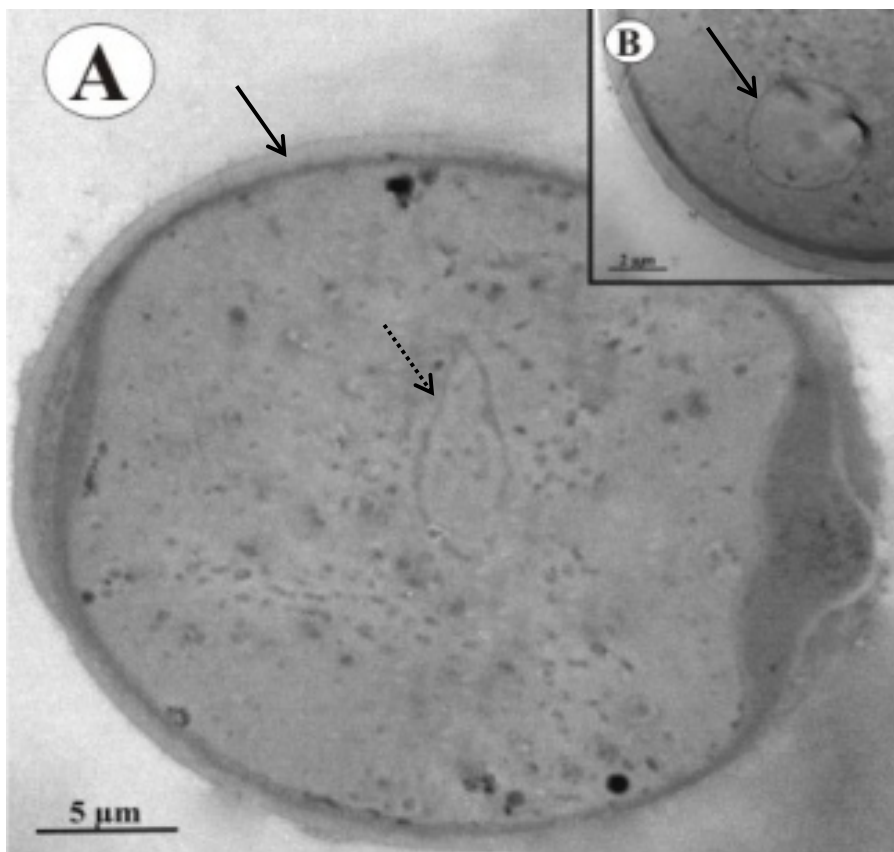


Figura 4 Eletromicrografia do grão de pólen de uma flor fechada de *Toona ciliata*

Nota: (A) camada mais clara de exina (seta) e núcleo vegetativo fusiforme (seta tracejada). (B) núcleo reprodutivo esférico (seta).

A avaliação com carmim acético 1% (Figura 3B) mostrou que a viabilidade foi afetada ao longo do tempo ( $p=0,0002$ ), porém, permaneceu alta; e que não foi influenciada pelo fator estágio ( $p=0,55$ ), ou seja, anteras podem ser coletadas em qualquer um dos estádios (Tabela 5).

Tabela 5 Percentual de viabilidade dos grãos de pólen de *Toona ciliata*, avaliada por meio do uso de carmim acético 1%, em função do estágio da flor durante a antese, em dois tempos de armazenamento

Estádio	T1	Desvio padrão	T2	Desvio padrão
E1	96,45 Aa	2,35	88,68 Ba	17,40
E2	95,22 Aa	2,79	93,14 Ba	6,07
E3	97,57 Aa	2,42	91,12 Ba	9,90

E1= flor fechada; E2= flor em pré-antese; E3= flor em antese. T1= 3,98 meses; T2= 12,23 meses. As médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott  $P < 0,05$  (colunas). As médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,01$ ) (linhas).

Diversos trabalhos mostraram alta viabilidade de pólen após a coleta, utilizando a coloração com carmim acético. Nunes et al. (2012), trabalhando com azevém, relataram que a viabilidade de pólen variou entre 89,6 e 99,3%. Para espécies de mandioca, Vieira et al. (2012) encontraram 88% de pólen viável. No presente trabalho foram encontrados valores de viabilidade semelhantes, porém, com grãos de pólen armazenados durante doze meses. Grãos de pólen de flores fechadas e de flores em antese exibiram o mesmo comportamento linear de redução da viabilidade ao longo do tempo de armazenamento (Figura 5).

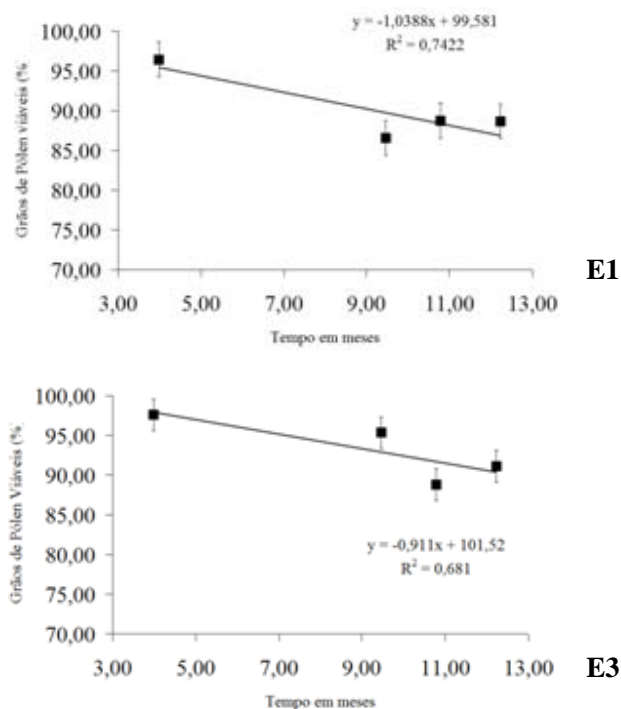


Figura 5 Viabilidade de pólen de *Toona ciliata*, em função do tempo, em dois estádios da flor durante a antese

Nota: E1= flor fechada; E3= flor em antese.

Pereira et al. (2002), trabalhando com clones de *Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla* obteve 40% de viabilidade após três meses de armazenamento, e considerou uma percentagem alta devido à quantidade de pólen empregada nas polinizações. Desta forma, os valores de viabilidade de pólen encontrados no presente trabalho podem ser considerados altos, capazes de garantir o sucesso de hibridações, utilizando pólen armazenado durante um período de 12 meses. Além disso, os grãos de pólen podem ser coletados em qualquer estágio da flor, pois todos apresentaram alta viabilidade.

A redução da viabilidade do pólen está relacionada com a diminuição do metabolismo durante o tempo de armazenamento (DAFNI; FIRMAGE, 2000).



Ainda assim o armazenamento de pólen em longo prazo é vantajoso, pois viabiliza programas de melhoramento de diversas espécies, além de conservar recursos genéticos (HECKER; STANWOOD; SOULIS, 1986).

A viabilidade dos grãos de pólen avaliada por meio do uso da solução Alexander (Figura 3A) foi alta (maior que 79,84%), e não foi afetada pelo estágio da flor durante a antese ( $p=0,17$ ) (Tabela 6). Desta forma, os grãos de pólen podem ser coletados em qualquer estágio da flor para serem armazenados e, posteriormente utilizados em polinizações controladas. A alta viabilidade observada no E1 confirma que os grãos de pólen já estavam perfeitamente formados e viáveis.

Tabela 6 Viabilidade dos grãos de pólen de *Toona ciliata*, avaliada por meio do uso da solução Alexander, em função do estágio da flor durante a antese

Estádio	Viabilidade do pólen (%)	Desvio padrão
E1	86,09 a	3,91
E2	79,84 a	10,56
E3	83,97 a	5,79

E1= flor fechada; E2= flor em pré-antese; E3= flor em antese. As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p<0,01$ ).

Outros autores também encontraram alta porcentagem de viabilidade utilizando a solução Alexander. Báez, Riveros e Lehnebach (2002) observaram que a viabilidade de pólen de *Nothofagus* foi de aproximadamente 60%. Vieira et al. (2012) relataram valores entre 88 e 95,3% de viabilidade em grãos de pólen de mandioca.

Na avaliação da viabilidade foram observados alguns grãos de pólen com tamanho maior, provavelmente pólen não reduzido ou pólen 2 n (Figuras 3A e 3B), os quais não passaram pela fase reducional da meiose. Eles são

produzidos por aberrações no processo meiótico e transferem grande parte das interações alélicas e não alélicas aos seus descendentes (OLIVEIRA; DAVIDE; PINTO, 1995).

Em *Toona ciliata* o diâmetro médio do pólen 2 n foi de 38,15  $\mu\text{m}$ , ou seja, 1,6 vezes maior que o pólen reduzido. Xue, Liu e Liu (2011) consideram que o diâmetro do pólen 2 n é aproximadamente 1,5 vezes maior que o do pólen reduzido. Isso pode ser explicado devido a maior quantidade de DNA em pólen 2 n, aumentando o seu diâmetro (DEWITTE et al., 2009). Diversos autores, dentre eles Tedesco, Battistin e Valls (1999), têm relatado que o diâmetro do pólen pode ser utilizado para distinguir diferentes níveis de ploidia.

Pólen 2 n tem sido utilizado com sucesso no melhoramento de alfafa (CALDERINI; MARIANI, 1997), uva (PARK et al., 2002), batata (OLIVEIRA; DAVIDE; PINTO, 1995), azevém (SALA et al., 1989) dentre outras espécies para aumentar a produtividade e a resistência às doenças por meio da formação de poliploides, que são plantas com células somáticas que contêm mais do que duas vezes o conjunto básico de cromossomos (DEWITTE et al., 2009). A poliploidia fornece maior variabilidade genética aos melhoristas (SIMIONI; SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2006). Em mandioca, poliploides são reconhecidos por sua superioridade em produtividade (OGBURIA; YABUYA; ADACHI, 2002). Em *Populus tomentosa*, por exemplo, Zhang et al. (2007) relatam que a produção de pólen 2 n em clones é uma ferramenta de seleção valiosa em programas de melhoramento. De acordo com Zhang et al. (2004), a formação de fusos anormais e a citocinese prematura na segunda divisão meiótica resultam na formação de pólen 2 n nessa espécie.

Em batata, Oliveira, Davide e Pinto (1995) encontraram frequência de pólen 2 n superior a 5% e viabilidade variando de 30 a 100%, indicando grande potencial para o melhoramento da espécie.

No caso de *Toona ciliata*, grãos de pólen 2 n apareceram em baixa frequência (0,68%), além de baixa viabilidade (33,64%). Os programas de melhoramento desta espécie ainda estão em fase inicial e, desta forma, a variabilidade genética existente ainda não foi explorada. Futuramente, contudo, grãos de pólen 2 n poderão ser utilizados para a obtenção de poliploides potencialmente mais robustos e melhor adaptados. Para isso, será necessário conhecer a frequência e a viabilidade de pólen 2 n de cada indivíduo selecionado, separadamente, para depois realizar os cruzamentos.

Para programas de melhoramento, é mais vantajoso coletar anteras em flor fechada, pois a exina do pólen é mais fina, a viabilidade é alta, há maior quantidade de pólen, além de evitar contaminações com pólen de indivíduos não selecionados.

## 6 CONCLUSÃO

- a) Os grãos de pólen de *Toona ciliata* são pequenos, perfeitamente formados e binucleados, desde o estágio de flor fechada;
- b) A espessura da exina do pólen é menor na flor fechada;
- c) O diâmetro do pólen aumenta de forma gradual durante os estádios da antese;
- d) O número de grãos de pólen por antera é menor na flor em antese;
- e) A viabilidade do pólen é alta em todos os estádios durante a antese, mesmo após um ano de armazenamento,
- f) Grãos de pólen grandes (provavelmente não reduzidos) aparecem em frequência e viabilidade baixas,
- g) O estágio de flor fechada é o mais indicado para a coleta de grãos de pólen para a realização de polinizações controladas em programas de melhoramento genético.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE JÚNIOR, C. L. et al. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, dez. 2010.

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

ASSIS, T. F. Melhoria genética do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 186, p. 32-51, 1997.

ASSIS, T. F.; BAUER, J. F. S.; TAFAREL, G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 3, n. 1, p. 161-170, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011**. Brasília, 2012. 150 p.

BÁEZ, P.; RIVEROS, M.; LEHNEBACH, C. Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in South Chile. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 40, n. 4, p. 671-678, Dec. 2002.

BRAGA, M. M. **Crescimento e qualidade de mudas de cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem var. *australis*) em função da aplicação de calcário e enxofre**. 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BYGRAVE, F. L.; BYGRAVE, P. L. **Growing Australian red cedar:** and other Meliaceae species in plantation. Barton: Rirde, 2005. 60 p. Disponível em: <[http://findarticles.com/p/articles/mi\\_7252/is\\_2\\_69/ai\\_n31677196/](http://findarticles.com/p/articles/mi_7252/is_2_69/ai_n31677196/)>. Acesso em: 13 set. 2011.

\_\_\_\_\_. Host preference of the Meliaceae shootborer *Hypsipyla*: further information from grafting *Cedrela odorata* and *Cedrela fissilis* on *Toona ciliata*

(Australian Red Cedar). **Australian Forestry**, Queen Victoria, v. 64, n. 4, p. 216-219, Aug. 2001.

CALDERINI, O.; MARIANI, A. Increasing 2 n gamete production in diploid alfalfa by cycles of phenotypic recurrent selection. **Euphytica**, Wageningen, v. 93, p. 113-118, June 1997.

CANGIANI, S. M. P. **Extração e armazenamento de pólen de *Eucalyptus camaldulensis***. Piracicaba: IPEF, 1998. 5 p. (Circular Técnica, 162).

CARVALHO, P. E. R. **Mogno (*Swietenia macrophylla*)**. Colombo: EMBRAPA, 2007. 11 p. (Circular Técnica, 140).

CIFLORESTAS. **Cedro australiano**. Disponível em: <[http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=cedro\\_australiano](http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=cedro_australiano)>. Acesso em: 13 out. 2011.

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

DEWITTE, A. et al. Occurrence of viable unreduced pollen in a Begonia collection. **Euphytica**, Wageningen, v. 168, p. 81-94, Feb. 2009.

DOBRITSA, A. A. et al. LAP3, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 22, p. 167-177, June 2009.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

FERREIRA, R. T. et al. *Toona ciliata* genotype selection with the use of individual BLUP with repeated measures. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 69, n. 3, p. 210-216, 2012.

FURNESS, C. A. Why does some pollen lack apertures?: a review of inaperturate pollen in eudicots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, p. 29-48, May 2007.

GONÇALVES, F. G.; OLIVEIRA, J. T. S. Resistência ao ataque de cupim-de-madeira-seca (*Cryptotermes brevis*) em seis espécies florestais. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 80-83, jan./mar. 2006.

GOUVÊA, C. F. **Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da família Meliaceae**. 2005. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2005.

GOUVÊA, C. F.; DORNELAS, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M. Floral development in the Tribe Cedreleae (Meliaceae, Sub-family Swietenioideae): *Cedrela* and *Toona*. **Annals of Botany**, London, v. 101, p. 39-48, Nov. 2008.

GRAU, A.; ZAPATER, M. A.; NEUMANN, R. A. Botánica y distribución del género *Cedrela* en el noroeste de Argentina. In: PACHECO, S.; BROWN, A. (Ed.). **Ecología y producción de cedro (género *Cedrela*) en las Yungas australes**. Buenos Aires: LIEY-ProYungas, 2006. p. 19-30.

GRIFFIN, A. R. et al. Processing *Eucalyptus* pollen for use in controlled pollination. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 31, n. 5/6, p. 198-203, 1982.

HAWK, J. L.; TEPEDINO, V. J. The effect of staminode removal on female reproductive success in a wyoming population of the endangered blowout penstemon, *Penstemon haydenii* (Scrophulariaceae). **Madroño**, San Francisco, v. 54, n. 1, p. 22-26, 2007.

HECKER, R. J.; STANWOOD, P. C.; SOULIS, C. A. Storage of sugarbeet pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, p. 777-783, 1986.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas: possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado**. Eschborn: GTZ, 1990. 343 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V. **Árvores exóticas no Brasil**: madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 385 p.

MENCK, A. L. M. et al. Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. **IPEF**, Piracicaba, n. 43/44, p. 20-23, jan./dez. 1990.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, abr./jun. 2008.

NASSUR, O. A. C. **Variabilidade das propriedades tecnológicas da madeira de *Toona ciliata* M. Roem. com dezoito anos de idade**. 2010. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

NASSUR, O. A. C. et al. Variações na qualidade de toras de *Toona ciliata* M. Roem. com dezoito anos de idade. **Cerne**, Lavras, 2013. No prelo.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**, London, v. 72, p. 527-536, May 1993.

NEWTON, A. C. et al. The mahogany shoot borer: prospects for control. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 57, p. 301-328, Aug. 1993.

NUNES, R. C. et al. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180-188, mar./abr. 2012.

OGBURIA, M. N.; YABUYA, T.; ADACHI, T. A cytogenetic study of bilateral sexual polyploidization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, p. 278-280, Oct. 2002.

OLIVEIRA, M. N.; DAVIDE, L. C.; PINTO, C. A. B. P. Mechanisms of 2n potato pollen formation in dihaploid *Solanum tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt. hybrid clones. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 3, p. 445-450, May/June 1995.



ORWA, C. et al. **Agroforestry database 4.0, *Toona ciliata***. Disponível em: <[http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Toona\\_ciliata.pdf](http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Toona_ciliata.pdf)>. Acesso em: 13 out. 2011.

PACINI, E. Harmomegathic characters of Pteridophyta spores and Spermatophyta pollen. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 5, p. S53-S69, 1990. Supplement.

PACINI, E.; JACQUARD, C.; CLEMENT, C. Pollen vacuoles and their significance. **Planta**, Berlin, v. 234, p. 217-227, June 2011.

PARK, S. M. et al. A tetraploid hybrid plant from  $4x \times 2x$  crosses in *Vitis* and its origin. **Euphytica**, Wageningen, v. 126, p. 345-353, Nov. 2002.

PEREIRA, R. C. **Alternativas para melhorar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus***. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PEREIRA, R. C. et al. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 60-69, 2002.

PINHEIRO, A. L.; LANI, L. L.; COUTO, L. **Cultura do cedro australiano para produção de madeira serrada**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 42 p.

PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 147-153, jan./fev. 2007.

ROSAS, F. et al. Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis* (Meliaceae). **Biological Conservation**, Essex, v. 144, p. 3082-3088, Nov. 2011.

SALA, C. A. et al. Cytological mechanism of  $2n$  pollen formation and unilateral sexual polyploidization in *Lolium*. **Euphytica**, Wageningen, v. 43, p. 1-6, 1989.

SANTOS, A. M. **Melhoramento genético do cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roemer var. *australis*)**. 2011. 64 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SCOCCHI, A. et al. Conservación de semillas de cedro australiano (*Toona ciliata*). **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n. 137, p. 22-25, 2006.

SIMIONI, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Sexual polyploidization in red clover. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 1, p. 26-31, Jan./Feb. 2006.

SIREGAR, I. Z.; SWEET, G. B. The impact of extraction and storage conditions on the viability of Radiata Pine Pollen. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, n. 1, p. 10-14, 2000.

SORAGI, L. C. **Qualidade de superfícies usinadas em madeira de *Toona ciliata* M. Roem.** 2009. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Lavras, 2009.

SOUZA, J. C. A. V.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A. **Cedro australiano (*Toona ciliata*)**. Niterói: Rio Rural, 2010. 12 p.

SOUZA, J. C. A. V. et al. Propagação vegetativa de cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 205-213, mar./abr. 2009.

STYLES, B. T. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on the tree breeding. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 21, n. 5, p. 175-182, 1972.

TANAKA, I. Development of male gametes in flowering plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 106, n. 1, p. 55-63, Feb. 1993.

TEDESCO, S. B.; BATTISTIN, A.; VALLS, J. F. M. Diâmetro dos grãos de pólen e tamanho dos estômatos em acessos diploides e tetraploides de *Hemarthria altissima* (Poiret) Stapf & Hubbard (Gramineae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 273-276, mar./abr. 1999.

VIEIRA, L. J. et al. Viability, production and morphology of pollen grains for different species in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 26, n. 2, p. 350-356, 2012.

WALKER, J. W.; DOYLE, J. A. The bases of angiosperm phylogeny: palynology. **Annals Missouri Botany Garden**, Saint Louis, v. 62, p. 664-723, 1975.

XUE, C.; LI, D. Embryology of *Megacodon stylophorus* and *Veratrilla baillonii* (Gentianaceae): descriptions and systematic implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 147, p. 317-331, Sept. 2005.

XUE, Z.; LIU, P.; LIU, M. Cytological mechanism of 2n pollen formation in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. 'Linglingzao'). **Euphytica**, Wageningen, v. 182, p. 231-238, May 2011.

YEUNG, E. C. et al. Anther, pollen and tapetum development in safflower, *Carthamus tinctorius* L. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 24, p. 307-317, May 2011.

ZEE, S. Y.; YE, X. L. Microtubule reorganization during pollen development of rice (*Oryza sativa* L.). **Protoplasma**, New York, v. 210, p. 188-201, Aug. 2000.

ZHANG, B. S. et al. A report of triploid *Populus* of the section *Aigeiros*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 53, n. 2, p. 69-75, 2004.

ZHANG, Z. et al. Incidence and molecular markers of 2n pollen in *Populus tomentosa* Carr. **Euphytica**, Wageningen, v. 154, p. 145-152, Dec. 2007.

ZHUOWEN, Z. Studies on pollination characteristics and pollination level of Chinese fir seed orchard. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 53, n. 1, p. 7-11, 2004.

ZIECH, R. Q. S. **Características tecnológicas da madeira de cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem) produzida no sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ZIENKIEWICZ, K. et al. Characterization of a caleosin expressed during olive (*Olea europaea* L.) pollen ontogeny. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 122, p. 2-15, 2011.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: J. Wiley, 1984. 505 p.