

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE PÓLEN DE CITROS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO E BORO

GERMINATION *IN VITRO* OF CITROS POLLEN UNDER DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CALCIUM AND BORON

PIO, Leila A. S.¹; SANTOS, Flávia C.²; RUFINI, José C. M.³; RAMOS, José D.⁴; ARAÚJO, Aparecida G.¹

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação de grãos de pólen em laranjeiras 'Valência', 'Natal' e 'Pêra'. Este trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa testou-se o nitrato de cálcio. Foi utilizado o meio de cultura básico contendo 10 g L⁻¹ de ágar, 100 g L⁻¹ de sacarose, acrescido de nitrato de cálcio nas concentrações de 400, 800, 1200, e 1400 mg L⁻¹ e pH ajustado para 6,5. Na segunda etapa, testou-se várias concentrações de ácido bórico (0, 200, 400 e 800 mg L⁻¹) com o melhor meio de cultura da primeira etapa. Melhores resultados para germinação de grãos de pólen foram obtidos com 800 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio, sendo na cultivar Valência superior às demais. Elevadas concentrações de nitrato de cálcio proporcionaram maior porcentagem de grãos de pólen rompidos. O maior índice de germinação foi obtida com 200 g L⁻¹ de ácido bórico para as variedades Natal e Pêra. Para a variedade Valência, a melhor germinação ocorreu na ausência de ácido bórico.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*, Palinologia, Viabilidade de pólen.

INTRODUÇÃO

A germinação de 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. 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 grãos que desenvolvem tubo polínico. A composição do meio e o pH estão entre os fatores que afetam a sua germinação. O pólen das angiospermas precisa de uma fonte de carbono, de boro e, freqüentemente de outros nutrientes para promover a sua germinação (GALLETTA, 1983).

Segundo PFAHLER (1967), a adição de boro tem importância, e suas respostas são variáveis conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. THOMPSON & 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.

PARTON et al. (2002), estudando a germinação de grãos de pólen em bromeliáceas concluiu que meio contendo 200 g L⁻¹ de sacarose, 10 g L⁻¹ de ácido bórico e 5 g L⁻¹ de ágar, apresentaram os melhores resultados.

HARIKAREENAKAR & HARIPRIYA (2000) estudaram a germinação e a viabilidade de pólen de cebola e constataram que a germinação e o desenvolvimento do tubo polínico eram maiores em meio contendo 1% de ágar, 100 ppm de ácido bórico e 5% de cinetina.

Aplicação de boro foliar em amêndoas reduziu a ruptura dos tubos polínicos durante a germinação e a adição de 100 mg L⁻¹ de boro na cultura aumentou a germinação de grãos de pólen *in vitro* (NYOMORA et al., 2000). BOMBEN, et al. (1999), estudando a germinação de grãos de pólen de kiwi obtiveram melhores resultados com a utilização de meio de cultura composto por 100 g L⁻¹ de sacarose, 0,025 g L⁻¹ de ácido bórico e 6 g L⁻¹ de ágar. CAMPOS ANDRADA & HILL (1999) observaram em tremoço que o meio de cultura contendo 20% de sacarose, 0,01 % de ácido bórico e 0,25% de ágar proporcionaram melhores resultados para germinação.

O cálcio adicionado ao meio de cultura para germinação de grãos de pólen propicia características fisiológicas como tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do mesmo com forma linear e aparência rígida (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974). Há maior permeabilidade da membrana do tubo polínico na ausência de cálcio, causando a liberação de metabólitos internos para o meio externo (STANLEY & LINSKENS, 1974). OLIVEIRA JÚNIOR (1996), pesquisando emissão de tubos polínicos em limoeiro cravo obteve bons resultados com concentração de 800 mg L⁻¹ de cálcio. BEYOUG (1965) observou, em 46 espécies hortícolas, que a adição de cálcio promoveu a germinação de pólen e o crescimento do tubo polínico em todas as espécies estudadas.

BREWBAKER & KWACK (1963), trabalhando com 86 espécies e 39 famílias, mostraram que adição de cálcio e boro atua como um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*. Em trabalhos sobre germinação de grãos de pólen de três cultivares de citros, após um período de um ano de armazenamento, SAHAR & SPIEGELROY (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 50 g L⁻¹ de sacarose; 0,2 g L⁻¹ de ácido bórico e 1,0 g L⁻¹ de nitrato de cálcio. TUINSTRA & WENDEL (2000), em experimentos com sorgo, observaram que em meio de cultura contendo 0,9 M de sacarose, 2,43 mM de ácido bórico e 2,12

¹ Eng. Agr., mestre em Fitotecnia, DAG/UFLA, e-mail: leilapio@ufla.com.br

² Acadêmica do curso de Agronomia- UFLA. Lavras – MG.

³ Eng. Agr., Dr. em Fitotecnia DAG/UFLA. Lavras – MG.

⁴ Eng. Agr., Dr., Professor DAG/UFLA. Lavras – MG.

(Recebido para Publicação em 29/10/2003, Aprovado em 04/03/2004)

mM de nitrato de cálcio a germinação de grãos de pólen foi aumentada.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das diferentes concentrações de boro e cálcio na germinação *in vitro* de grãos de pólen para variedades cítricas 'Valência', 'Natal' e 'Pêra'.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Os grãos de pólen utilizados foram obtidos de anteras de flores em estágio balão, das variedades Valência, Natal e Pêra. As anteras foram colhidas e colocadas em placas de Petri com papel de filtro para retirar a umidade e deixadas em uma temperatura de 26°C, durante 24 horas, para completar a deiscência.

Foram conduzidos dois experimentos. Para avaliar a melhor dose de cálcio foi utilizado o meio de cultura contendo 10 g L⁻¹ de ágar e 100 g L⁻¹ de sacarose, acrescido de diferentes concentrações de nitrato de cálcio (400, 800, 1200, e 1400 mg L⁻¹) e pH de 6,5. Para testar a melhor dose de boro foi realizado um segundo experimento utilizando como meio de cultura 10 g L⁻¹ de ágar e 800 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio, 100 g L⁻¹ de sacarose, combinando-se com diferentes concentrações de ácido bórico (0, 200, 400, e 600 mg L⁻¹). Em ambos experimentos, 10 ml de meio de cultura já contendo os tratamentos foram vertidos em placas de Petri, posteriormente o pólen de cada variedade foi distribuído sobre a superfície do meio com o auxílio de um pincel de modo a promover a distribuição homogênea do material. Os tratamentos foram mantidos sob condições de temperatura controlada em estufa tipo B.O.D. a 25°C e fotoperíodo constante de 24 horas.

Foi utilizado microscópio óptico com objetiva de 10 X para realizar a contagem e estimar a porcentagem de grãos de pólen germinados ou rompidos, após 24 horas de incubação. Foram considerados germinados, os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico fosse maior que o diâmetro do próprio.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foram contados 100 grãos de pólen por repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo pelo teste de Scott Knott ao nível de 1% para cálcio e variedades, não havendo interação significativa para os fatores estudados (Tabela 1).

A Figura 1A apresenta os resultados obtidos no primeiro experimento, referente à porcentagem de grãos de pólen germinados nas diferentes variedades. Pode-se observar que a variedade Valência mostrou-se superior às demais, com 10,24% de germinação.

Na Figura 1B, observa-se o número de grãos pólen germinados em diferentes concentrações de nitrato de cálcio. O melhor resultado foi obtido com a concentração de 800 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio, acima desta dosagem houve um decréscimo acentuado para a variável analisada. Estes resultados concordam com os autores que afirmam que o cálcio é essencial para a germinação dos grãos de pólen, bem como para o desenvolvimento do tubo polínico (KWACK

& BREWBAKER, 1963; BEYOUNG, 1965). OLIVEIRA JUNIOR (1996) também verificou que a melhor concentração de nitrato de cálcio é de 800 mg L⁻¹ para limoeiro cravo.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para grãos de pólen rompidos e grãos de pólen germinados de diferentes variedades cítricas submetidas a concentrações de cálcio. Lavras – MG. 2003.

Causas de variação	GL	Quadrado médio	
		Germinados (%)	Rompidos (%)
Variedades	2	198,809**	111,235**
Cálcio	4	99,411**	30,644**
Var. X Cálcio	8	5,897ns	7,292ns
Resíduo	45	3,598	10,095
C.V. (%)		26,95	73,37
Média Geral (%)		7,040	4,331

** diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade.

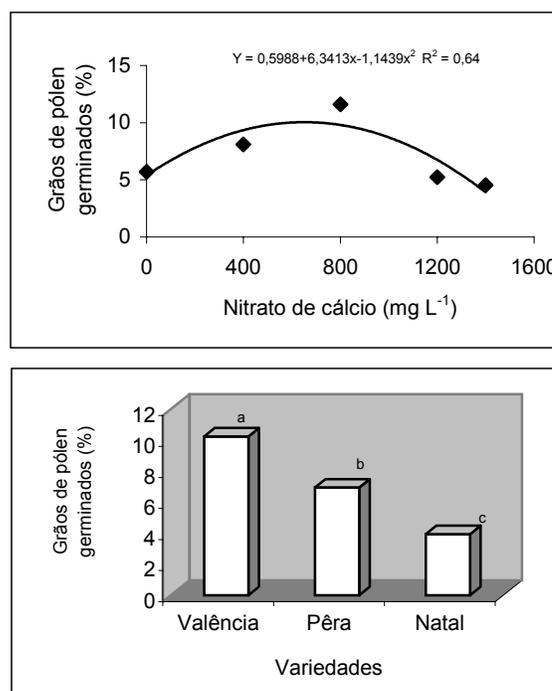


Figura 1 – Porcentagem de germinação de grãos de pólen (1A) em diferentes variedades de laranja e porcentagem de grãos de pólen germinados (1B) em diferentes dosagens de nitrato de cálcio. UFLA, Lavras-MG, 2003. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

As Figuras 2A e 2B mostram o número de grãos de pólen rompidos para variedades e diferentes concentrações de nitrato de cálcio. Pode-se observar que as variedades Pêra e Valência apresentaram os maiores índices de grãos de pólen estourados. Houve um efeito linear crescente no número de grãos de pólen estourados com o aumento da dosagem de nitrato de cálcio.

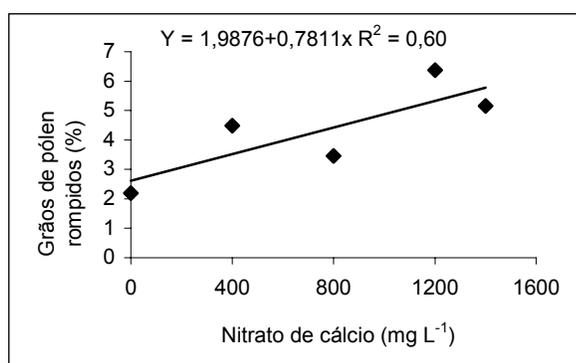
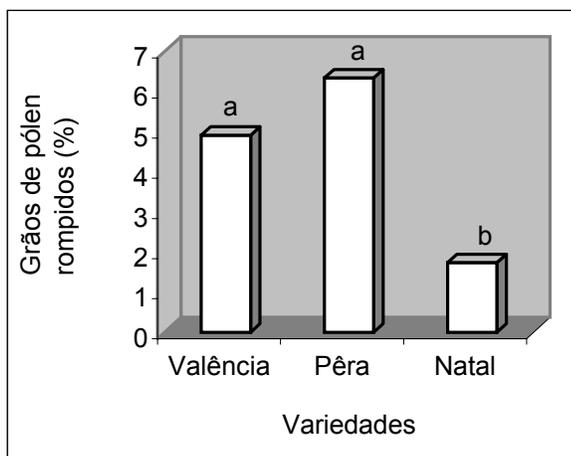


Figura 2 – Porcentagem de grãos de pólen rompidos (2A) em diferentes variedades de laranja e porcentagem de grãos de pólen rompidos (2B) em diferentes dosagens de nitrato de cálcio. UFLA, Lavras-MG, 2003. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Tabela 2 – Análise de variância para grãos de pólen rompidos e grãos de pólen germinados de diferentes variedades cítricas submetidas a níveis de ácido bórico. Lavras – MG. 2003.

Causas de variação	GL	Quadrado médio	
		Germinados (%)	Rompidos (%)
Variedades	2	30,691**	6,827ns
Boro	3	195,636**	126,210*
Var. X Boro	6	19,282**	8,7666ns
Resíduo	36	5,527	4,485
C.V. (%)		49,91	82,89
Média Geral (%)		4,710	2,555

** e *significativos ao nível de 1 e 5 % de probabilidade respectivamente.

Estes resultados mostram que é necessário um correto ajuste na dosagem de nitrato de cálcio para a germinação de grãos de pólen de citros. Altas dosagens podem ocasionar

um aumento de grãos de pólen rompidos e um baixo índice de grãos de pólen germinados.

Segundo AKAMINE & GIROLAMI (1959), tubos polínicos se rompem devido, entre outros fatores, a alta umidade e a variação do meio, ocasionadas pelo aumento da pressão osmótica e da baixa resistência da parede celular.

A análise de variância mostrou que houve diferença significativa entre as variedades e as diferentes doses de ácido bórico pelo teste de Scott Knott ao nível de 1% de probabilidade, ocorrendo também interação entre esses dois fatores (Tabela 2).

Para os grãos de pólen das variedades Pêra e Natal, a germinação ocorreu na presença de ácido bórico no meio de cultura, sendo o melhor tratamento a adição de 200 mg L⁻¹ deste nutriente. Entretanto, a variedade Valência apresentou melhor germinação na ausência de ácido bórico, como mostra a Figura 3.

A resposta do boro para a germinação e formação do tubo polínico está de acordo com as informações de BREWBAKER & KWACK (1963), que sugeriram que cálcio e boro são elementos essenciais para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro*.

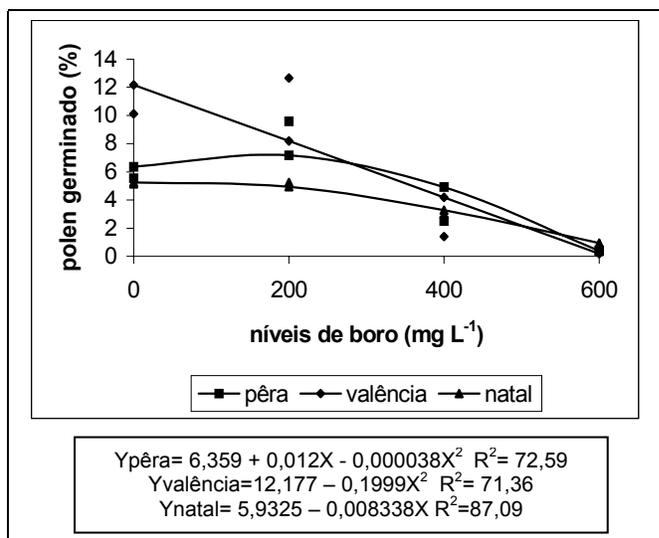


Figura 3 – Porcentagem de grãos de pólen rompidos em variedades de laranja em diferentes dosagens de ácido bórico. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Analisando os resultados de grãos de pólen rompidos (Figura 4), observou-se que com o aumento das dosagens de ácido bórico houve um decréscimo linear na porcentagem de grãos de pólen germinados. Por estes resultados, deduziu-se que na ausência de boro obteve-se um maior rompimento das membranas do tubo polínico dos grãos de pólen, liberando o conteúdo citoplasmático para o meio exterior.

REFERÊNCIAS

AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Honolulu: Hawaii Agricultural Experimental Station, University of Hawaii, 1959, 44p. (Technical bulletin, 39).

BEYOUNG, H.K. The effects of calcium on pollen germination. **American Society of Horticultural Science**, v.86, p.818-823, 1965.

BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi, 1974. 264p.

BOMBENC, D.; MALOSSINIC, P.M.; CIPRIANIG, H. et al. Long term storage of kiwifruit pollen. **Acta Horticulturae**. Santiago, n.498, p.105-108, 1999

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

CAMPOS ANDRADA M.P.; HILL G.D. Storage and longevity of *Lupinus luteus* L. pollen. **Towards the 21st century**. Oeiras, v.11, n.16, p.321-326, 1999.

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

HARIKARUNAKAR D.; HARIPRIYA K. Floral biology of aggregatum onion (*Allium cepa* var. aggregatum). **Madras Agricultural Journal**, Chidambaram, v.86, n. 1-3, p.166-169, 2000.

NYOMORA, M.S.; BROWN, P.H.; PINNEY, K. et al.. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Davis, v.125, n.2, p.265-270, 2000.

OLIVEIRA JÚNIOR, A.F.de; RAMOS, J.D.; SANÁBIO, D. et al. **Efeito do Cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba, **Abstract...** Curitiba: SBF, 2000, p.419.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R. et al. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**. Belgium, v.125, n.2, p.155-161, 2002

PFÄHLER, P.L. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen; calcium and boron effects. **Canadian journal of Botany**, Toronto, v.45, p.839-845, 1967.

SAHAR, N.; SPIEGELROY, P. *Citrus* pollen storage. **Hort Science**, St. Joseph, v.15, n.1, p.81-82, 1980

SILVA, M. M.; BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. et al. Fatores que afetam a germinação de grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n12, v.347-352, 1999.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer – Verlag, 1974, 172p.

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

TUINSTRÁ, M.R.; WEDEL, J. Estimation of pollen viability in grain sorghum. **Crop Science**, Manhattan, USA. v.40, n.4, p. 968-970, 2000.

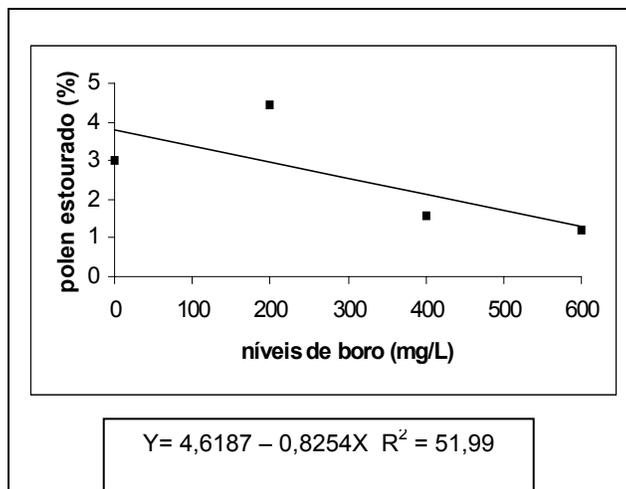


Figura 4 – Porcentagem de grãos de pólen rompidos em variedades de laranja em diferentes dosagens de ácido bórico. UFLA, Lavras-MG, 2003.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of nitrate of calcium and boric acid in germination of orange pollen (Valencia, Natal and Pêra). Experiments were performed in two steps. As or control medium for *in vitro*, it was used agar 10 g L⁻¹, sucrose 100 g L⁻¹, pH adjusted for 6,5. Other treatments of calcium nitrate in the concentrations of 400, 800, 1200, and 1400 mg L⁻¹ were applied. In the second experiment several concentrations of boric acid (0, 200, 400 and 800 mg L⁻¹) were tested using the same medium culture, as control. Better results for pollen germination were obtained with 800 mg L⁻¹ of nitrate of calcium and cv. Valência was superior to the others. Elevated concentrations of calcium nitrate provide larger percentage of pollen grains burst. The highest germination percentage was obtained with 200 g L⁻¹ of boric acid for the varieties Natal and Pêra. For the variety Valencia, the best germination was obtained in the absence of boric acid.

Key words: *Citrus sinensis*, palinology, pollen viability

CONCLUSÃO

A melhor germinação de grãos de pólen é obtida com 800 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio.

O boro na concentração de 200 mg L⁻¹ estimula a germinação de grãos de pólen das variedades Pêra e Natal. A variedade Valência apresenta melhor porcentagem de grãos de pólen germinados na ausência de ácido bórico.

A quantidade de grãos de pólen rompidos é maior na ausência de boro para todas as variedades.