



## DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO BÓRICO E NITRATO DE CÁLCIO ACRESCIDAS AO MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO *in vitro* DE GRÃOS DE PÓLEN DE GENÓTIPOS DE PEREIRA

**GONCALVES, Ciane Xavier<sup>1</sup>; RUFATO, Andrea De Rossi<sup>2</sup>; DEGENHARDT, Jutlana<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Bióloga - Mestranda do PPGA - Fruticultura de Clima Temperado/UFPel e-mail: [anexq@hotmail.com](mailto:anexq@hotmail.com)  
<sup>2</sup>Bolsista Capes; <sup>3</sup>profª. Drª. Departamento de Fitotecnia/UFPel; <sup>3</sup>Drª. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado - Melhoramento Genético Vegetal e Biotecnologia de Plantas

### 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura da pereira é antiga e existem coleções de cultivares com numerosas introduções. Na Região Sul são utilizadas como cultivares copa, pereiras do tipo européia (*Pyrus communis* L.), japonesas [*Pyrus pyrifolia* (Burn.) Nak.], chinesas (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) e híbridas, enquanto que *Pyrus calleryana* (Dcne.), *Pyrus betulaeifolia* Bge. e marmeleiros são usados com porta-enxerto (Faoro, 2001; Nakasu & Faoro, 2003; Camelatto et al., 2003).

A viabilidade do grão de pólen pode ser avaliada por meio de polinização direta no estigma da flor, ou seja, *in vivo* e por germinação em meio artificial específico, ou seja, *in vitro*. Os grãos de pólen das angiospermas geralmente precisam de fontes de carbono, boro e de outros nutrientes para que sua germinação seja promovida (Galletta, 1983). Os componentes mais importantes do meio de cultura para a germinação de pólen têm sido combinações de concentrações de açúcares e de ácido bórico (Miranda & Clement, 1990), além do cálcio, devido a sua importância na manutenção da integridade da membrana (Van Steveninck, 1965; Kell & Donath, 1990; Sheen et al., 1992).

Em trabalhos sobre germinação de grãos de pólen de três cultivares de citros, após um período de um ano de armazenamento, a germinação foi estimulada com a utilização de ácido bórico e nitrato de cálcio (Sahar & Spiegelroy, 1980). E ainda, em trabalhos com 86 espécies e 39 famílias, verificou-se que a adição de cálcio e boro atua como fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro* (Brewbaker & Kwack, 1963).

Com o presente trabalho objetivou-se testar a influência do ácido bórico e do nitrato de cálcio sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen, para diferentes genótipos de pereira.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Vegetal, da Embrapa Clima Temperado - CPACT, Pelotas/RS. Os genótipos estudados foram as cultivares copa Carrick e Packham's 01 e a seleção Monte Bonito. A cultivar Carrick e a seleção Monte Bonito, foram coletadas em 06/10/2003 e 01/09/2006,

enquanto que para a cultivar Packham's 01 não se tem registro de coleta. A temperatura de 20°C e o tempo de uma hora de incubação utilizados, foram estabelecidos em função das melhores condições de germinação dos grãos de pólen *in vitro*, baseado em resultados de experimentos anteriores.

As flores em estágio de balão foram coletadas no campo, durante a primavera. Em laboratório, com a fricção das flores em uma peneira fina de náilon, as anteras foram removidas dos botões florais e, em seguida, foram colocadas para secar em bandejas de papel por aproximadamente 30 horas, à temperatura entre 20 e 25°C. Após, o pólen e as anteras secas foram armazenados em frascos de vidro etiquetados e tampados com algodão. Logo, foram colocados em dessecador e armazenados em freezer à temperatura de -18°C. Ao meio de cultura básico, composto de 100 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 g L<sup>-1</sup> de ágar, descrito por Medeiros (1979), acrescentou-se diferentes combinações de ácido bórico e nitrato de cálcio, compondo os seguintes tratamentos: T1 - 0 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/0 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T2 - 0 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/400 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T3 - 0 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/800 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T4 - 0 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/1200 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T5 - 200 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/0 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T6 - 200 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/400 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T7 - 200 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/800 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T8 - 200 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/1200 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T9 - 400 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/0 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T10 - 400 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/400 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T11 - 400 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/800 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>; T12 - 400 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/1200 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup>. O volume foi completado com água destilada e após a diluição dos componentes, o meio foi geleificado com ágar e aquecido em forno de microondas durante quatro minutos. Após o preparo este foi distribuído em lâminas de vidro, próprias para observação em microscópio óptico, adaptadas com dois anéis de PVC, com um conta-gotas foram colocadas quatro gotas de meio de cultura, em cada anel. Para a distribuição homogênea dos grãos de pólen fez-se necessária à observação em lupa e o uso de um pincel (n<sup>o</sup>5). Em seguida, as lâminas foram acondicionadas em placas de Petri® que continham duas folhas de papel absorvente umedecido; e incubadas em estufa tipo BOD.

A avaliação da porcentagem de grãos de pólen germinados foi feita através da observação em microscópio óptico binocular (10x100). Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen. A contagem dos campos de visão do microscópio foi feita até que se atingisse a soma de 100 grãos de pólen entre germinados e não germinados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições (contagem de 100 grãos de pólen cada) por genótipo estudado. As médias foram submetidas à análise da variância através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as amostras da cultivar Carrick e da seleção Monte Bonito, as maiores porcentagens de germinação de grãos de pólen *in vitro* ocorreram quando estas amostras foram submetidas aos tratamentos T1 (controle), T5 e T9, ou seja, o acréscimo de ácido bórico ao meio de germinação não influenciou na germinação, já o acréscimo de nitrato de cálcio foi prejudicial. Tais resultados foram semelhantes para a amostra da cultivar Packham's 01, porém no tratamento T2, esta também apresentou elevado índice de germinação, onde o acréscimo de 400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio foi positivo para a germinação (Tabela 1).

A adição de ácido bórico ao meio de germinação de grãos de pólen foi observada por Freitas et al. (2006). Os mesmos autores verificaram que a

porcentagem de germinação era aumentada para as variedades de pereira Taiwan Nashi-C e Taiwan Mamenashi, com o uso de 794 e 838 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Pio et al. (2004), trabalhando com germinação de pólen *in vitro* de citros, constataram que para as variedades Pêra e Natal as maiores percentagens de grãos de pólen germinados foram obtidas quando utilizou-se 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico. Porém estes mesmos autores constataram que para a variedade Valência a melhor percentagem de germinação ocorreu na ausência de ácido bórico. Chagas et al. (2006) trabalhando com nectarineira observaram que não há necessidade de adição de ácido bórico para que ocorra à germinação dos grãos de pólen desta espécie.

Tabela 1 - Percentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen das cultivares Carrick e Packham's 01 e da seleção Monte Bonito, variando a concentração de ácido bórico e nitrato de cálcio no meio de cultura, incubadas durante uma hora a temperatura de 20°C em 800. FAEM/UFPel, Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2007.

Tratamento	Genótipos				
	Concentrações		Cultivares		Seleção
	(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) mg L <sup>-1</sup>	(Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) mg L <sup>-1</sup>	Carrick	Packham's 01	Monte Bonito
T1	0	0	38,00 A a	56,25 A b	61,50 A a
T2		400	23,75 B a	59,25 A a	23,75 B b
T3		800	16,00 BC a	38,00 B a	25,00 B ab
T4		1200	07,25 C a	07,25 C b	03,75 C a
T5	200	0	37,75 A a	65,25 A a	58,50 A a
T6		400	23,00 B a	52,75 B a	39,75 B a
T7		800	21,25 B a	42,00 C a	29,25 C a
T8		1200	05,75 C a	28,75 D a	09,25 D a
T9	400	0	23,00 A b	52,50 A b	43,50 A b
T10		400	13,50 B b	31,00 B b	22,00 B b
T11		800	07,00 B b	26,75 B b	17,75 BC b
T12		1200	05,00 B a	10,25 C b	09,25 C a
CV (%)			17,38		

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna para cada concentração de ácido bórico e minúscula na coluna com a mesma concentração de nitrato de cálcio em cada concentração de ácido bórico não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

#### 4. CONCLUSÕES

O meio de cultura básico ou acrescido de 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico promove elevados índices de germinação *in vitro* de grãos de pólen para as amostras dos três genótipos estudados ('Carrick', 'Pakham's 01' e 'Monte Bonito').

As cultivares de pereira estudadas, de uma maneira geral respondem de modo semelhante à adição de ácido bórico e nitrato de cálcio ao meio de cultura, sendo que a percentagem de germinação é diminuída quando acrescenta-se a concentração de 1200 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, independente da concentração de ácido bórico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CHAGAS, E. A.; PIO, R. B. W.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; FRACAROLLI, B. B. C.; MENDONÇA, V.; ONO, T. K. Efeito da adição de nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação *in vitro* de polens de nectarineira. CONGRESSO PÓS-GRADUAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Anais ... Lavras, 2006. Brasil. CD-ROM.

CAMELATTO, D.; NACHTIGALL, G.R.; ARRUDA, J.J.P.; HERTER, F.G. Efeito De Flutuações de Temperatura, Horas de Frio Hibernai e Reguladores de Crescimento no Abortamento de Gemas Florais de Pereiras. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal-SP, v.22, n.1, p.111-117, 2003.

FAORO, I. D. Morfologia e fisiologia. In: EPAGRI. Nashi, a pêra japonesa, Florianópolis: Epagri/Jica, 2001. p.67-94.

FREITAS, D. A. F.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; SAITO, 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, 2006. Brasil.

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

KELL, A.; DONATH, E. Effect of ionophore A-23187 on plasma membrane integrity in isolated protoplasts of *Avena sativa*. Plant Science., v.69, p.35-138, 1990.

MEDEIROS, A. R. M. Efeito da temperatura controlada na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico em pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 5., Pelotas, 1979. Anais ... Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.2, p. 407-416.

NAKASU, B. H.; FAORO, I. D. Cultivares. In: Frutas do Brasil-46. Pêra Produção. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.29-36.

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, v.1, n.3, p.293-296, 2004.

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

SHEEN, V.L.; DREYER, E.B.; MACKLIS, J.D. Calcium-mediated neuronal degeneration following singlet oxygen production. NeuroReport, n.3, p.705-708, 1992.

VAN STEVENINCK, R. F. M. The significance of calcium on the apparent permeability of cell membrane and the effects of substitution with divalent ions. Physiology Plant. n.18, p.54-69, 1965.

VISSER, T. Germination and storage pollen. Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen, Nederland, n.55, v1, p.1-68, 1955.