



CAROLINA RUIZ ZAMBON

**MEIO DE CULTURA PARA A GERMINAÇÃO
DE GRÃOS DE PÓLENS DE CULTIVARES DE
MARMELEIROS (*Cydonia oblonga* Mill.)**

LAVRAS - MG

2014

CAROLINA RUIZ ZAMBON

**MEIO DE CULTURA PARA A GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN
DE CULTIVARES DE MARMELEIROS (*Cydonia oblonga* Mill.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Biologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Rafael Pio

LAVRAS -MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Zambon, Carolina Ruiz.

Meio de cultura para germinação de grãos de pólen de
cultivares de marmeleiros (*Cydonia oblonga* Mill.) / Carolina Ruiz
Zambon. – Lavras : UFLA, 2014.

39 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Rafael Pio.

Bibliografia.

1. Marmelo - Melhoramento genético. 2. Taxa de germinação.
3. Viabilidade polínica. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 583.372

CAROLINA RUIZ ZAMBON

**MEIO DE CULTURA PARA A GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLENS
DE CULTIVARES DE MARMELEIROS (*Cydonia oblonga* Mill.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração Biologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2014

Dr. Rafael Pio	UFLA
Dr. Adelson Francisco de Oliveira	EPAMIG
Dr. Pedro Henrique Abreu Moura	UFLA

Dr. Rafael Pio
Orientador

LAVRAS - MG
2014

A minha família e ao meu noivo, Luiz Fernando,

DEDICO.

OBRIGADA PELO CARINHO NESSA JORNADA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de realizar este trabalho;

A minha família, pelo apoio e torcida;

Ao meu noivo, Luiz Fernando de Oliveira da Silva, pelo carinho, paciência e cumplicidade durante esses anos;

Aos meus grandes amigos: Adriana Tiemi Nakamura, Edson Simão e Jun, que me receberam em Lavras, assim como minha grande amiga Luciana Gomes, todos sempre presentes com bons conselhos e atitudes.

A todos os meus colegas do programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pois conseguimos passar juntos por todas as disciplinas, provas trabalhos e experimentos sempre com muito bom humor e irreverência;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Pós- Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade;

A todos os integrantes da Fazenda Experimental da Epamig em Maria da Fé, em especial ao pesquisador Dr. Adelson Francisco de Oliveira, pela oportunidade de trabalho no início da minha carreira;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida durante a realização do curso e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro na condução da pesquisa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Pio, por conduzir e apoiar meu trabalho ao longo desses dois anos;

Aos colegas do pomar, em especial à Kelly, Madeleine, Arnaldo e Danilo, pela ajuda e prontidão durante esse tempo;

A todos os colegas que direta ou indiretamente, ajudaram-me a concluir mais essa etapa...

OBRIGADA.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia. Porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

Visando dar suporte a trabalhos de melhoramento genético do marmeleiro, objetivou-se ajustar o meio de cultura básico para a germinação de grãos de pólen de diferentes cultivares de marmeleiros (Alaranjado, Alongado, Apple, BA29, Bereckzy, Champion, Cheldow, Constantinopla, CTS 207, Dangers, De Patras, De Vranja, Dulot, Fuller, Mendoza INTA 37, Kiakami, Lajeado, Meech Prolific, Meliforme, Pineapple, Portugal, Provence, Radaelli, Rea's Mamouth, Smyrna, Van Deman e Zuquerineta). O pólen utilizado para o ajuste do meio de cultura básico foi obtido de anteras provenientes de flores em estágio de balão da cultivar Portugal. Em seguida, com auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram espalhados sobre a superfície de placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura de acordo com as seguintes etapas: 1) concentrações de ágar (4, 6, 8 e 10 g L⁻¹) e valores de pH (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5); 2) concentrações de sacarose (0, 30, 60 e 90 g L⁻¹); 3) concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg L⁻¹); 4) concentrações de ácido bórico (0, 400, 800 e 1200 mg L⁻¹); e 5) tempo de emissão do tubo polínico (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a inoculação), os quais foram montados de forma sequencial. Após esse procedimento, avaliou-se a taxa de germinação dos grãos de pólen das 27 cultivares, além do número de estames, número de grãos de pólen por antera e por flor. Realizando-se as leituras da porcentagem de germinação, após cinco horas de incubação, concluiu-se que o meio de cultura para a germinação de grãos de pólen do marmeleiro deve ser acrescido de 68 g L⁻¹ de sacarose e 366 mg L⁻¹ de ácido bórico, sendo o pH aferido para 5,8 e o meio solidificado com 10 g L⁻¹ de ágar. Há diferenças entre as cultivares quanto à capacidade germinativa e a quantidade de grãos de pólen, o que pode influenciar na quantidade de flores necessárias para a extração das anteras nos cruzamentos e no sucesso das hibridações à campo.

Palavras-chave: Melhoramento genético, taxa de germinação, viabilidade polínica.

ABSTRACT

Aiming to give support to genetic breeding works of the quince tree, it was intended to adjust the basic culture medium to the germination of pollen grains of different quince cultivars (Alaranjado, Alongado, Apple, BA29, Bereckzy, Champion, Cheldow, Constantinopla, CTS 207, Dangers, De Patras, De Vranja, Dulot, Fuller, Mendoza INTA 37, Kiakami, Lajeado, Meech Prolific, Meliforme, Pineapple, Portugal, Provence, Radaelli, Rea's Mamouth, Smyrna, Van Deman and Zuquerineta). The pollen utilized for the adjustment of the basic culture medium was obtained from anthers coming from flower at balloon stage of the cultivar Portugal. Next, with the aid of a brush, the pollen grains were spread on the surfaces of the Petri dishes, containing 20 mL of culture medium according to the following steps : 1) concentrations of agar (4, 6, 8 and 10 g L⁻¹) and pH values (3.5; 4.5; 5.5 and 6.5); 2) concentrations of sucrose (0, 30, 60 and 90 g L⁻¹); 3) concentrations of calcium nitrate (0, 200, 400 and 800 mg L⁻¹); 4) concentrations of boric acid (0, 400, 800 and 1,200 mg L⁻¹); and 5) time of emission of pollen tube (0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours after inoculation), which were mounted in a sequential manner. Afterwards, the grain germination rate of the pollen grains of the 27 cultivars was evaluated, in addition to the number of stamens, number of pollen grains per anther and per flower. By performing the readings of the germination percentage after five hours of incubation, it follows that the culture medium for the germination of quince pollen grains should be added of 68 g L⁻¹ of both sucrose and 366 mg L⁻¹ of boric acid, pH being gauge to 5.8 and the medium solidified with 10 g L⁻¹ of agar. There are differences among the cultivars as to the germination capacity and the amount of pollen grains, which can influence on the amount of flours needed for the extraction of anthers in the crosses and in the success of the filed hybridizations.

Key words: Genetic breeding, germination rate, pollen viability.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen do marmeleiro 'Portugal' quando submetidos a diferentes pH e concentrações de ágar (g L^{-1}) do meio de cultura (A), diferentes concentrações de sacarose (g L^{-1}) (B). UFLA, Lavras, MG, 2013..... 26
- Figura 2 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de marmeleiro 'Portugal' diferentes concentrações de nitrato de cálcio (mg L^{-1}) (A), diferentes concentrações de ácido bórico (mg L^{-1}) (B) e diferentes tempos de incubação para germinação do grão de pólen (horas) (C). UFLA, Lavras, MG, 2013..... 29
- Figura 3 Tabela 1 Germinação média, número de anteras por flor, número de pólen por antera e número de pólen por flor de diferentes cultivares de marmeleiro. UFLA, Lavras, MG, 2013..... 31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 ASPECTOS GERAIS DO MARMELEIRO	14
2.2 BOTÂNICA E DESCRIÇÃO	15
2.3 POLINIZAÇÃO, FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO FRUTO	16
2.4 TESTES DE GERMINAÇÃO ‘IN VITRO’	17
A) PROCEDIMENTO FLUOROCROMÁTICO (FCR)	18
B) TESTES DO CONTEÚDO CELULAR COM CORANTES	18
C) GERMINAÇÃO DO PÓLEN EM MEIO ARTIFICIAL	19
3. METODOLOGIA	21
3.1 ETAPA 1	22
3.2 ETAPA 2	23
3.3 ETAPA 3	24
3.4 ETAPA 4	25
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

A rusticidade comparada às demais frutíferas de clima temperado e a possibilidade de cultivo em praticamente todas as áreas que apresentam inverno ameno, tornam o marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) uma opção de cultivo interessante para muitos produtores que se dedicam à fruticultura (PIO et al., 2009). Os marmelos são muito usados na culinária para fabricação de marmeladas, compotas e geleias (ALVARENGA et al., 2008), alternativas promissoras para agricultura familiar em regiões turísticas, em razão da agregação de valores na transformação da polpa em doces e da escassez de marmeladas caseiras no mercado.

Atualmente, no Estado de Minas Gerais concentra-se a maior área cultivada com marmeleiros no Brasil. Apesar de possuir hábito caducifólio e requerer certa quantidade de frio durante o período de dormência, outros estados como Bahia e Goiás vêm cultivando comercialmente essa frutífera (BETTIOL NETO et al., 2011).

Pelo exposto, percebe-se que há interesse pelo cultivo de marmelos em regiões subtropicais e tropicais, no entanto, somente a cultivar Portugal vem sendo explorada comercialmente (PIO et al., 2008). Existem outras cultivares com potencial produtivo similar ao 'Portugal', como 'Smyrna', 'Mendoza INTA-37', 'Fuller' e 'Provence' em regiões subtropicais (BETTIOL NETO et al., 2011) e até mesmo superiores, como 'Lageado' e 'De Patras' em regiões mais frias (FIORAVANÇO et al., 2006).

Assim, há necessidade de intensificar o programa de melhoramento de marmeleiro no Brasil, voltados para a seleção de cultivares altamente produtivas, aptas a serem cultivadas em regiões subtropicais e produtoras de doces de qualidade superior. Ainda, pode-se selecionar cultivares a serem utilizadas como

porta-enxertos para pereiras, a fim de propiciarem plantas de porte reduzido e maximizar plantios adensados (PIO et al., 2009).

Para dar suporte aos programas de melhoramento, o conhecimento das características florais dos germoplasmas disponíveis é de suma importância para a seleção dos progenitores a serem utilizados nas hibridações, assim como a viabilidade dos grãos de pólen e até mesmo a capacidade germinativa.

A análise da fertilidade dos grãos de pólen dos progenitores coletados em campo é condição preliminar indispensável para se iniciar os cruzamentos (CHAGAS et al., 2010), uma vez que o período anual de floração das cultivares de marmeleiro é curto (BETTIOL NETO et al., 2011) e, caso os grãos de pólen não estejam viáveis, podem inviabilizar os cruzamentos.

A fertilidade do grão de pólen pode ser avaliada por germinação em meio artificial, '*in vitro*'. Sabe-se que vários compostos orgânicos e inorgânicos interferem na germinação (BOLAT; PIRLAK, 1999). Galletta (1983) afirma que os grãos de pólen da maioria das angiospermas precisam de fontes de carbono e de outros nutrientes para ocorrência desse processo, sendo que o ágar, a sacarose, o cálcio e o boro são os mais comuns. O pH no meio de cultura também tem influência direta na germinação e viabilidade polínica (CHAGAS et al., 2010).

Com base nessas informações, o objetivo com esse trabalho foi ajustar os componentes básicos do meio de cultura para verificar a capacidade germinativa dos grãos de pólen entre cultivares de marmeleiro e ainda verificar a quantidade de grãos de pólen por flor.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do marmeleiro

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) é originário das regiões do Oeste da Ásia próximo ao Irã, sendo seu centro de origem, Cydon na ilha de Creta, na Grécia, ao Sul do mar Egeu, onde até hoje se podem encontrar plantas não domesticadas (PIO et al., 2005).

Os primeiros exemplares dessa fruteira foram trazidos ao Brasil por Martim Afonso de Souza por volta de 1532, sendo o marmelo e a marmelada os primeiros e principais produtos de exportação paulistana antecessor ao monopólio da cafeicultura que ocorreu por volta de 1850. Desempenhando assim, um importante papel histórico, econômico e cultural no desenvolvimento do Brasil na época da colonização.

Ainda por volta de 1930, o Brasil era o maior produtor mundial desse fruto, porém, devido à falta de políticas públicas de incentivo à cultura e à falta de programas de pesquisa e extensão sobre seus tratos culturais, acarretaram em diminuição significativa das áreas produtoras brasileiras durante os anos. Sendo assim, atualmente o país conta com uma área de 209 ha com uma produção aproximada 964 toneladas, sendo a maior parte desses pomares localizados no Estado de Minas Gerais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014).

Com isso, a indisponibilidade de matéria-prima, conseqüentemente, acarretou em aumento do seu valor de mercado, sendo que atualmente, além da valorização das safras brasileiras, a indústria de doces nacionais vem importando marmelo de países como a Argentina para atendimento da própria demanda interna (BRAZILIAN FRUIT, 2010).

Além disso, na Europa observa-se uma tendência de expansão tanto das áreas produtoras como na indústria de processados. Esse fato sugere o potencial comercial do marmelo não apenas para abastecimento do mercado nacional, mas também como uma oportunidade de exportação para outros países (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES - FAO, 2014).

Atualmente a marmelicultura vem ganhando destaque no cenário na fruticultura mundial. Segundo dados da FAO (2014) entre os anos de 1999 e 2008, o marmelo apresentava uma área mundial total de 57.000 ha com produções anuais médias de 443.000 toneladas, com uma produtividade média de aproximadamente oito toneladas por hectare, com estimativa de crescimento com uma taxa de variação média 1,99% ao ano.

2.2 Botânica e descrição

O marmeleiro, *Cydonia oblonga* Mill. é o único membro do gênero *Cydonia* que pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae. Sendo uma frutífera temperada caracteriza-se pela necessidade de um período de dormência, durante o inverno, para posterior crescimento vegetativo, floração e frutificação. É uma planta de porte arbóreo que varia de 4 a 6 metros de altura, possui hábito caducifólio e por possuir aptidão climática temperada, tem maior resistência à baixas temperaturas (PIO et al., 2005).

Seus brotos são de uma tonalidade marrom pálida; os ramos vegetativos são denominados râmulos; as folhas são ovais ou elípticas, possuindo de 5-10 cm de comprimento por 4-6 cm de largura, de coloração verde-escura na face adaxial e verde-esbranquiçada na abaxial, seu sistema radicular é predominantemente fasciculado e superficial.

Com relação à floração, após o período hibernar, surgem os primeiros ramos vegetativos, brindilas, que podem atingir de 3 a 5 mm diâmetro e até 20 cm de comprimento onde em sua extremidade irá conter uma gema vegetativa ou floral. Seu florescimento ocorre entre os meses de agosto e setembro resultando em flores hermafroditas, pentâmeras, constituídas por vinte estames, cinco carpelos fundidos, que delimitam cinco lóculos ovarianos, sendo a principal via de polinização a entomófila (RIGITANO, 1957).

O fruto é do tipo pomo, localizados na extremidade terminal dos ramos, podendo ser portador de até noventa sementes, com coloração que varia de amarelo-dourado a alaranjado dependendo da cultivar (PIO et al., 2005).

2.3 Polinização, fecundação e desenvolvimento do fruto

A polinização é o evento onde ocorre a transferência dos grãos de pólen das anteras de uma flor, para o estigma da mesma, ou para o estigma de outra flor da mesma espécie, a esses eventos denomina-se autopolinização e polinização cruzadas, respectivamente (LEITE; SOUZA, 2003). Os grãos de pólen envolvidos nesse processo são constituídos de duas células haploides, sendo uma delas vegetativa e responsável pela formação do tubo polínico e a outra a célula generativa que passará por mitose para formação das células espermáticas, uma delas responsável pela formação da oosfera que originará posteriormente o embrião.

Quando se trata de produção de alimentos, a polinização é um processo fundamental para garantir colheitas significativas para o abastecimento de alimentos à população. Em escala global, estima-se que mais de 75% das espécies vegetais utilizadas na agricultura sejam dependentes de animais para polinização (ALVES et al., 2010).

Além da necessidade de uma polinização entomófila a formação do fruto do marmeleiro pode ser influenciada por vários outros fatores, estruturais, morfológicos, e ambientais como, por exemplo: horário de liberação do pólen e viabilidade polínica, receptividade do estigma, fragilidade e sobrevivência do óvulo, compatibilidade genética, conteúdo de açúcar total de seu néctar, além de temperatura, umidade e luminosidade (ALVES et al., 2010).

Basicamente, quanto maior for à quantidade de pólen viável e compatíveis no estigma, maior a probabilidade de êxito na fertilização, porém, dependendo do tipo de pólen envolvido, o processo de fertilização pode ser afetado por fatores genéticos e fenotípicos, ocasionando má formação da semente e do fruto (LEITE;SOUZA, 2003).

Quando o processo de polinização e/ou a qualidade do pólen é deficiente, ocorre problemas na fecundação do óvulo acarretando em aborto ou má formação das sementes fator que acarretará em um maior número de lóculos vazios dentro do pericarpo ocasionando má conformação e inviabilizando o fruto para a comercialização (SIMÃO, 1998).

2.4 Testes de Germinação ‘*in vitro*’

O teste de germinação de grãos de pólen *in vitro* é imprescindível para programas de melhoramento genético de frutíferas, pois, por meio dessas análises preliminares torna-se possível verificar sua viabilidade, assim como realizar as primeiras inferências sobre problemas de esterilidade intrínsecos das cultivares em estudo (PIO et al., 2004).

Segundo Heslop Harrison et al. (1970) os métodos utilizados para avaliação da qualidade do pólen “*in vitro*” são:

- A) Procedimento fluorocromático (FCR);
- B) Testes do conteúdo celular com corantes;

C) Germinação do pólen em meio artificial.

A) Procedimento fluorocromático (FCR)

O teste de FCR possui uma metodologia que correlaciona à integridade da membrana e crescimento do tubo polínico, dos grãos de pólen, por meio de técnicas de microscopia de fluorescência.

Nessa técnica os grãos de pólen que não são completamente fluorescentes são considerados inviáveis, pois, apresentam algum tipo de problema estrutural, enquanto que, os grãos de pólen completamente fluorescentes são metodologicamente considerados aptos à germinação, sendo assim viáveis (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

B) Testes do conteúdo celular com corantes

O teste por corantes reflete a atividade enzimática da desidrogenase durante o processo respiratório dos tecidos, sendo que esse tipo de atividade enzimática no grão de pólen está relacionado com sua capacidade de germinação. Ou seja, o corante reage com o hidrogênio produzido na respiração celular do pólen, fazendo com que este adquira uma coloração diferenciada. Testes com lugol e sudan são empregados em estudos como indicativo de viabilidade polínica (HUANG et al., 2004). Porém, para muitos autores, estas metodologias apenas possibilitam a identificação de substâncias existentes no grão de pólen, como lipídios e amido podendo estar presentes em grãos viáveis ou não (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000). Outros tipos de corante como 'Solução de Alexandre' e carmin acético também são empregados nesses testes, porém, para muitos autores, eles apenas refletem a integridade de algumas estruturas celulares como membrana plasmática e núcleo, não sendo um indicador direto de viabilidade polínica (PLINE et al., 2002).

C) Germinação do pólen em meio artificial

A germinação *in vitro* emprega a utilização de um meio de cultura para determinar a aptidão da germinação dos grãos de pólen. Sendo que para uma alta taxa de germinação é necessário à compreensão de uma série de fatores como temperatura, pH, ajustes da composição do meio para a espécie trabalhada e período de emissão do tubo polínico.

A temperatura em que o pólen é exposto durante sua fase germinativa é diretamente relacionada com o desenvolvimento do tubo polínico. Chagas et al. (2010) trabalhando com desenvolvimento de tubos polínicos de porta enxerto de pereiras observaram que até 28 °C houve favorecimento da germinação e que temperaturas mais elevadas acarretaram em diminuição dessa porcentagem. Silva et al. (1999) trabalhando com germinação de grão de pólen de maracujá, observaram que em temperaturas entre 22 e 24 °C houve diminuição da taxa de germinação do pólen e temperaturas entre 27 e 28 °C favoreceram seu aumento.

Outro fator importante para o meio de cultura é o pH, sendo que seu ajuste varia de acordo com a espécie em estudo, influenciando diretamente na disponibilidade de fitorreguladores e nutrientes, além de intervir diretamente na solidificação do meio. Chagas et al. (2009), em seu estudo com diferentes cultivares de *Prunus persica* (L.), obtiveram como melhor resultado na germinação dos grão de pólen em meio com pH aferido para 5,5. Os mesmos autores estudando germinação de grãos de pólen de *Pyrus betulaefolia* e *Pyrus calleryana*, concluíram que o ideal para a germinação do pólen dessas espécies é o pH variando entre 5,2 e 5,8, respectivamente (CHAGAS et al., 2010).

Com relação ao ajuste dos componentes básicos do meio sabe-se que vários compostos orgânicos e inorgânicos interferem na germinação *in vitro*, dos

quais o ágar, a sacarose, o cálcio e o boro são os mais importantes (BOLAT; PIRLAK, 1999).

O ágar tem como função a solidificação do meio de cultura, possui como atributos a facilidade da incorporação dos nutrientes, além de proporcionar umidade relativa constante, fornecendo um ambiente onde os grãos de pólen possam se desenvolver. A concentração de ágar varia dependendo da espécie. Chagas et al. (2009), em seu estudo com *Prunus persica* (L.) obteve o melhor resultado de germinação (55,42%), com 10 gL⁻¹ ágar. Os mesmos autores estudando germinação de grãos de pólen de porta enxertos de pereira, conseguiram as maiores taxas de germinação à medida que aumentaram a concentração de ágar no meio de cultura (CHAGAS et al., 2010).

A sacarose tem como finalidade o fornecimento de energia nos processos biossintéticos envolvidos no crescimento, diferenciação e morfogênese celular. Xie et al. (2004), estudando germinação de grãos de pólen de pêras asiáticas e Chagas et al. (2009), estudando *Prunus persica* (L.), constataram que as maiores porcentagens de germinação foram alcançadas com as maiores concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura, enquanto Barbosa et al. (1991) em seu trabalho realizado com pessegueiros e nectarineiras subtropicais obtiveram os melhores resultados de germinação em meios com baixa concentração açúcar.

O nitrato de cálcio utilizado no meio de cultura tem por finalidade diminuir a sensibilidade dos grãos de pólen e do tubo polínico as alterações no meio básico, sua principal função é contribuir para a resistência e crescimento linear do tubo polínico com diminuição de sua permeabilidade (BHOJWANI; BHATNAGAR, 1974).

O boro é um micronutriente que vai desempenhar um importante papel na germinação e crescimento do tubo polínico. Possui a propriedade de interagir com as moléculas de sacarose presentes no meio de cultura, aumentando a

eficiência de absorção desse composto pelos grãos de pólen, favorecendo o crescimento do tubo polínico (DANTAS et al., 2005).

Brewbaker e Kwack (1963) trabalhando com germinação de pólen *in vitro* de 86 espécies distribuídas em 39 famílias de angiospermas constataram que o cálcio e o boro têm um papel fundamental no início da germinação do tubo polínico.

Chagas et al. (2009), em seu estudo com *Prunus persica* (L.) e Barbosa et al. (1991), em seu trabalho com pessegueiros e nectarineiras, constataram que o requerimento desses micronutrientes na germinação de grãos *in vitro* variam de acordo com a espécie e da cultivar. Além disso, existe a necessidade do estabelecimento correto desses compostos dentro do meio de cultura, pois, seu excesso ou deficiência podem promover a não germinação ou rompimento dos grãos de pólen, levando a um falso resultado (RAMOS et al., 2008).

3. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados nos meses de setembro a outubro de 2013 com 27 cultivares de marmeleiro com quatro anos de idade localizados na coleção de cultivares no setor de fruticultura do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados para esse trabalho as seguintes cultivares: Alaranjado, Alongado, Apple, BA29, Bereckzy, Champion, Cheldow, Constantinopla, CTS 207, Dangers, De Patras, De Vranja, Dulot, Fuller, Mendoza INTA 37, Kiakami, Lajeado, Meech Prolific, Meliforme, Pineapple, Portugal, Provence, Radaelli, Rea's Mamouth, Smyrna, Van Deman, Zuquerineta.

As avaliações foram conduzidas no Laboratório de Pomologia do Departamento de Agricultura. Para fins de avaliação dos experimentos descritos a seguir, foram considerado grão de pólen germinado aqueles cujo comprimento

do tubo polínico excedeu o dobro de seu próprio diâmetro (CHAGAS et al., 2010).

Para instalação, condução e avaliação dos resultados os experimentos foram divididos em quatro etapas:

1º Etapa: Aferimento do pH e ajuste das concentrações de ágar, sacarose, nitrato de cálcio, ácido bórico para grãos de pólen de marmeleiro.

2º Etapa: Tempo de emissão do tubo polínico *in vitro* (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas pós-inoculação).

3º Etapa: Avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen das 27 cultivares de marmeleiro.

4º Etapa: Quantificação do pólen por estame e por flor de 27 cultivares de marmeleiro.

3.1 Etapa 1

Durante o encaminhamento do experimento foi realizada a determinação da composição do meio de cultura específico para germinação do grão de pólen de marmelo visando à máxima germinação do material.

As dosagens iniciais dos componentes utilizados para montagem desse experimento foram baseadas em trabalhos sobre viabilidade e germinação '*in vitro*' de outras fruteiras da família Rosaceae. Albuquerque Junior et al. (2010); Chagas et al. (2009); Chagas et al. (2010).

Primeiramente, foram recolhidos flores da cultivar Portugal que apresentou florescimento precoce, em relação as outras cultivares do experimento.

Inicialmente botões florais completamente desenvolvidos foram coletados em campo e levados ao laboratório. Em seguida, com auxílio de uma pinça as anteras foram retiradas sendo armazenadas em placa de petri estéril e

encaminhadas para estufa de secagem a (27 °C) na ausência de luz para liberação do pólen (RAMOS et al., 2008).

O desenvolvimento do meio de cultura foi implantado de maneira sequencial sempre utilizando o melhor resultado do experimento anterior (concentração, composição, pH) para a montagem dos tratamentos subsequentes, conforme metodologia proposta por Chagas et al. (2010).

Inicialmente foram instalados os seguintes experimentos em BOD em temperatura controlada 27 °C, na ausência de luz para determinação do meio de cultura para marmeleiro:

- 1)Concentrações de ágar (4, 6, 8 e 10 g L⁻¹) x pH do meio: (3,5; 4,5; 5,5 6,5);
- 2)Concentrações de sacarose (0, 30, 60, 90 g L⁻¹);
- 3)Concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400, 800 mg L⁻¹)
- 4)Concentrações de ácido bórico (0, 400, 800, 1200 mg L⁻¹);

Cinco horas pós-inoculação foram contabilizados, com auxílio de um microscópio óptico monocular (10 x 100) os grãos de pólen germinados ou não. Este experimento foi constituído de quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição foi composta por cinco campos de visão.

3.2 Etapa 2

Com a definição de um meio de cultura adequado a partir da Etapa1 foram instalados mais três outros experimentos:

Para essa etapa foram utilizadas amostras de pólen da cultivar Portugal. Primeiramente os botões florais foram coletados no campo, levados ao

laboratório e com o auxílio de uma pinça foram retiradas as anteras e armazenadas em placa de Petri estéril por 24 horas em estufa de secagem, a 27 °C na ausência de luz.

A amostra, após esse período, foi inoculada no meio de cultura estabelecido no experimento anterior e armazenada em BOD a 27 °C, na ausência de luz, sendo testados seis tempos de incubação (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas/pós-inoculação). A contagem foi realizada em microscópio óptico monocular (10 x 100).

Este experimento foi constituído de quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição foi composta por cinco campos de visão.

3.3 Etapa 3

Após o estabelecimento do meio de cultura e determinação do tempo de germinação do pólen, essa etapa avaliou separadamente o percentual de germinação de grãos de pólen de cada uma das 27 cultivares de marmeleiro estudada.

Para isso, botões florais de cada uma das cultivares foram colhidos separadamente, retirados os estames e armazenados em placas de petri estéril, devidamente etiquetadas em estufa de secagem a 27 °C, na ausência de luz por 24 horas.

Após esse período o pólen de cada um dos genótipos estudados foi inoculado separadamente em placas de Petri 60 x 15 mm de dimensão e armazenado na BOD a 27 °C, na ausência de luz.

Para a realização desse experimento o meio de cultura e o tempo de emissão do tubo polínico foram de acordo com os resultados obtidos nas etapas

anteriores. A contagem foi realizada em microscópio óptico monocular (10 x 100).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 27 cultivares e quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição foi composta por cinco campos de visão.

3.4 Etapa 4

Nessa etapa foi realizada a contagem do número de grãos de pólen por antera e por flor. Inicialmente foram coletados cinco botões florais de cada uma das 27 cultivar, sendo contado o número de anteras por flor. Em seguida, foram selecionadas cinco anteras de forma aleatória e armazenados em tubos Eppendorf destampados à temperatura controlada (27 °C) por 24 horas na ausência de luz, para ocorrência a deiscência e assim a liberação dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008).

Passada 24 horas foi acrescida aos tubos uma solução de 1.000 µl de ácido láctico. Após 48 horas, uma amostra de 10 µl de cada Eppendorf foi colocada em uma lâmina de leitura (Neubauer), para a realização da contagem do número de grãos de pólen, foi utilizado um microscópio óptico (objetiva de 100 x 10). Esse experimento foi conduzido com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro leituras na lâmina de Neubauer.

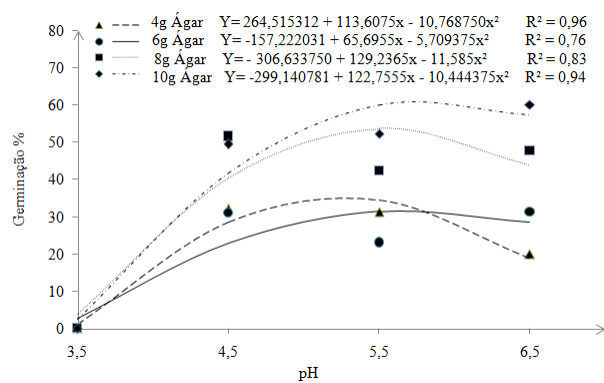
A quantidade de grãos de pólen por antera foi calculada multiplicando-se a média do número de grãos de pólen de cada amostra pelo volume do ácido láctico da solução (1.000 µl) e dividindo este valor pelo produto entre o volume de ácido láctico da amostra (10 µl) e o número de anteras de cada tubo (cinco). O número de grãos de pólen por flor foi calculado pela multiplicação da estimativa média de grãos de pólen por antera pelo número médio de anteras por flor.

3.5 Análise dos resultados

Em todos os experimentos o delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram submetidas à regressão linear ou quadrática, em nível de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no Programa Computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR® (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relacionados ao estabelecimento do pH e ágar, assim como a concentração de sacarose do meio de cultura estão apresentados na Figura 1.



A

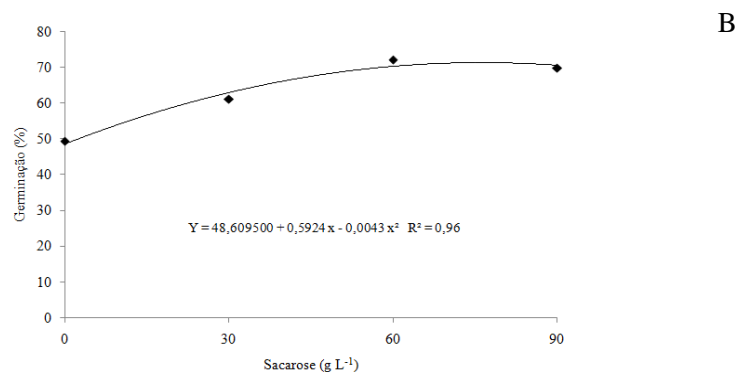


Figura 1 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen do marmeleiro ‘Portugal’ quando submetidos a diferentes pH e concentrações de ágar (g L⁻¹) do meio de cultura (A), diferentes concentrações de sacarose (g L⁻¹) (B). UFLA, Lavras, MG, 2013.

Com relação ao estabelecimento do meio de cultura para a maximização da germinação dos grãos de pólen do marmeleiro, verificou-se que houve interação significativa entre as concentrações de ágar e aferimento do pH. Por meio da regressão quadrática, visualiza-se pela Figura 1A que a maior concentração de ágar (10 g L⁻¹) promoveu a maior germinação dos grãos de pólen. Pelo desdobramento da equação, o aferimento do pH para 5,9 do meio adicionado de 10 g L⁻¹ favoreceram 62% de germinação.

É um fator importante para o meio de cultura que o pH seja aferido adequadamente, pois influencia diretamente na solidificação do meio (CHAGAS et al., 2009). Essa afirmação é confirmada pela Figura 1A, onde o aferimento do pH do meio para 3,5, independente da concentração de ágar adicionada ao meio de cultura, quase que anulou a germinação dos grãos de pólen de marmeleiro. Uma possível explicação para a porcentagem de germinação mais alta ter ocorrido na concentração de 10g L⁻¹ de ágar, é que a alta concentração desse agente solidificante possibilitou uma maior consistência do meio de cultura, o

que promoveu o equilíbrio do potencial osmótico do meio e assim favoreceu a germinação.

Estudos realizados com outras espécies frutíferas pertencentes à família *Rosaceae*, apontam resultados semelhantes para o valor de pH na germinação de grãos de pólen. Chagas et al. (2009), estudando diferentes cultivares de *Prunus persica* (L.), obtiveram como melhor resultado na germinação dos grão de pólen em meio com pH aferido para 5,5. O mesmo autor, estudando germinação de grãos de pólen de *Pyrus betulaefolia* e *Pyrus calleryana*, conseguiram como resultado ideal para a germinação do pólen dessas espécies, pH entre 5,2 e 5,8 respectivamente (CHAGAS et al., 2010).

Segundo Pierik (1987) o pH ideal para o desenvolvimento da maioria das espécies de plantas encontra-se na faixa de 5 a 6,5 sendo que variações desse limiar acarretam em suspensão de seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

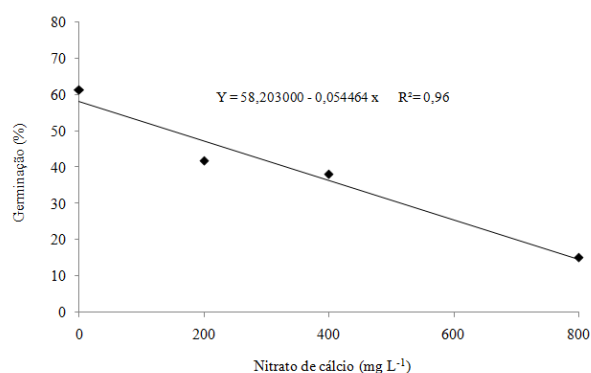
Quanto à adição de sacarose ao meio de cultura, pode-se observar um aumento na porcentagem de germinação à medida que se aumentou a concentração de sacarose do meio, sendo que a maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen de marmeleiro (68%) foi na concentração de 68 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1B).

A sacarose tem como finalidade o fornecimento de energia nos processos biossintéticos envolvidos no crescimento, diferenciação e morfogênese celular. Maior porcentagem de germinação com a elevação de sua concentração pode ser justificada pela maior oferta de energia na forma de carboidrato com favorecimento do crescimento do tubo polínico. Tais resultados também foram observados por Xie et al. (2004), em seu estudo com germinação de grãos e pólen de peras asiáticas e por Chagas et al. (2009), em seu estudo com *Prunus persica* (L.), onde constataram que as maiores porcentagens de

germinação foram alcançadas com as maiores concentrações de sacarose adicionada ao meio.

Para a adição das diferentes concentrações de nitrato de cálcio ao meio de cultura, pode-se observar que houve comprometimento da porcentagem de germinação polínica à medida que se aumentou a concentração de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ adicionada ao meio, sendo obtido maiores percentuais de germinação na sua ausência (61% de germinação) (Figura 2A). Esse resultado também corrobora com os trabalhos realizados com outras frutíferas pertencentes à família *Rosaceae*, onde os melhores resultados de germinação foram alcançados na ausência de nitrato de cálcio do meio (CHAGAS et al., 2009; CHAGAS et al., 2010).

Com relação à adição de diferentes concentrações de ácido bórico ao meio de cultura, os melhores resultados foram obtidos quando utilizados 366 mg L^{-1} alcançando 68% de germinação (Figura 2B).



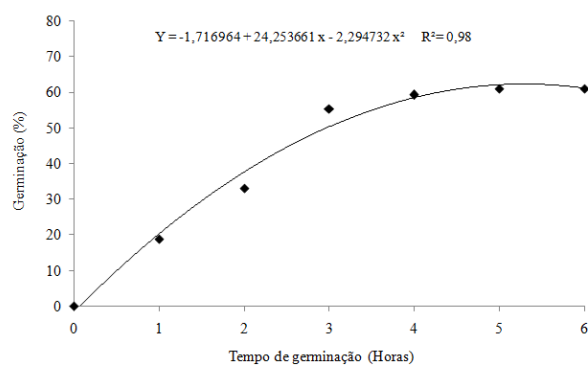
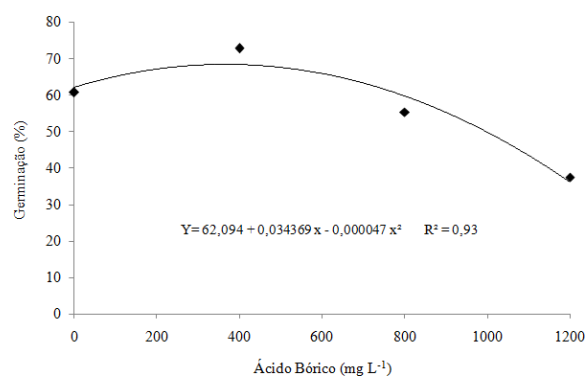


Figura 2 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de marmeleiro ‘Portugal’ diferentes concentrações de nitrato de cálcio (mg L⁻¹) (A), diferentes concentrações de ácido bórico (mg L⁻¹) (B) e diferentes tempos de incubação para germinação do grão de pólen (horas) (C). UFLA, Lavras, MG, 2013.

A adição de boro no meio de cultura pode apresentar diferentes respostas dependendo da espécie em estudo. O boro interage com a sacarose, formando um complexo ionizável açúcar-borato que reage com a membrana plasmática promovendo um maior crescimento do tubo polínico (DANTAS et al., 2005). Provavelmente a adição de boro ao meio de cultura com posterior formação desse complexo foi benéfica durante a germinação dos grãos de pólen de marmelo, aumentando seu percentual de germinação.

Porem, quando a concentração de ácido bórico foi superior a 366 mg L⁻¹, houve comprometimento na porcentagem de germinação dos pólenios. Uma possível explicação é que a integridade dos grãos de pólen esta relacionada com o equilíbrio osmótico do meio de cultura, que é determinada pela concentração de sacarose e outras substâncias contidas no meio, entre elas o ácido bórico, sendo assim, o aumento gradual de ácido bórico na solução promoveu o rompimento dos grãos de pólen comprometendo sua viabilidade e taxa de germinação (DANTAS et al., 2005).

Quando avaliado o tempo de emissão do tubo polínico, pode-se observar que a germinação teve inicio uma hora pós-inoculação, também se constatou um aumento na porcentagem de grãos de pólen que emitiram tubo polínico até 5,3 horas pós-inoculação, com 62% de germinação, sendo que após esse período houve uma estabilização na germinação dos pólenios no meio de cultura (Figura 2C).

Após definido o meio de cultura próprio e o tempo de incubação, visando à maximização da germinação dos grãos de pólen para o marmeleiro, instalou-se o experimento entre as cultivares (Tabela 1).

Tabela 1 Germinação média, número de anteras por flor, número de pólen por antera e número de pólen por flor de diferentes cultivares de marmeleiro. UFLA, Lavras, MG, 2013.

Cultivar	Germinação (%)	Número de anteras por flor	Número de pólen por antera	Número de pólen por flor
Alaranjado	77,62 a	27,40 a	451,50 a	12.190,50 a
Alongado	63,92 b	17,60 c	342,50 a	6.165,00 b
Apple	42,29 d	25,00 a	277,75 b	6.943,75 c
BA29	65,12 b	19,80 b	424,00 a	8.480,00 b
Bereckzy	55,98 c	21,00 b	362,75 a	7.980,50 b
Champion	81,89 a	23,80 a	352,50 a	8.460,00 b
Cheldow	82,23 a	16,20 c	372,00 a	5.952,00 c
Constantinopla	39,39 d	19,40 b	255,00 b	4.845,00 c

Tabela 1, Continuação

CTS 207	57,03 c	16,80 c	312,25 b	5.308,25 c
Dangers	80,33 a	21,60 b	251,25 b	5.527,50 c
De Patras	43,88 d	19,80 b	282,25 b	5.645,00 c
De Vranja	62,77 b	20,00 b	294,75 b	5.895,00 c
Dulot	58,86 c	23,20 a	243,75 b	5.606,25 c
Fuller	78,50 a	23,60 a	381,50 a	9.156,00 b
Mendoza INTA 37	52,29 c	15,80 c	331,75 a	4.976,25 c
Kiakami	42,92 d	20,40 b	336,50 a	6.730,00 c
Lajeado	53,71 c	26,60 a	349,50 a	8.737,50 b
Meech Prolific	60,72 c	26,60 a	424,75 a	11.468,25 a
Meliforme	47,50 d	25,00 a	233,50 b	5.837,50 c
Pineapple	55,79 c	21,40 b	338,25 a	7.103,25 c
Portugal	65,72 b	16,60 c	411,00 a	6.987,00 c
Provence	69,44 b	22,40 a	383,50 a	8.437,00 b
Radaelli	58,65 c	23,00 a	360,50 a	8.291,50 b
Rea's Mamouth	40,57 d	21,00 b	280,25 b	5.885,25 c
Smyrna	79,55 a	17,00 c	148,50 b	2.524,50 c
Van Deman	48,06 d	25,00 a	457,00 a	10.511,00 a
Zuquerineta	37,83 d	19,60 b	366,00 a	7.320,00 c
CV (%)	12,15	16,69	33,73	33,28

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pelos resultados obtidos, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre as cultivares. O teste de agrupamento de médias permitiu agrupar as cultivares em quatro grupos, quanto à porcentagem de germinação dos grãos de pólen. As maiores porcentagem de germinação foram obtidas com as cultivares Alaranjado (77,62%), Champion (81,89%), Cheldow (82,23%), Dangers (80,33%), Fuller (78,50%) e Smyrna (79,55%) (Tabela 1), representando o grupo cuja porcentagem de germinação foi significativamente maior que as demais cultivares, que apresentaram taxas de germinação que variaram de 69,44% a 37,83%.

Segundo Albuquerque Junior et al. (2010), relatam em trabalho realizado com a germinação de pólen de diferentes cultivares de macieira, que as taxas de germinação superiores a 30% são suficientes para assegurar boa fecundação e frutificação. Para marmelo ainda são necessários maiores estudos para se determinar qual seria a taxa de germinação polínica mínima para uma boa fecundação e frutificação efetiva. Porém, se recomenda como espécies polinizadoras cultivares com alta germinação polínica.

Durante o experimento de contagem de estames por flor, constatou-se variação entre as diferentes cultivares estudadas, sendo que as cultivares Alaranjado (27,40), Apple (25,00), Champion (23,80), Dulot (23,20), Fuller (23,60), Lajeado (26,60), Meech Prolific (26,60), Meliforme (25,00), Provence (22,40), Radaelli (23,00) e Van Deman (25,00) foram as que apresentaram os maiores números de anteras por flor em relação às demais cultivares (Tabela 1). Outros trabalhos com frutíferas da família Rosaceae demonstram que o número de estames por flor pode apresentar variação entre diferentes cultivares. Albuquerque Junior et al. (2010) constataram diferença no número de estames entre as diferentes cultivares de macieira. Barbosa et al. (1991) estudando 25 cultivares de pessegueiro e nectarineira também verificaram flutuações no número de estames entre as cultivares durante seu experimento.

Contudo um maior número de anteras não é indicativo de uma maior quantidade de pólen por flor, além disso, a número de anteras por flor de uma cultivar pode variar anualmente devido às condições ambientais em que as plantas são expostas (STANTON et al., 2007; ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2010).

Na quantificação do número de grãos de pólen por antera, o teste de agrupamento de médias separou as cultivares em dois grupos, conforme exposto na Tabela 1. Porém, quando se avaliou a quantidade de grãos de pólen por flor, a análise de variância demonstrou diferença significativa entre as cultivares

estudadas, permitindo separá-las em três grupos distintos. As cultivares Alaranjado (12.190,50), Meech Prolific (11.468,25) e Van Deman (10.511,00) apresentaram as maiores quantidades de pólen por flor.

Uma possível explicação para as maiores taxas de pólen encontradas nessas respectivas cultivares pode estar relacionada a uma maior adaptação climática dessas cultivares as condições ambientais do Sul de Minas. Albuquerque Junior et al. (2010) em seu trabalho com pólen de macieira, constataram que as cultivares desenvolvidas no sul do Brasil foram as que apresentaram as maiores quantidades de grãos de pólen em relação as cultivares importadas, que necessitam de maiores quantidades de frio durante o período invernal.

5. CONCLUSÃO

A utilização de 10g L^{-1} de ágar e 76g L^{-1} de sacarose, com 366 mg L^{-1} de ácido bórico, na ausência de nitrato de cálcio, com pH em 5,8, e tempo de germinação do pólen de cinco horas pós-inoculação, promoveu as melhores condições para a germinação dos grãos pólen alcançando 62% de germinação do material inoculado.

Em relação à germinação de grãos de pólen e quantidade de pólen produzido por flor, a cultivar Alaranjado foi a que apresentou os melhores resultados, combinando número de grãos de pólen/flor e capacidade germinativa. As cultivares Champion e Fuller também tiveram bons valores relacionados à taxa de germinação.

As cultivares Smyrna, Dangers e Cheldow apresentaram alta capacidade germinativa de pólen, porém, menor quantidade de pólen por antera e por flor, o que pode influenciar na quantidade de flores necessárias para a extração das anteras nos cruzamentos e no sucesso das hibridações em campo

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C.L.J. 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.

ALVARENGA, A.A. et al. Comparação entre doces produzidos a partir de frutos de diferentes espécies e cultivares de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Miller e *Chaenomeles sinensis* Koehne). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.302-307, 2008.

ALVES, E.M et al. Influência de abelhas africanas na concentração de açúcares no néctar de soja (*Glycine max* L. Merrill) var. Codetec 207. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v.32, n.2, p. 198-195, Apr./Jun. 2010.

BARBOSA, W et al. Conservação e germinação do pólen, polinização e frutificação efetiva em pessegueiros e nectarineiras subtropicais. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.1, p.17-28, 1991.

BETTIOL NETO, J.E. et al. Produção e atributos de qualidade de cultivares de marmeleiro na região paulista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.1035-1042, 2011.

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

BOLAT, Y.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, v.23, n. 4, p.383-388, Aug. 1999.

BRAZILIAN FRUIT - FRUTAS BRASILEIRAS. **Importações brasileiras de marmelo por país de origem**. Disponível em: <<http://www.brazilianfruit.org.br>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

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

CHAGAS, E.A. et al. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus persica* (L.) *Batsch Vulgaris*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.5, p.8-14, set./out. 2009.

CHAGAS, E.A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.261-266, fev. 2010.

DANTAS, A.C.M. et al. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.356-359, dez. 2005.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/ DEX/SISVAR, 2000.145 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATIONS - FAO. **Faostat agriculture data – croops and processed – quince**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso em: 01 fev. 2014.

FIORAVANÇO, J.C.; SIMONETTO, P.R.; GRELLMANN, E.O. Comportamento fenológico e produtivo de marmeleiros em Veranópolis, RS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.1, p.15-20, fev. 2006.

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

HUANG, Z. et al. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, Oxford, v.93, n. 3, p.295-30, Jan. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola: marmelo**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 fev. 2014.

LEITE, D.L.; SOUZA, C.M. Polinização. In: **Frutas do Brasil: pêra produção**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.23-28.

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

PIO, L. A.S. et al. Germinação in vitro de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p.293-296, jul./set. 2004.

PIO, R. et al. **A cultura do marmeleiro**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2005. 45p. (Série Produtor Rural, 29).

PIO, R. et al. Teste de porta-enxertos intergenéricos para marmeleiros em condições de viveiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.2, p.521-526, mar./abr. 2009.

PIO, R. et al. Desenvolvimento de 31 cultivares de marmeleiro enxertadas no porta-enxerto 'Japonês'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticaba, v.30, n.2, p.466-470, jun. 2008.

PLINE, W.A. et al. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate-resistant cotton pollen viability. **Crop Science**, Madison, v.42, n. 6, p.2193-2200, 2002.

RAMOS, J.D. et al. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, Caracas, v.33, n.1, p.51-55, jan. 2008.

RIGITANO, O. **O marmelo e a sua cultura**. São Paulo: Melhoramentos, 1957. 31 p. (ABC do Lavrador Prático, 67).

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, v.12, n.4, p.241-244, Jan. 2000.

SILVA, M.M. et al. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.347-352, mar. 1999.

SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEREIRA, A.V. Meiosis in elephant Grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.29, n.2, p.353-362, 2006.

STANTON, M.A. et al. Floral competence of primocane-fruiting blackberries prime-jan and prime-jim grown at three temperature regimens. **Hort Science**, Pleasanton, v.42, n.3, p.508-513, June 2007.

XIE, S. et al. Pollen viability of Asian pear and effect of PGR, B and sucrose on germination and pollen tube development. **Journal of Fruit Science**, Ontario, v.21, n.4, p.289-294, 2004.