

**VIABILIDADE DO PÓLEN DE CITROS EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

LEILA APARECIDA SALLES PIO

2003

LEILA APARECIDA SALLES PIO

**VIABILIDADE DO PÓLEN DE CITROS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. José Darlan Ramos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de
Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pio, Leila Aparecida Salles
Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de
armazenamento / Leila Aparecida Salles Pio. -- Lavras : UFLA, 2003.
45 p. : il.

Orientador: José Darlan Ramos.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia

1. Laranja. 2. Grão de pólen. 3. Armazenamento. 4.
Melhoramento genético vegetal. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD-634.3123

LEILA APARECIDA SALLES PIO

**VIABILIDADE DO PÓLEN DE CITROS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 12 de agosto de 2003

Prof. Dr. Moacir Pasqual

UFLA

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA

Prof. Dr. José Darlan Ramos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus que está sempre
presente em minha vida
Agradeço

Ao meu esposo Marcelo e ao meu
filho Felipe, por todo carinho, amor e
compreensão,

Dedico

Aos meus pais Joana e
Alaôr, pelo apoio, e
incentivo aos meus
estudos,
Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realizar o curso;

À CAPES, pela concessão do auxílio financeiro;

Ao professor do Departamento de Agricultura (UFLA) Dr. José Darlan Ramos, pelos conhecimentos, orientação, amizade e confiança em mim depositada;

Ao professor do Departamento de Agricultura (UFLA) Dr. Moacir Pasqual, pelo precioso auxílio;

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFLA, pelos ensinamentos;

Aos funcionários do laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, Clarete e Vantuil pela amizade e apoio;

Às amigas Keize, Flávia e Aparecida pelo auxílio na execução deste trabalho;

Aos pesquisadores Leonardo Ferreira Dutra e Adriano Bortolotti da Silva, pelas sugestões fornecidas;

À minha amiga Fabíola pela preciosa colaboração;

Aos colegas do curso pela amizade e descontração presente durante todos os momentos;

A todos àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.	02
2.1 Métodos convencionais de melhoramento dos citros	02
2.2 Grão de pólen	03
2.3 Armazenamento de grãos de pólen.....	05
2.3.1 Uso de sílica-gel e dessecador	06
2.3.2 Temperatura para o armazenamento.....	08
2.3.3 Composição do meio de cultura.....	11
2.3.4 Temperatura de incubação e período de germinação	14
2.3.5 Outros fatores que influenciam a germinação.....	16
2.4 Características das espécies estudadas	17
2.4.1 <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck cv. Pêra	17
2.4.2 <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck cv. Valência	18
2.4.3 <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck cv. Natal.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Local.....	20
3.2 Escolha e coleta dos botões florais	20
3.3 Procedimentos para o armazenamento	21
3.4 Composição do meio de cultura	21
3.5 Procedimento para o teste de germinação.....	22
3.6 Análise estatística dos dados	23

4 RESULTADOS	24
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

PIO, Leila Aparecida Salles. **Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de armazenamento**: UFLA, 2003. 45p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)*

Em programas de melhoramento genético convencional procura-se identificar procedimentos simples e rápidos para manter os grãos de pólen viáveis por longos períodos, de modo a dar maior flexibilidade ao trabalho dos melhoristas. O presente trabalho foi realizado visando avaliar a viabilidade de grãos de pólen armazenados das cultivares copas cítricas ‘Natal’, ‘Pêra’ e ‘Valência’. Botões florais foram coletados em estádio “balão”. As anteras foram separadas das estruturas florais e mantidas à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para que ocorresse a antese. O pólen foi armazenado em frascos de vidro e submetido a 3 temperaturas de armazenamento: -10°C (freezer), 4°C (refrigerador) e temperatura ambiente; 2 ambientes (com e sem dessecador) e na presença e ausência de sílica-gel. A avaliação do índice de germinação foi feita com o pólen fresco e a cada 7 dias, durante 9 semanas. Para avaliar a germinação foram utilizadas placas de Petri contendo meio constituído de 1% de ágar e 10% de sacarose, 800mgL^{-1} de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 200mgL^{-1} de ácido bórico (H_3BO_3) e pH corrigido para 6,5. O pólen foi espalhado sobre a superfície meio de cultura incubados à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. As avaliações foram realizadas através da porcentagem de grãos de pólen germinados, observados em microscópio óptico, com 4 repetições. Constatou-se que os grãos de pólen possuem redução na viabilidade, com o aumento do tempo de armazenamento; o armazenamento em freezer (-10°C), foi mais eficiente do que em refrigerador (4°C) e temperatura ambiente. Melhores resultados foram alcançados com os tratamentos em freezer e utilização de dessecador. A cultivar ‘Valência’ apresentou-se superior as demais em todos os tratamentos.

Comitê Orientador: José Darlan Ramos - UFLA (Orientador), Moacir Pasqual-UFLA (Co-Orientador).

ABSTRACT

PIO, Leila Aparecida Salles. **Viability citrus pollen in different storage conditions:** UFLA, 2003. 45p. (Dissertation – Master Program in Agronomy/ Crop Science) *

The conventional plant breeding programs look for the quick and easy identification procedures to keep the pollen grains viable for long periods of time in order to give more flexibility to the plant breeding workers. This present work was made trying to evaluate the viability of the stored pollen grain from citric varieties 'Natal', 'Pêra' and 'Valência'. The floral buds were picked up in the 'balloon' stage. The anthers were separated from the floral structures and kept under temperatures of $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ by 48 hours until the antese's occurrence. The pollen was stored in glass jars and kept under 3 storage temperatures: -10°C (freezer), 4°C (refrigerator), and room temperature; 2 environment (with and without desiccator) and in sílica-gel presence and absence. The germination index evaluation was made with fresh pollen every 7 days during 9 weeks. To evaluate the germination was used Petri dishes with agar 1% and sucrose 10%, 800mgL^{-1} calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 200mgL^{-1} boric acid (H_3BO_3) and pH 6,5. The pollen was spread over the culture medium surface and incubated at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperature for 12 hours. The evaluation was made using the percentage of pollen grains germinated, it was looked under light optical microscope with 4 repetitions. It was then observed that the pollen grains reduce their viability was the storage time increases; the storage in freezer temperature (-10°C) was much more efficient than in refrigerator (4°C) and to room temperature. The better results were reached when were used freezer and desiccator. 'Valência' variety showed superior when it was compared to the others, in all treatments.

Guidance Committee: José Darlan Ramos - UFLA (Advisor), Moacir Pasqual - UFLA (Co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de citros foi estimada em mais de 103 milhões de toneladas em 2002, das quais o Brasil participou com mais de 20 milhões (FAO, 2003). O país é considerado o maior produtor mundial de frutas cítricas e também o maior produtor e exportador de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC). As exportações de SLCC e seus subprodutos (óleo essencial e pectina) geram uma receita anual em torno de 1,5 bilhão de dólares (Agrianual..., 2003). Essa hegemonia é dependente de tecnologias que objetivam a manutenção e o desenvolvimento de cultivares com características superiores. Para a obtenção de novas cultivares, os programas de melhoramento genético são também dependentes de hibridações controladas. Entretanto, uma das grandes dificuldades é a falta de coincidência de floração dos parentais, exigindo tecnologias que garantam a viabilidade de grãos de pólen por longos períodos, permitindo a hibridação de cultivares e/ou espécies que tem floração não coincidente.

As condições de armazenamento são primordiais para o sucesso no melhoramento convencional. Dentre os fatores que mais influenciam a longevidade do pólen durante o armazenamento destacam-se a umidade e a temperatura. O emprego de baixas temperaturas e baixos teores de umidade, normalmente encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que proporciona maior longevidade.

Objetivou-se determinar condições para armazenar grãos de pólen das cultivares de laranjeiras 'Pêra', 'Natal' e 'Valência' (*Citrus sinensis* Osbeck).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Métodos convencionais de melhoramento genético dos citros

Os primeiros programas de melhoramento de citros foram iniciados na Flórida em 1893, com Swingle e Webber (Cooper et al., 1962). Desde então, numerosos programas foram desenvolvidos com diversos objetivos (Davies & Albrigo, 1994). Entretanto, a maioria das cultivares desenvolvidas para a citricultura mundial, neste último século, têm sido originadas a partir de seleções naturais e mutações (Soost & Cameron, 1975).

A hibridação também tem contribuído para o lançamento de diversos híbridos, tais como os citranges (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* L. Rat.), tangelos (*Citrus paradisi* Macf. x *Citrus reticulata* Blanco.), citrumelos (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), aqueles entre *Citrus* e *Fortunella*, bem como entre combinação de *Citrus* x *Fortunella* x *Poncirus*. Entretanto, os melhores resultados foram com os híbridos de tangerinas com pomelo, com tangelos e com *Citrus sinensis* (Soost & Cameron, 1975; Barret, 1985; Gmitter Junior et al., 1992; Saunt, 2000).

Outro avanço da hibridação sexual foi a produção de triplóides através do cruzamento entre diplóides e tetraplóides. A importância dessas variedades está relacionada à produção de híbridos sem sementes (Gmitter Junior et al., 1992).

Os programas de hibridação sexual devem ser continuados, visando principalmente a obtenção de porta-enxertos tolerantes à tristeza, ao declínio, à gomose, a nematóides, ao estresse hídrico, ao alumínio e à salinidade (Pompeu Júnior, 1991). Para cultivares copa, além da resistência ou tolerância a pragas e doenças e qualidade de frutos, deve-se visar a obtenção de frutos sem sementes,

com coloração externa e interna adequados e alto rendimento de suco, que são fundamentais para a expansão do mercado interno brasileiro (Barret, 1985).

As barreiras impostas pela biologia reprodutiva dos citros têm dificultado o melhoramento convencional, tais como longos ciclos de reprodução, juvenildade, poliembrionia nucelar (apomixia), alta heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade gametofítica e poliploidia (Cristofani, 1997). Um outro problema é que nem sempre há coincidência de florescimento entre as plantas a serem cruzadas. Entretanto, as técnicas convencionais ainda são indispensáveis para o melhoramento, pois são operações consideradas simples e de baixo custo.

O sucesso nas hibridações, e conseqüentemente no melhoramento de citros, dependem da coincidência das florações dos parentais envolvidos. Entretanto, de acordo com Sousa (1988), há necessidade de utilização de técnicas para o armazenamento e viabilidade de grãos de pólen na época adequada para a polinização e posterior fertilização.

2.2 Grão de pólen

A palinologia, ciência que estuda os grãos de pólen, possui íntima relação com outros ramos da ciência, como por exemplo, citologia, genética, física, química e matemática. Dentre as inúmeras aplicações desta ciência destaca-se a utilização prática no melhoramento de plantas, notadamente nos estudos de viabilidade de polens. Alguns estudos têm sido feitos com substâncias químicas que estimulam o desenvolvimento do tubo polínico, oferecendo perspectivas para o aumento da produção de várias culturas através da obtenção do índice máximo de fertilização. Alguns fatores estão associados a esse processo, destacando-se aqueles ligados à composição do meio de cultura, intrínsecos à própria natureza do pólen, relacionados a seu estado de maturação

fisiológica, origem, características genéticas, nutrição da planta e agentes químicos e ambientais, como temperatura e umidade (Oliveira Júnior, 1999).

O grão de pólen é uma estrutura microscópica de coloração amarelada que apresenta número haplóide de cromossomos e dará origem ao gameta masculino (Vidal & Vidal, 1995). É formado por duas membranas: a externa, chamada exina, que confere rigidez ao grão de pólen e apresenta poros germinativos, e a interna, chamada intina, na qual ocorre o processo de emissão, alongamento, desenvolvimento e formação do tubo polínico (Melhem & Salgado-Laborriou, 1973). No seu interior, o grão de pólen apresenta dois núcleos: um menor, reprodutivo, que dará origem a dois microgametas, e o outro maior, nutritivo, que formará o tubo polínico (Vidal & Vidal, 1995).

Os grãos de pólen são formados nas anteras, em estruturas chamadas sacos polínicos, que contêm as “células-mãe” dos grãos de pólen; cada uma delas, após sofrer meiose, irá formar quatro grãos de pólen. A célula-mãe do grão de pólen sofre meiose, formando quatro micrósporos. O núcleo do micrósporo sofre uma divisão mitótica, resultando nos dois núcleos (reprodutivo e nutritivo). O micrósporo sofre modificações morfológicas, transformando-se em grão de pólen adulto (Vidal & Vidal, 1995).

É por meio da expansão e alongamento da intina, que se projeta através de um dos poros da exina, formando o tubo polínico, que ocorre a fertilização. É necessário que o pólen esteja em contato com o estigma para que germine, dando início ao processo de fecundação e posterior frutificação. O estigma exsuda uma secreção mucilaginosa altamente específica em lipídios que evita sua desidratação e favorece a fixação dos grãos de pólen, garantindo ótimas condições para o prolongamento da intina. Segundo Vidal & Vidal (1995), o núcleo vegetativo que dará origem ao tubo polínico desce através do estilete floral em direção ao ovário, atravessando o canal ou digerindo o tecido condutor do estilete. O núcleo germinativo do pólen dará origem a dois núcleos

espermáticos, há a penetração do tubo polínico no óvulo e desaparece o núcleo vegetativo.

O processo de emissão do tubo polínico é geralmente rápido (Kwack & Brewbaker, 1963), iniciando-se através do estímulo de componentes químicos, como água destilada, ácido bórico, ácido nítrico, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, sacarose e nitrato de potássio (Kwack & Brewbaker, 1963; Pfahler, 1967). Segundo Carvalho (1983), todo o período de formação do tubo polínico é controlado por substâncias naturais de crescimento, as quais incluem tanto promotores quanto inibidores, sugerindo que os promotores de crescimento dirigem o tubo polínico por quimiotropismo, não necessitando de luz para ocorrer o processo. Nos testes envolvendo a emissão do tubo polínico, sugere-se que os meios utilizados podem ser líquidos (Chichiricco & Caiola, 1986) ou sólidos (Pasqual et al., 1982; Raseira, 1992).

Por meio da emissão, alongamento e formação do tubo polínico *in vitro*, pode-se verificar sua fertilidade, o que auxiliará em programas de melhoramento de plantas frutíferas (Silva, 1996).

2.3 Armazenamento de grãos de pólen

O armazenamento, como meio de manutenção da viabilidade do pólen, é uma ferramenta valiosa empregada por melhoristas e geneticistas. O armazenamento de pólen justifica-se em programas de hibridação quando há defasagem no florescimento entre as espécies de interesse ou quando os mesmos se encontram em regiões distintas.

Para fins didáticos, pode-se dividi-lo em dois tipos: a curto e a longo prazo. Segundo Sousa (1988), normalmente procede-se o armazenamento a curto prazo visando estudos de genética e melhoramento, e a longo prazo para a

conservação genética. A autora refere-se à ocorrência de alterações que podem levar, após muitos anos, a populações geneticamente diferentes das originais.

A maioria dos métodos empregados envolve a redução do teor de umidade e a manutenção do pólen a baixa temperatura, de modo que oscilações sejam evitadas.

Conhecendo-se os fatores que podem levar à longevidade do pólen, tem-se procurado utilizar métodos de armazenamento de forma que esses fatores interfiram o mínimo possível nos propósitos de conservação. A longevidade do pólen pode ser afetada por fatores genéticos e fisiológicos (Sousa, 1988). Muitos autores relatam que grãos de pólen binucleados possuem maior viabilidade do que grãos de pólen trinucleados (Brewbaker & Kwack, 1963; Stanley & Linskens, 1974; Frankel & Galun, 1977). A segunda divisão meiótica provê o pólen de reservas suficientes para lhe permitir boa longevidade e formação do tubo polínico (Brewbaker & Kwack, 1963).

As alterações fisiológicas ocasionalmente ocorridas durante o armazenamento do pólen podem concorrer para o decréscimo da viabilidade. Alteração na velocidade de respiração e conversão dos açúcares e ácidos orgânicos, acúmulo de produtos metabólicos secundários, alteração dos lipídeos da exina do pólen são exemplos de tais transformações (Stanley & Linskens, 1974).

2.3.1 Uso de Sílica-Gel e Dessecador

O teor de umidade do pólen é um dos fatores mais importantes envolvendo o armazenamento e normalmente encontra-se negativamente relacionado à longevidade (Sousa, 1988). O baixo teor de umidade do pólen (8 a 10%) quando armazenado, propicia boa longevidade, independente do método de armazenamento (Sprague & Johnson, 1977). Um outro fator importante a ser

destacado no armazenamento de pólen é a composição da atmosfera que o envolve (umidade relativa, concentração de gases, vácuo, etc.).

A redução da umidade por meio da combinação de vácuo e sílica-gel é destacada por Arlgren & Arlgren (1978). Os autores armazenaram o pólen de *Pinus* com sucesso durante 8 anos, após tê-lo submetido à dessecação sobre sílica-gel em um congelador por 48 horas. Como parte do processo aplicaram vácuo de 2mmHg por um período de 20 a 30 minutos e armazenaram o pólen em ampolas à temperatura de 5°C.

Wang (1975) relatou bons resultados com conservação de pólen da espécie florestal *Picea abies* por um período de até 13 anos em recipientes tamponados com algodão e mantidos em dessecadores sobre sílica-gel e temperatura de -18°C. Dorman (1976) detectou que o dessecamento do pólen por 15 minutos através de vácuo (aproximadamente 5mmHg) proporcionou a redução de umidade ao nível adequado, enfatizando também a conveniência do dessecante sílica-gel.

Em trabalhos com *Delphinium* (esporinha), Honda et al. (2002) preservaram pólen com sílica-gel, verificando que após 180 dias houve alta taxa de germinação e bom crescimento de tubo polínico. Por outro lado, pólen armazenado a 25°C teve diminuição significativa na taxa de germinação dentro de 10 dias.

Ramos et al. (1996) citaram a necessidade da presença de sílica-gel no armazenamento para manutenção do potencial germinativo de grãos de pólen de ameixeira 'Januária' por curto período. Em grãos de pólen do pessegueiro 'Aurora', após um período de 30 dias de armazenamento em sílica-gel e temperatura ambiente, Oliveira Júnior et al. (1995) observaram que os mesmos sofreram queda drástica em sua viabilidade.

Stanley & Linskens (1974) relataram que o armazenamento de pólen a vácuo é mais eficiente. Segundo os autores, em *Pinus* ocorreu germinação

depois de 2 anos e meio, quando o pólen foi armazenado sob vácuo à temperatura de 5°C. Todavia, o pólen armazenado a 5°C sem vácuo se manteve viável por 1 ano. Por outro lado, Sahar & Spiegel (1980) armazenaram pólen de tangerineira (*Citrus reticulata*) e trifoliata (*Poncirus trifoliata*) em atmosfera de N₂ ou CO₂ e temperatura de -18°C.

Sousa (1988) armazenou pólen de eucalipto em freezer (-16°C) e em refrigerador (4°C), em frascos de vidro colocados dentro de dessecadores e após 3 meses de armazenamento, verificou que a temperatura de -16°C foi mais adequada. Já Pereira (2001) utilizou dessecador por 24 horas para reduzir a umidade de pólen de eucalipto antes do armazenamento em freezer.

Sprague & Johnson (1977) destacaram cinco métodos de armazenamento de pólen: em refrigerador a 2°C sob vácuo, em refrigerador a 2°C em frascos tampados com borracha, em freezer a -20°C sob vácuo, em frascos tampados com algodão a 2°C e em frascos tampados com algodão sob vácuo e com LiCl a 2°C. O autor salientou que a utilização de vácuo e temperatura de -20°C foram mais efetivos.

Wang (1975) observou que o pólen de Kiwi (*Actinidia chinensis* e *Actinidia eriantha*) armazenado dentro do dessecador com sílica-gel permaneceu viável por aproximadamente 100 dias.

2.3.2 Temperatura para o armazenamento

As condições de armazenamento determinam o sucesso no processo de conservação do pólen. Dentre os fatores externos que influenciam negativamente na longevidade, a temperatura é o principal fator a ser considerado.

O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Pode-se conseguir redução de temperatura por meio de refrigeradores e freezers, que são

de fácil acesso, entretanto outros métodos mais sofisticados, como gases liquefeitos também são utilizados. A decisão com respeito ao método empregado dependerá do objetivo do armazenamento, bem como da característica da espécie trabalhada.

Parton et al. (2002) armazenaram pólen de *Bromeliaceas* em nitrogênio líquido (-196°C) sem perda considerável da viabilidade. Foi necessário um período de desidratação de 4 horas antes e um período de reidratação de 1 hora após a criopreservação. Sparks & Yates (2002) observaram que o pólen de noqueira pecan (*Carya illinoensis*) permaneceu viável por 1, 10, 11, 12 e 13 anos em nitrogênio líquido. Ganeshan & Alexander (1991) armazenaram pólen de limão em nitrogênio líquido (-196°C) durante 3 anos e meio e constataram que a taxa de germinação de pólen foi semelhante à de pólen fresco.

O pólen de inhame branco (*Dioscorea rotundata*) foi armazenado por Daniel et al. (2002) durante 2 anos à temperaturas de -80, -20, 5 e 15°C. Os autores observaram que embora tenha havido manutenção da capacidade de germinação em todos os níveis de temperatura de armazenamento, verificou-se perda significativa na viabilidade do pólen armazenado a 5 e 10°C depois de 100 dias de armazenamento. Após 700 dias, grãos de pólen armazenados a 5 e 10°C perderam a capacidade de germinação, enquanto o pólen congelado (-80 e -20°C) manteve-se viável.

Bombem et al. (1999) armazenaram pólen de kiwi (*Actinidia chinensis*) a 4, -18 e -80°C, com germinação testada a cada 2 meses durante o primeiro ano e a cada 6 meses nos anos seguintes. O pólen armazenado a 4°C teve diminuição rápida e linear na germinação, não havendo germinação após 24 semanas. O armazenamento a -18°C manteve um índice de germinação considerável (40 e 60%) durante 80 semanas. Pólen armazenado a -80°C manteve-se viável após 160 semanas.

Em estudos com tremoço amarelo (*Lipunus luteus*), Andrada & Hill (1999) armazenaram pólen a -18, 3, 15 e 25°C e observaram redução depois de 2 anos de armazenamento a -18 e 3°C, embora 10,8% dos grãos de pólen tenham permanecido viáveis. No armazenamento em temperatura acima de 15°C não houve germinação. Entretanto, Alantas et al. (2002), observaram que pólen de morango armazenado a 22, 4, -4 e -18°C manteve-se viável a -18°C por 20 meses. Takatsu et al. (2001) armazenaram, por vários anos, pólen de gladiolo em temperatura ambiente, -20 e -80°C. Melhores resultados foram obtidos com baixas temperaturas.

Oliveira et al. (2001) determinaram a viabilidade de pólen em 20 genótipos de açazeiro. Os grãos de pólen foram armazenados em freezer (-10°C), com períodos de armazenamento de 1, 3, 6, 12 meses. Os genótipos apresentaram redução na viabilidade com o aumento do período de armazenamento. Siregar & Sweet (2000) estudaram pólen de Pinus armazenado a 4°C, por um ano, e obtiveram um índice de germinação de 84%, comparado com 93% de viabilidade do pólen fresco.

Mardi et al. (2000) secaram grãos de pólen de palma (*Phoenix dactylifera*) e armazenaram em congelador (-18°C), refrigerador (4 a 5°C) e temperatura ambiente (23 a 25 °C) durante 6 e 12 meses. O pólen mantido em refrigerador e freezer obteve maior porcentagem de germinação, enquanto no armazenado à temperatura ambiente a germinação foi severamente reduzida. Pólen de cactos do gênero *Hylocereu*, armazenado a 4, -18, -70 e -196°C durante 3 e 9 meses teve sua viabilidade reduzida em 4°C, enquanto o pólen congelado manteve seu índice de germinação semelhante ao do pólen fresco (Metz et al., 2000).

Gomez et al. (2000), analisando pólen de amêndoas durante 8 semanas de armazenamento à temperatura de 4 e 22°C, verificaram que a capacidade de germinação diminuiu rapidamente a 22°C após a segunda semana, mas manteve

50% de viabilidade a 4°C por 8 semanas. Entretanto, Oliveira Júnior et al. (1995) armazenaram polens de pessegueiro ‘Aurora’ (*Prunus pérsica*) à temperatura ambiente por 15 e 30 dias e não obtiveram resultados satisfatórios, com 1,81% de germinação aos 30 dias de armazenamento. Já Eenik (1983) armazenou pólen de alface em temperatura ambiente (20°C) e refrigerador (4°C), observando perda de viabilidade após 2 dias à temperatura ambiente. Entretanto, em refrigerador esta perda ocorreu após 4 dias, indicando que temperaturas baixas são responsáveis pela manutenção da viabilidade do pólen por um período prolongado de tempo.

Avaliando o efeito do armazenamento, a curto prazo, de pólen de pistache (*Pistacea vera*) em condições de temperatura ambiente (25°C e 35% de umidade relativa constante), refrigeração (4°C) e freezer (-20°C), Vaknin & Eisikowitch (2000) verificaram que grãos de pólen em temperatura ambiente perderam a viabilidade após 7 dias. Já sob refrigeração, os grãos de pólen mantiveram-se viáveis durante pelo menos uma semana, enquanto o pólen congelado perdeu parte de sua viabilidade em uma semana. O pólen dentro das anteras manteve sua viabilidade em temperatura ambiente por 2 dias.

Pólen de eucalipto foi armazenado por Sousa (1988) em freezer (-16°C) e em refrigerador (-4°C) dentro de dessecadores. Após 3 meses de armazenamento, verificou-se que a temperatura de -16°C foi mais adequada. Já Pereira (2001) armazenou pólen de eucalipto em freezer (-4°C) por 1, 2 e 3 meses, constatando decréscimo na viabilidade do pólen no decorrer do período de armazenamento.

2.3.3 Composição do meio de cultura

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar qualitativa e quantitativamente os componentes necessários para a melhor composição do

meio de cultura para a germinação de grãos de pólen. O meio de cultura deve ser constituído basicamente por carboidratos e elementos estimulantes como ácido bórico, ácido cítrico, nitrato de cálcio e reguladores de crescimento, dentre outros.

Na germinação de grãos de pólen *in vitro*, geralmente considera-se que o tubo polínico foi emitido quando seu comprimento for igual ou maior que o diâmetro do grão de pólen. O método consiste em germinar uma pequena amostra num meio apropriado e observar em microscópio, depois de determinado período, o número de grãos que emitiram tubo polínico. A composição do meio e o pH estão entre os fatores que afetam a germinação. Os grãos de pólen das angiospermas necessitam de uma fonte de carbono, de boro, e freqüentemente de outros nutrientes para promover a sua germinação (Galletta, 1983).

Os principais componentes do meio de cultura para a germinação de pólen têm sido os diferentes tipos e concentrações de açúcares e distintas concentrações de boro (Miranda & Clement, 1990). A sacarose empregada no meio de cultura tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974).

Kobayashi et al. (1991) obtiveram 50% de germinação de grãos de pólen em híbrido de *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* utilizando meio de cultura contendo 20% de sacarose. Diferentes concentrações de glicose foram testadas na germinação de grãos de pólen de algumas variedades cítricas e os melhores resultados foram obtidos com 150 gL⁻¹ de glicose, apresentando em média 59% de germinação (Butt et al., 1993).

Segundo Pfahler (1967), a adição de boro é importante 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 o comprimento do tubo polínico de várias frutíferas de clima temperado.

Parton et al. (2002), estudando a germinação de grãos de pólen em bromeliáceas, determinaram que o meio contendo 200gL^{-1} de sacarose, 10gL^{-1} de ácido bórico e 5gL^{-1} de ágar apresentou melhores resultados. A germinação, a viabilidade e o desenvolvimento do tubo polínico em pólen de cebola (*Allium cepa*) foram maiores em meio contendo 1% de ágar, 100 ppm de ácido bórico e 5% de cinetina (Harikarunakar & Haripriya, 2000).

Aplicação de boro foliar em amêndoas reduziu o estouramento e tubos polínicos durante a germinação *in vitro*, e a adição de 100mgL^{-1} de boro aumentou a germinação de grãos de pólen *in vitro* (Nyomora et al., 2000).

Em cássia, a germinação de grãos de pólen foi maior em meio de cultura contendo 10% de sacarose e 200mgL^{-1} de ácido bórico (Ashoke et al., 1999). Bomben et al. (1999), estudando a germinação de grãos de pólen em kiwi, utilizaram meio de cultura composto por 100gL^{-1} de sacarose, $0,025\text{gL}^{-1}$ de ácido bórico e 6gL^{-1} de ágar. Andrada & Hill (1999) observaram em tremoço (*Lipinus luteus*) que o meio de cultura contendo 20% de sacarose, 0,01% de ácido bórico e 0,25% de ágar proporcionaram melhores resultados para germinação.

A adição de cálcio ao meio de cultura durante a 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, e crescimento em forma linear, suave e aparência rígida (Bhojwani & Bhatnagar, 1974). Há maior permeabilidade da membrana do tubo polínico na ausência desse elemento, causando a liberação de metabólitos internos para o meio externo (Stanley & Linskens, 1974). Oliveira Júnior

(1996), pesquisando emissão de tubos polínicos em limoeiro cravo (*Citrus limon*), obteve bons resultados com concentração de 800 ppm de cálcio. Beyoung (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.

Em estudos utilizando o cálcio e boro foi evidenciado que esses são importantes promotores na germinação e alongamento do tubo polínico (Kwack & Brewbaker, 1963; Sahar & Spiegel, 1980).

Brewbaker & Kwack (1963), trabalhando com 86 espécies e 39 famílias, mostraram que cálcio em adição ao boro é um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*. Em trabalhos com germinação de grãos de pólen de três cultivares de citros após um período de um ano de armazenamento, Sahar & Spiegel (1980) estimularam a germinação utilizando ácido bórico e nitrato de cálcio. Silva (1996) constatou que o melhor meio para a germinação de pólen de maracujazeiro é composto por 50gL^{-1} de sacarose, $0,2\text{gL}^{-1}$ de ácido bórico e $1,0\text{gL}^{-1}$ de nitrato de cálcio. Tuinstra & Wendel (2000), em experimentos com sorgo (*Sorghum vulgare*), observaram que no meio de cultura contendo 0,9M de sacarose, 2,43mM de ácido bórico e 2,12mM de nitrato de cálcio a germinação de grãos de pólen foi maximizada.

2.3.4 Temperatura de incubação e período de germinação

Outros fatores de grande importância no controle das condições ambientais e que influenciam significativamente na fertilidade dos grãos de pólen são a temperatura e o tempo necessários para a germinação do pólen.

A germinação de pólen de Pinus foi observada depois de 8 dias a 3° C, enquanto a 15° C germinou em 2 dias e a 30° C começou a germinar em 6 horas (Worsley, 1959). Entretanto, Dorman (1976) observou que a temperatura entre

25 e 26°C é mais indicada para a germinação de pólen de Pinus. Por outro lado temperaturas 25°C e 30°C seriam as mais adequadas para germinação de várias espécies de Eucalipto (Boden, 1958).

Silva (1996) estudou diferentes temperaturas de germinação de pólen de maracujazeiro: 20, 24, 28 e ambiente (25°C), obtendo melhores resultados com 28°C. Já Rugeiro et al. (1976) observaram que os grãos de pólen de maracujazeiro amarelo mantidos a 24 e 25°C iniciaram a germinação 30 minutos após a colocação no meio artificial, 6 horas depois não houve mais formação de tubos polínicos.

Na avaliação de pólen de pereira (*Pyrus Communis*), Vasilakakis & Porlings (1985) notaram uma redução na germinação abaixo de 15°C, ao passo que a taxa de crescimento do tubo polínico *in vitro* aumentou com a temperatura entre 5 e 25°C.

Rosell et al. (1999) observaram que a temperatura ótima para germinação de grãos de pólen de cherimóia (*Anona squamosa*) variou de 20 a 25°C. Em experimentos feitos com grãos de pólen de kiwi (*Actinidia chinensis*), Boden (1958) observou que a temperatura ideal foi de 27°C. Tuinstra & Wendel (2000), estudando sorgo (*Sorghum bicolor*), verificaram que a germinação de pólen não era afetada no intervalo entre 20 e 40 °C, mas a viabilidade foi significativamente reduzida à temperatura de 10°C.

O potencial de emissão e formação do tubo polínico do grão de pólen fresco ou armazenado por um período curto é principalmente determinado pela integridade de membranas (Shivanna & Heslop Harrison, 1981; Hoekstra & Wall, 1988). Temperaturas em torno de 25°C são satisfatórias para o início da emissão do tubo polínico (Ebadi et al., 1995).

Parton et al. (2002), estudando várias espécies de bromeliáceas, verificaram que a germinação máxima foi alcançada dentro de 6 a 12h, dependendo da espécie. Leech et al. (2002), em experimentos com morango,

constataram que as porcentagens de germinação mais altas ocorreram sempre após 6 horas.

2.3.5 Outros fatores que influenciam a germinação

Além dos fatores já citados, evidencia-se como um dos mais importantes a alta umidade relativa necessária durante o período de germinação (Souza, 1988). Essa umidade pode ser conseguida por meio da absorção de água do meio de cultura pelo grão de pólen.

Quanto ao número de grãos de pólen a serem observados na avaliação da viabilidade do pólen, Duffield & Snow (1941) relataram estudos com apenas 50 grãos tomados ao acaso. A densidade de pólen deve ser baixa o suficiente para facilitar o exame dos grãos individualmente (Snyder & Clausen, 1974). A avaliação da porcentagem de germinação de pêsego (*Prunus* sp) foi feita por Farmer & Hall (1974), por meio da contagem de 100 grãos de pólen por repetição.

O manejo do pólen também pode influenciar na germinação. Pode-se incluir neste caso o período de coleta e a posição dos botões florais na copa. Podem ocorrer variações na germinação do pólen dentro de uma mesma árvore (Sousa, 1988).

De acordo com Boden (1958), existem variações na floração em diferentes “stands” e entre árvores individuais de cada “stand”. O autor afirma ainda que não há correlação entre abundância de pólen e porcentagem de germinação. Dessa forma, quando se coleta o material em floração no campo, corre-se o risco de ter pólen de árvores com baixa porcentagem de germinação, recomendando-se a coleta de pólen de várias árvores. O estado nutricional da planta fornecedora de pólen é também um fator a ser considerado. Stanley &

Linskens (1974) evidenciaram que a nutrição mineral da planta durante o desenvolvimento do pólen pode afetar a germinação.

A separação do pólen das estruturas reprodutivas é aconselhável para o armazenamento. Todavia, o processo de extração pode tornar-se mais ou menos trabalhoso em função da espécie empregada (Sousa, 1988).

O estágio de desenvolvimento ideal do botão floral (“balão”) também é importante e o insucesso do teste de germinação pode ser devido ao manuseio do mesmo em estágio inadequado.

2.4 Características das espécies estudadas

Nos trabalhos de melhoramento genético, independentemente do método selecionado, é importante a escolha de cultivares relevantes comercialmente. No Brasil, a importância econômica está nas cultivares tardias, que são atualmente aquelas utilizadas para produção de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC). Dentre essas cultivares destacam-se a laranjeira ‘Pêra’, ‘Valência’ e ‘Natal’.

2.4.1 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra

A laranjeira ‘Pêra’ é a mais importante cultivar cítrica do Brasil, sendo a sua origem ainda controversa (Saunt, 2000).

As árvores desta cultivar apresentam porte médio, com galhos mais ou menos eretos e folhas acuminadas, embora demonstrem variações em função dos diferentes clones e condições edafoclimáticas de cultivo (Moreira & Rodrigues Filho, 1962). A colheita ocorre predominantemente de junho a outubro no Brasil (Saunt, 2000). Os frutos são pequenos, de coloração laranja, com 3 a 4 sementes em cada e forma oblonga, com maior altura que diâmetro, com freqüente

ocorrência de pescoço na região basal (Moreira & Rodrigues Filho, 1962; Donadio et al., 1995). O peso médio dos frutos é de 145g, tendo em média 52% de suco, 11,8% de Brix, 0,95% de acidez e 12,5% de “ratio” (Figueiredo, 1991). A casca dos frutos é de espessura fina a média, quase lisa e com vesículas de óleo em nível. A polpa é de cor laranja viva e textura firme (Figueiredo, 1991).

A cultivar é bastante produtiva, com produção média de 250 kg/planta /ano, de maturação tardia, sendo que os frutos conservam-se no pé por alguns meses depois de maduros (Moreira & Rodrigues Filho, 1962; Figueiredo, 1991).

A laranja ‘Pêra’ é uma das melhores cultivares para a produção de suco (Donadio et al., 1995). Os frutos também apresentam grande aceitação no mercado *in natura* (Figueiredo, 1991).

A laranjeira ‘Pêra’ é altamente suscetível a “Clorose variegada dos citros” (Oliveira et al., 2001b), ao “Vírus da tristeza” (Donadio et al., 1995) e ao “Cancro cítrico” (Oliveira et al., 2001a).

2.4.2 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Valência

A suposição é de que essa cultivar seja de origem espanhola, sem, contudo evidências concretas.

As árvores são de porte médio a grande, com folhagem abundante. Sua produção é muito boa, podendo atingir mais de 200kg de fruto por planta (Figueiredo, 1991).

Os frutos são quase esféricos, de tamanho médio, pesando em média 150g, com vesículas de óleo em nível, a casca é quase lisa e cor de laranja, com espessura média. A polpa é de cor laranja carregada e textura firme e sulcosa, contendo de 5 a 6 sementes (Donadio et al., 1995).

O suco é ácido e de sabor, agradável apresentando 50% do peso do fruto, com teores médios de brix de 11,8%, acidez 1,05% e “ratio” de 11,2% (Figueiredo, 1991).

O destino do fruto é o consumo ‘in natura’, nos mercados interno e externo, ou a indústria de suco (Moreira & Rodrigues Filho, 1962). É uma cultivar que apresenta maturação de frutos de meados de agosto a dezembro (Figueiredo, 1991).

2.4.3 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Natal

A laranjeira ‘Natal’ é de origem desconhecida, admitindo-se que seja provavelmente uma mutação da laranjeira ‘Valência’.

As árvores são de grande porte, com copa arredondada e folhagem abundante. Sua produtividade atinge mais de 250kg de fruto por planta por ano (Figueiredo, 1991).

Os frutos são de tamanho médio, quase esféricos, com 3 a 4 sementes (Moreira & Rodrigues Filho, 1962). Embora a casca seja fina, resiste muito bem ao transporte (Donadio et al., 1995). A polpa é de cor alaranjada e textura firme, seu suco é abundante e representa 50% do peso do fruto, apresentando teores médios de brix de 12%, acidez 1% e “ratio” de 12 (Figueiredo, 1991).

A época de colheita é de julho a dezembro, sendo definida como cultivar de maturação tardia. O fruto destina-se ao consumo interno (Donadio et al., 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Minas Gerais, no ano de 2002, durante o período de floração, setembro e outubro, das cultivares cítricas ‘Valência Americana’, ‘Pêra Rio Tardia’ e ‘Natal.’ Estas cultivares estão localizadas no pomar da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), no município de Lavras – MG, e são componentes de uma coleção de cultivares cítricas.

O município de Lavras está localizado a 21°14’06” de latitude sul e 45°00’00” de longitude oeste, a 918 metros acima do nível do mar. Predomina na região clima do tipo Cwb, com duas estações bem definidas: uma chuvosa no período de outubro a março e a outra seca, que se estende de abril a setembro. A temperatura média anual é de 19,4°C, com precipitação de 1.529,7mm e umidade relativa de 76,2% (Vianello & Alves, 1991).

3.2 Escolha e coleta dos botões florais

Para a realização do trabalho, foram selecionadas duas plantas de cada cultivar. Os botões florais foram colhidos em estágio “balão”, eliminando-se aqueles que estavam abertos, de acordo com a metodologia de Pasqual et al. (1982). Foram coletados aleatoriamente, em todas as partes da planta, no período da manhã, próximo as 8 horas, e transportados para o laboratório em placas de Petri fechadas.

As anteras foram separadas das estruturas florais por intermédio de uma pinça e colocadas em placas de Petri forradas com papel de filtro, mantidas destampadas e submetidas à temperatura de 28°C ± 1°C por 48 horas para que

ocorresse a antese e também para que o pólen tivesse seu teor de umidade reduzido, de acordo com a metodologia de Sousa (1988).

3.3 Procedimentos para o armazenamento

As anteras com os grãos de pólen de cada cultivar foram colocadas em frascos de vidro (5,5 x 2,5cm) tampados e armazenados.

Os tratamentos foram constituídos de 3 temperaturas de armazenamento: -10°C (freezer), 4°C (refrigerador) e temperatura ambiente; 2 ambientes (com e sem dessecador) e na presença e ausência de sílica-gel. Foram utilizados 12 frascos contendo os tratamentos para as três cultivares, perfazendo um total de 36 frascos.

A avaliação do índice de germinação foi feita com o pólen fresco e a cada 7 dias, colocando o pólen de cada frasco no meio de cultura e levando-o para câmara de crescimento tipo BOD por 12 horas. Este processo foi repetido por 9 semanas, que é o período de intervalo entre as cultivares de florescimento precoce e tardio.

3.4 Composição do meio de cultura

A viabilidade do pólen *in vitro* foi estudada através da germinação dos grãos de pólen em meio de cultura contendo 1% de ágar e 10% de sacarose, 800mgL⁻¹ de nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂ 4H₂O), 200mgL⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃) e pH corrigido para 6,5.

3.5 Procedimento para o teste de germinação

O meio de cultura foi vertido em placas de Petri de plástico (aproximadamente 10ml por placa) e os grãos de pólen foram espalhados sobre a superfície do meio com o auxílio de um pincel.

As placas de Petri contendo o pólen foram colocadas em BOD à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 horas. Não se utilizou controle do fotoperíodo, pois Carvalho (1983) sugere que os promotores de crescimento dirigem o tubo polínico em direção ao ovário por quimiotropismo.

As avaliações foram realizadas pela porcentagem de grãos de pólen germinados, em microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x, avaliando 4 campos de visão, que foram equivalentes a 4 repetições. Em cada campo de visão foram contados todos os grãos de pólen germinados ou não (Figura 1). Segundo Sousa (1988), grãos de pólen germinados são aqueles cujos tubos polínicos tenham ultrapassado o comprimento do diâmetro do próprio pólen, conforme a Figura 2.

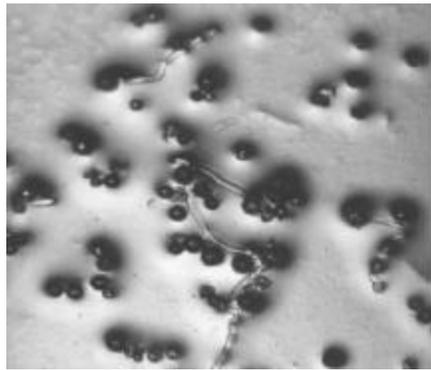


FIGURA 1: Campo de visão, em microscópio, com grãos de pólen germinados e não germinados da cultivar Valência.



FIGURA 2: Grão de pólen germinado da cultivar Valência

3.6 Análise estatística dos dados

Para a análise da viabilidade do pólen armazenado, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando-se 4 repetições, representadas pelos 4 campos de visão contados na placa de Petri. Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = m + a_i + b_k + a_{bik} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} : valor observado na variedade i , tratamento k e repetição j ;

m : média geral;

a_i : efeito da variedade i ($i = 1, 2, 3$);

b_k : efeito do tratamento k ($k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12$);

a_{bik} : efeito do tratamento dentro de cada variedade k , dentro de cada variedade i ;

e_{ijk} : efeito da repetição j , dentro da variedade i , no tratamento k .

Foram feitas 9 avaliações de germinação e para cada avaliação foi feita uma análise estatística em fatorial. Nas duas primeiras semanas foi utilizado um delineamento fatorial 3 x 12 na terceira semana 3 x 11; da quarta à oitava semana, 3 x 7; e na nona, 3 x 6, ou seja, diferentes números de tratamentos para cada época de avaliação.

O tratamento considerado como testemunha (pólen fresco) não foi submetido ao armazenamento, o pólen foi avaliado logo após a antese.

Na análise de variância foi utilizado o teste de “F”, e para a comparação de médias, o teste de “Scott Knott”. As análises foram realizadas procurando-se verificar o efeito das diferentes técnicas de armazenamento dentro de cada cultivar estudada.

4 RESULTADOS

Verifica-se que houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade para a interação cultivar x tratamento na quarta e quinta semanas de observação. Demais interações foram significativas ao nível de 1% de probabilidade em todas as épocas de observação, conforme se observa na Tabela 1. Esses resultados confirmam que a porcentagem de germinação é dependente de alguns fatores, principalmente aqueles relacionados ao armazenamento.

Os coeficientes de variação obtidos para os períodos avaliados foram baixos, levando a crer que os fatores externos tenham exercido pouca influência sobre os tratamentos. Observa-se que houve efeito significativo para o estudo dos fatores isolados (cultivares e tratamentos) ao nível de 1% de probabilidade em todas as épocas avaliadas.

TABELA 1: Resumo das análises de variância da porcentagem de germinação de grãos de pólen em diferentes épocas de avaliação. UFLA, Lavras, 2002.

Fonte de Variação	Pólen fresco		1ª semana		2ª semana		3ª semana	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Cultivar	2	64,3**	2	392,8**	2	362,86**	2	200,60**
Tratamento	-	2,13	11	124,18**	11	167,80**	10	228,97**
Cultivar x Tratamento	-		22	12,28**	22	16,16**	20	8,42**
Erro	9		108	2,08	108	1,35	99	1,501
Total	11		143		143		131	
CV (%)	9,72		14,4		14,81		19,45	
Média Geral	15,04		10,01		7,87		6,3	

4ª semana		5ª semana		6ª semana		7ª semana		8ª semana		9ª semana	
GL	QM	GL	QM								
2	135,29**	2	108,29**	2	312,55**	2	233,01**	2	194,64**	2	48,57**
6	21,11**	6	42,92**	6	361,26**	6	643,87**	6	510,02**	5	93,24**
12	1,86*	12	2,00*	12	46,98**	12	88,20**	12	92,60**	10	7,61**
63	1,153	63	0,93	63	93,52	63	73,51	63	54,64	54	0,67
83		83		83		83		83		71	
12,87		12,95		18,71		19,74		20,46		19,76	
8,34		7,44		6,51		5,47		4,55		4,15	

** , * significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios de germinação de grãos de pólen obtidos para a cultivar Pêra, de acordo com os diferentes tratamentos de armazenamento nas referidas épocas de avaliação.

TABELA 2: Porcentagem de germinação de grãos de pólen da cultivar Pêra, submetidos a diferentes técnicas de armazenamento durante 9 semanas. UFLA, Lavras, 2002.

Trat.	Pólen fresco	1^a sem.	2^a sem.	3^a sem.	4^a sem.	5^a sem.	6^a sem.	7^a sem.	8^a sem.	9^a sem.
1: Amb. /cs/cd *	12,82 a	11,65 b	5,7 c	1,95 c	-	-	-	-	-	-
2: Amb. /ss/cd	12,82 a	3,55 d	0,74 d	-	-	-	-	-	-	-
3: Amb. /cs/sd	12,82 a	4,06 d	2,23 d	1,0 c	-	-	-	-	-	-
4: Amb. /ss/sd	12,82 a	7,16 c	1,13 d	-	-	-	-	-	-	-
5: Refrig. /cs/cd	12,82 a	10,68 b	8,60 b	7,26 b	7,67 b	5,63 c	4,60 b	3,99 d	4,18 c	2,15 b
6: Refrig. /ss/cd	12,82 a	9,53 b	8,74 b	5,97 b	5,95 c	4,48 c	2,54 b	1,04 e	0 d	-
7:Refrig. /cs/sd	12,82 a	11,22 b	8,99 b	8,36 a	-	8,00 a	7,20 a	5,50 c	3,36 c	2,90 b
8:Refrig. /ss/sd	12,82 a	4,49 d	1,21 d	1,12 c	-	-	-	-	-	-
9: Freezer /cs/cd	12,82 a	12,74 a	10,87 a	9,30 a	8,18 b	8,02 a	7,85 a	7,36 b	7,31 a	6,93 a
10: Freezer /ss/cd	12,82 a	10,63 b	10,74 a	10,04 a	9,90 a	9,31 a	8,84 a	8,99 a	8,51 a	7,94 a
11: Freezer /cs/sd	12,82 a	12,58 a	9,01 b	7,98 a	8,59 b	6,77 b	7,25 a	7,17 b	5,63 b	3,30 b
12: Freezer /ss/sd	12,82 a	13,25 a	11,55 a	8,92 a	7,76 b	6,53 b	4,97 b	4,01 d	3,08 c	3,53 b

Médias em uma mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

* cs: com sílica-gel; ss: sem sílica-gel; cd: com dessecador; sd: sem dessecador.

Verifica-se que para a cultivar Pêra, que na primeira semana de observação os grãos de pólen armazenados em freezer, excluindo-se aquele na ausência de sílica em dessecador (tratamentos 10, 11 e 12), apresentaram maiores porcentagens de germinação em relação aos demais e não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de médias Scott Knott (Tabela 2). Menores índices de germinação foram observados em temperatura ambiente sem

sílica dentro de dessecador (2), com sílica sem dessecador (3), e ainda em refrigerador sem sílica e dessecador (8).

Na segunda semana, os tratamentos em freezer, excluindo-se aquele na ausência de dessecador com sílica (9, 10 e 12), tiveram maiores porcentagens de germinação de pólen. Menores percentuais de germinação foram semelhantes aos da semana anterior, juntamente com o tratamento em temperatura ambiente sem sílica e dessecador (4).

Na terceira semana, todos os tratamentos em freezer (9, 10, 11 e 12), além daquele em refrigerador com sílica fora do dessecador (7), tiveram melhores percentuais de grãos de pólen germinados. E aqueles em refrigerador sem sílica e dessecador (8) e todos em temperatura ambiente (1, 2, 3 e 4) obtiveram menores índices de germinação.

Na quarta semana, apenas o pólen mantido em freezer na ausência de sílica dentro de dessecador (10) obteve maior porcentagem de germinação. O menor índice de germinação foi observado em refrigerador, sem sílica e com dessecador (6). Os tratamentos em refrigerador fora de dessecadores na ausência ou presença de sílica-gel (7 e 8) e aqueles em temperatura ambiente não apresentaram polens germinados.

Na quinta semana, grãos de pólen mantidos em freezer dentro de dessecador, com ou sem sílica (9 e 10), e sem dessecador com sílica em refrigerador (7) obtiveram maiores percentuais de germinação. E aqueles em refrigerador dentro do dessecador (5 e 6) tiveram menores índices de germinação. Na quinta e sexta semanas os mesmos tratamentos anteriores, juntamente com aquele em refrigerador com sílica sem dessecador (7) e com sílica na ausência de dessecador em freezer (11), tiveram maiores percentuais germinação.

Na sétima semana, a maior porcentagem de grãos de pólen germinados foi obtida com sílica em dessecador e em freezer (10). A partir da oitava semana, os tratamentos em freezer dentro de dessecador (9 e 10) tiveram bons índices de

germinação. Menores percentuais de germinação foram obtidos em refrigerador sem sílica (6) e em freezer sem sílica e dessecador (12) na oitava semana. Até a nona semana, os tratamentos dentro de refrigerador com sílica (5 e 7) e em freezer sem dessecador (11 e 12) também permaneceram viáveis, embora em níveis mais baixos.

Na Tabela 3 são mostrados os valores médios de germinação de grãos de pólen, obtidos para a cultivar Valência, de acordo com os diferentes tratamentos de armazenamento nas épocas de avaliação.

Verifica-se, para a cultivar Valência, que na primeira semana de observação os tratamentos em freezer sem dessecador (11 e 12) e em refrigerador com sílica e sem dessecador (7) tiveram maiores percentuais de grãos de pólen germinados e não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de médias Scott Knott (Tabela 3). Menores índices de germinação foram observados em pólen em temperatura ambiente e em refrigerador sem sílica e dessecador (4 e 8).

Na segunda semana, o pólen em refrigerador com sílica e sem dessecador (7) e todos os tratamentos em freezer, com exceção daquele na presença de sílica e dessecador (10, 11 e 12), tiveram melhores índices de germinação. Menores porcentagens de germinação foram semelhantes aos da semana anterior.

Na terceira semana, o pólen mantido em refrigerador com sílica dentro de dessecador (5) e em freezer, sem dessecador, e ainda sem sílica dentro de dessecador (10, 11 e 12), tiveram maiores índices de germinação. Os grãos de pólen armazenados em temperatura ambiente (1, 2, 3, e 4) e refrigerador na ausência de sílica e dessecador (8) tiveram menores percentuais de germinação e perderam a capacidade de germinar.

TABELA 3: Porcentagem de germinação de grãos de pólen da cultivar Valência, submetidos a diferentes técnicas de armazenamento durante 9 semanas. UFLA, Lavras, 2002.

Trat.	Pólen fresco	1 ^a sem.	2 ^a sem.	3 ^a sem.	4 ^a sem.	5 ^a sem.	6 ^a sem.	7 ^a sem.	8 ^a sem.	9 ^a sem.
1: Amb. /cs/cd *	19,67 a	14,60 b	12,30 b	2,28 d	-	-	-	-	-	-
2: Amb. /ss/cd	19,67 a	12,11 c	11,18 b	2,27 d	-	-	-	-	-	-
3: Amb. /cs/sd	19,67 a	11,28 c	8,96 c	2,31 d	-	-	-	-	-	-
4: Amb. /ss/sd	19,67 a	6,63 d	2,68 d	-	-	-	-	-	-	-
5: Refrig. /cs/cd	19,67 a	11,82 c	12,38 b	13,84 a	8,74 b	6,56 b	6,53 c	3,70 c	2,60 c	1,71 c
6: Refrig. /ss/cd	19,67 a	9,90 c	8,40 c	8,22 c	9,34 b	7,78 b	5,53 c	1,67 d	2,52 c	-
7:Refrig. /cs/sd	19,67 a	17,42 a	15,36 a	12,09 b	12,12 a	11,53 a	11,65 a	11,32 a	8,69 a	8,24 a
8:Refrig. /ss/sd	19,67 a	8,40 d	4,23 d	0,76 d	-	-	-	-	-	-
9: Freezer /cs/cd	19,67 a	16,09 b	12,41 b	11,87 b	12,38 a	10,85 a	11,85 a	9,99 a	9,38 a	8,84 a
10: Freezer /ss/cd	19,67 a	15,17 b	14,55 a	13,33a	12,63 a	11,90 a	9,90 b	11,45 a	8,99 a	7,97 a
11: Freezer /cs/sd	19,67 a	17,09 a	14,48 a	13,71 a	10,56 b	10,61 a	9,22 b	7,84 b	6,30 b	3,56 b
12: Freezer /ss/sd	19,67 a	18,18 a	15,38 a	14,97 a	10,27 b	8,01 b	8,49 b	6,73 b	6,30 b	2,06 c

Médias em uma mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

* cs: com sílica-gel; ss: sem sílica-gel; cd: com dessecador; sd: sem dessecador.

Na quarta semana, os tratamentos em freezer dentro de dessecador (9 e 10) e em refrigerador com sílica sem dessecador (7), apresentaram maiores percentuais de grãos de pólen germinados. Na quinta semana o polens mantidos em freezer com sílica e/ou dessecador (9, 10 e 11), juntamente com o tratamento mantido em refrigerador com sílica e sem dessecador (7) tiveram melhores índices de germinação.

Na sexta semana, os melhores percentuais de germinação foram verificados em refrigerador com sílica fora do dessecador (7) e em freezer com sílica e dessecador (9).

A partir da sétima semana, os tratamentos em freezer dentro de dessecador (9 e 10) e em refrigerador com sílica e sem dessecador (7) tiveram melhores índices de grãos de pólen germinados. Menores índices foram observados em freezer sem dessecador (11 e 12) e em refrigerador dentro de dessecador (5 e 6).

Na nona semana, os tratamentos mantidos em freezer na ausência de dessecador (11 e 12) e em refrigerador com sílica e dentro de dessecador (5) também apresentaram viabilidade, embora em baixos níveis.

Na Tabela 4 estão os valores médios de germinação de grãos de pólen, obtidos para a cultivar Natal, de acordo com os diferentes tratamentos de armazenamento nas épocas de avaliação.

Verifica-se, para a cultivar Natal, que na primeira semana de observação os tratamentos mantidos em refrigerador na ausência de sílica-gel dentro de dessecador (6) e presença de sílica-gel fora de dessecador (7), juntamente com todos os tratamentos mantidos em freezer (9, 10, 11 e 12), tiveram maiores porcentagens de germinação em relação às demais e não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de médias Scott Knott (Tabela 4). Menor índice de germinação na primeira semana, foi observado em pólen armazenado em temperatura ambiente na ausência de sílica e dessecador (4), que apresentou menos de 1% de germinação.

Na segunda semana o tratamento submetido à temperatura de refrigerador na ausência de sílica e dentro de dessecador (6), juntamente com aqueles mantidos em freezer, excluindo os tratamentos em freezer na ausência de sílica-gel e dessecador (9, 10 e 11), apresentaram os melhores percentuais de grãos de pólen germinados. O tratamento na ausência de sílica-gel e dessecador

em refrigerador (8) e todos aqueles em temperatura ambiente (1, 2, 3 e 4) apresentaram menor índice de germinação. A partir da terceira semana, grãos de pólen em temperatura ambiente perderam a capacidade de germinação.

TABELA 4: Porcentagem de germinação de grãos de pólen da cultivar Natal, submetidos a diferentes técnicas de armazenamento durante 9 semanas. UFLA, Lavras, 2002.

Trat.	Pólen fresco	1 ^a sem.	2 ^a sem.	3 ^a sem.	4 ^a sem.	5 ^a sem.	6 ^a sem.	7 ^a sem.	8 ^a sem.	9 ^a sem.
1: Amb. /cs/cd *	12,63 a	7,70 b	2,06 d	-	-	-	-	-	-	-
2: Amb. /ss/cd	12,63 a	3,87 c	2,38 d	-	-	-	-	-	-	-
3: Amb. /cs/sd	12,63 a	4,76 c	1,89 d	-	-	-	-	-	-	-
4: Amb. /ss/sd	12,63 a	0,87 d	0 e	-	-	-	-	-	-	-
5: Refrig. /cs/cd	12,63 a	7,89 b	5,69 c	5,90 b	4,31 b	3,25 d	1,46 c	1,76 c	1,11 c	0,40 c
6: Refrig. /ss/cd	12,63 a	10,41 a	10,31 a	5,31 b	4,32 b	2,95 d	2,24 c	0 c	0 c	-
7:Refrig. /cs/sd	12,63 a	10,75 a	8,19 b	6,73 b	6,89 a	6,55 b	4,45 b	3,73 b	3,31 b	1,81 b
8:Refrig. /ss/sd	12,63 a	5,12 c	2,90 d	-	-	-	-	-	-	-
9: Freezer /cs/cd	12,63 a	10,58 a	10,55 a	9,48 a	8,38 a	8,49 a	8,03 a	7,35 a	6,61 a	6,53 a
10: Freezer /ss/cd	12,63 a	10,35 a	9,56 a	8,96 a	7,92 a	7,99 a	7,36 a	7,66 a	6,67 a	6,86 a
11: Freezer /cs/sd	12,63 a	10,46 a	10,04 a	7,83 a	7,10 a	6,01 b	4,17 b	2,72 b	1,0 c	0 c
12: Freezer /ss/sd	12,63 a	9,75 a	8,26 b	6,23 b	5,77 b	5,11 c	2,64 c	0,92 c	0 c	0 c

Médias em uma mesma coluna, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

* cs: com sílica-gel; ss: sem sílica-gel; cd: com dessecador; sd: sem dessecador.

Na terceira e quarta semanas, os mesmos tratamentos da semana anterior, armazenados em freezer (9, 10 e 11), continuaram com altas porcentagens de

germinação; e aquele em refrigerador (7) com sílica e sem dessecador também mostrou bom desempenho na quarta semana.

A partir da quinta semana os tratamentos em freezer dentro de dessecador (9, 10) obtiveram os melhores percentuais de grãos de pólen germinados. Menores índices de germinação foram obtidos em refrigerador em dessecador e na ausência e presença de sílica (5 e 6) e ainda em freezer sem sílica e dessecador (12). O pólen mantido em refrigerador sem sílica e sem dessecador (8) permaneceu viável até a sexta semana, aquele em freezer na ausência de sílica e dessecador (12) germinou até a sétima semana, e ainda o pólen mantido em freezer com sílica e sem dessecador (11) germinou até a oitava semana. No final das nove semanas, os tratamentos em refrigerador com sílica (5 e 7) também permaneceram viáveis, embora em níveis mais baixos.

Os valores médios de germinação de grãos de pólen obtidos para todas as cultivares, nas diferentes épocas de avaliação, estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5: Porcentagem de germinação de grãos de pólen das cultivares Pêra, Valência e Natal durante as nove semanas de observações. UFLA, Lavras, 2002.

Observações	Natal	Pêra	Valência
Pólen fresco	12,63 b	12,82 b	19,67 a
1ª semana	7,71 c	9,13 b	13,22 a
2ª semana	5,99 c	6,60 b	11,03 a
3ª semana	4,58 c	5,62 b	8,69 a
4ª semana	6,40 c	7,91 b	10,72 a
5ª semana	5,76 c	6,91 b	9,60 a
6ª semana	4,34 c	6,18 b	9,02 a
7ª semana	3,45 c	5,44 b	7,53 a
8ª semana	2,67 c	5,58 b	6,40 a
9ª semana	2,06 c	4,45 b	5,40 a

Médias em uma mesma linha seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 5, verifica-se que para o pólen fresco a porcentagem de germinação foi de 12,63% para ‘Natal’, 12,82% para a ‘Pêra’ e

não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de médias Scott Knott e 19,67% para 'Valência'. Embora o índice de viabilidade pareça baixo quando comparado com outras espécies, a quantidade de pólen que se deposita no estigma para que ocorra a fertilização é bem alta; além disso, as taxas de germinação de pólen *in vitro* são sempre mais baixas que *in vivo*.

A cultivar Natal apresentou desempenho insatisfatório e, em geral, perdeu sua viabilidade uma semana antes das demais. Foi verificada, ainda, uma superioridade na germinação dos grãos de pólen da 'Valência' em todos os tratamentos, seguida da 'Pêra', para todas as semanas observadas.

5 DISCUSSÃO

Evidenciou-se que a temperatura ambiente não foi uma boa técnica de armazenamento, sendo que a viabilidade caiu rapidamente e não passou da terceira semana em nenhuma cultivar. Esses resultados são corroborados por vários autores (Gomes et al., 2000; Mardi et al., 2000; Vaknin & Eisikowitch, 2000; Oliveira Júnior et al., 1995), que constataram que a viabilidade de grãos de pólen armazenados em temperatura ambiente pode ser mantida a curto prazo por no máximo 30 dias.

Torna-se evidente que o pólen armazenado em refrigerador apresentou maiores porcentagens de germinação em relação ao pólen armazenado à temperatura ambiente. Estes resultados concordam com vários autores (Gomes et al., 2000; Andrada & Hill, 1999; Mardi et al., 2000; Metz et al., 2000; Siregar & Sweet, 2000; Bomben et al., 1999) que mantiveram o pólen armazenado em refrigerador por vários meses, embora com um decréscimo de viabilidade com o aumento do tempo de armazenamento.

Verifica-se que temperaturas de freezer obtiveram desempenhos superiores à temperatura ambiente e refrigerador. O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Resultados semelhantes foram obtidos por vários autores (Daniel et al., 2002; Bomben et al., 1999; Andrada & Hill, 1999; Alantas et al., 2001; Takatsu et al., 2001; Oliveira et al., 2001; Mardi et al., 2000), que enfatizam a maior longevidade do pólen congelado em algumas culturas.

A maior porcentagem de germinação foi obtida em freezer na presença de dessecador, independentemente da presença de sílica-gel. É interessante ressaltar que de um modo geral a ausência de dessecador proporcionou os piores

resultados. A presença de sílica nestes casos não proporcionou maior longevidade do pólen armazenado.

Por outro lado, a ausência de dessecador, unida à ausência de sílica-gel em temperatura ambiente, apresentou os piores resultados em todas as variedades, sendo que o pólen permaneceu viável por no máximo 2 semanas. O tratamento na ausência de sílica e dessecador em refrigerador também não obteve bons resultados, já que o pólen perdeu sua viabilidade na terceira semana. Nota-se, com isso, que a ausência do dessecante sílica-gel, unida à ausência do dessecador, promoveu uma drástica redução na viabilidade do pólen. Esse fato pode ser atribuído a uma maior absorção de umidade do ar pelo grão de pólen devido à falta do dessecador e também do dessecante.

Em resumo, no que diz respeito à viabilidade do pólen em cada época de armazenamento, nota-se que o pólen armazenado em temperatura ambiente perdeu sua viabilidade muito rapidamente e o pólen armazenado em freezer permaneceu viável por um período maior de tempo, mas ainda assim pode-se verificar que houve uma redução com o tempo de conservação, embora não tenha sido drástica para os tratamentos dentro de dessecadores. Vários autores enfatizam a importância do uso de dessecadores (Arlgren & Arlgren, 1978; Wang, 1975; Honda et al., 2002)

Nos tratamentos em refrigerador e temperatura ambiente, a presença de sílica-gel, independentemente da presença de dessecador, proporcionou melhores resultados. Por outro lado, para os tratamentos em freezer, a presença de sílica-gel proporcionou os piores resultados.

Sousa (1988), estudando pólen de eucalipto, verificou que o pólen sob vácuo e na presença de sílica-gel exibiu a maior porcentagem de germinação para *E. camaldulensis* e a pior germinação para *E. grandis*. De qualquer forma, evidenciou-se a necessidade do uso de sílica-gel no armazenamento, prática que, além de reduzir a taxa respiratória, evita ataque por microrganismos. Além

disso, quando se pretende submeter o pólen à temperatura muito baixa (10°C ou menos), a redução de umidade é necessária para evitar o rompimento dos tecidos, provocado pelo congelamento intracelular da água contida no pólen.

Dependendo da técnica usada para o armazenamento e da variedade envolvida, ainda pode-se obter boa germinação no refrigerador após nove semanas de armazenamento, como é o caso da ‘Valência’ na presença de sílica-gel e fora do dessecador (8,24%).

Oliveira et al. (2001) enfatizam que a diminuição na porcentagem de polens viáveis pode estar relacionada a vários fatores, tais como as condições de armazenamento, o recipiente usado no acondicionamento do pólen e a manipulação dos recipientes. Em vários trabalhos, a viabilidade do pólen armazenado é mantida se os grãos de pólen estiverem secos (Sousa, 1988).

Os resultados demonstraram que apesar de as variedades terem exibido taxas de viabilidade variáveis nos períodos de armazenagem, pode-se considerar que os resultados obtidos para o pólen têm possibilidade de subsidiar programas de melhoramento em citros, viabilizando cruzamentos entre indivíduos com potencial econômico que apresentem barreiras temporais de floração ou estejam geograficamente separados.

6 CONCLUSÕES

O armazenamento em freezer (-10°C) é mais eficiente do que em refrigerador (4°C) no período estudado (9 semanas).

Os tratamentos mantidos em temperatura ambiente não são eficientes. De maneira geral, os melhores resultados são obtidos em freezer com sílica dentro de dessecador e em freezer sem sílica dentro de dessecador, com as menores reduções de viabilidade, para todas as variedades estudadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLGREN, C. E.; AHLGREN, I. F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5 needle species. **Floresty Science**, Washington, v. 24, n. 1, p. 100-102, Mar. 1978.
- ALANTAS, R.; PIRLAK, L.; HIETARANTA, T.; LINNA, M. M.; PALONEN, P.; PARIKKA, P. Storage of strawberry pollen, **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 567, p. 227-230, 2002.
- 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.
- AGRIANUAL 2003: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2003. p. 295-315.
- ASHOKE, B.; SUDHENDU, M.; BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. T. I. Loss of pollen viability of *Cassia siamea* Lamk. following treatment with arsenic. **Journal of Environmental Biology**, Santiniketan, v. 20, n. 1, p. 67-69, 1999.
- BARRETT, H. C. hybridization of *Citrus* and related genera. **Fruits Varieties Journal**, Orlando, v. 39, n. 2, p. 11-16, 1985.
- BEYOUNG, H. K. The effects of calcium on pollen germination. **Proceedings of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 86, p. 818-823, June 1965.
- BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264 p.
- BODEN, R. W. Handling and storage of pollen in *Eucalyptus* breeding. **Australian Forestry**, Camberra, v. 12, n. 1, p. 73-81, 1958.
- BOMBEN, C.; MALOSSINI, C.; CIPRIANI, G.; TESTOLIN, R.; RETAMALES, J. Long term storage of kiwifruit pollen. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 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, Sept. 1963.

BUTT, S. J.; YUSUF, A.; ALI, S.; KHAN, M. A. *In vitro* studies on viability and germination of pollen in various citrus species. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, Rawalpindi, v. 36, n. 10, p. 432-434, Oct. 1993.

CARVALHO, N. M. de. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 23 p. (Circular, 23).

CHICHIRICCO, G.; CAIOLA, M. G. *Crocus sativus* pollen germination and pollen tube growth *in vitro* and after intraspecific and interspecific polination. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 64, n. 11, p. 774-777, Nov. 1986.

COOPER, W. C.; REECE, P. C.; FURR, J. R. *Citrus* breeding in Florida – past, present and future. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Alexandria, v. 75, p. 5-13, June 1962.

CRISTOFANI, M. **Mapas de ligação *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Cv Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza**. 1997. 140 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

DANIEL, I. O.; TAYO, T. O.; TOGUN, A. Wet cold preservation of West African yam (*Dioscorea* spp.) pollen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 138, n. 1, p. 57-62, Feb. 2002.

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.

DONADIO, L. C.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 228 p.

DORMAN, K. W. **The genetics and breeding of southern pines**. Washington: USDA Forest Service, 1976. 407 p.

DUFFIELD, J. W.; SNOW JR., A. G. Pollen longevity of *Pinus strobes* and *Pinus resinosa*, as controlled by humidity and temperature. **American Journal of Botany**, New York, v. 28, n. 2, p. 175-177, Feb. 1941.

EBADI, A.; MAY, P.; SEDGLEY, M.; COOMBE, B. G. Effects of low temperature near flowering time on ovule development and pollen tube growth

in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), cvs Chardonnay and Shiraz. **Journal of Grape and Wine Research**, Melbourne, v. 1, n. 1, p. 11-18, 1995.

EENIK, A. H. Preliminary results of research on storage and *in vitro* germination of lettuce pollen as and aind in lettuce breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 32, n. 2, p. 521-526, June 1983.

FAO. **FAOSTAT**: statistics database. Disponível em: <[Http://apps.fao.org](http://apps.fao.org)>. Acesso em: 6 maio 2003.

FARMER JR., R. E.; HALL, G. C. *In vitro* testing and long term storage of black cherry pollen. In: NORTHEASTERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 22., 1974, Syracuse. **Proceedings....** Syracuse, Upper Darby: USDA/NE, 1974. p. 19-22.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, A.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira** 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 299-264.

FRANKEL, R; GALUN, E. **Pollination mechanism reproduction and plant breeding**. New York: Springer Verlag, 1977. 281 p.

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

GANESHAN, S.; ALEXANDER, M. P. Cryogenic preservation of lemon (*Citrus limon* Burm.) pollen. **Gartenbauwissenschaft**, Bangalore, v. 56, n. 5, p. 228-230, Sept./Oct. 1991.

GMITTER JUNIOR, F. G.; GROSSER, J. M.; MOORE, G. A. citrus. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: CAB International, 1992. cap. 14, p. 335-369. (Biotechnology in Agriculture, 8).

GOMEZ, P.; GRADZIEL, T. M.; ORTEGA, E.; DICENTA, F. Short term storage of almond pollen. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 6, p. 151-152, Oct. 2000.

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

HOEKSTRA, F. A.; WALL, V. D. Desiccation tolerance of *Papaver dubium* L. pollen during its development in the anther. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 3, p. 626-632, Nov. 1988.

HONDA, K.; WATANABE, H.; TSUTSUI, K. Cryopreservation of Delphinium pollen at -30°C. **Euphytica**, Dordrecht, v. 126, n. 3, p. 315-320, 2002.

KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of Rutaceae. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 2, p. 207, Feb. 1991.

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

LEECH, L.; SIMPSON, D. W.; WHITEHOUSE, A. B.; HIETARANTA, T.; LINNA, M. M.; PALONEN, P.; PARIKKA, P. Effect of temperature and relative humidity on pollen germination in four strawberry cultivars. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 1, n. 567, p. 261-263, 2002.

MARDI, M. O.; BAKHEIT, C. S.; KHAROUSI, L.; MANTHERI, O. S. Factors regulating *in vitro* germination of date palm pollen grains after storage. **Journal for Scientific Research Agricultural Sciences**, Oman, v. 5, n. 1, p. 19-23, 2000.

MELHEM, T. S.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Pollen grains of plants of the "Cerrado" V-Leguminosae -Caesolpinodae. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 369-387, dez. 1973.

METZ, C.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 2, p.199-201, Apr. 2000.

MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*). palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, San José, v. 38, n. 1, p. 29-33, June 1990.

MOREIRA, C. S.; RODRIGUES FILHO, A. J. **Cultura dos Citros**. São Paulo: Melhoramento, 1962. 111 p.

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

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v. 15, n. 1, jan./abr. 2001.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; AGUILAR, V. C. J.; NAKASU, B. H. **Manual técnico sobre o cancro cítrico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001a. 24 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular técnica, 27).

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; NAKASU, B. H.; MACHADO, M. A. **Clorose Variegada dos citros (CVC)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001b. 31 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular técnica, 28).

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de. **Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos fisiológicos da germinação de grãos de pólen do pessegueiro diamante (*Prunus persicae* L. Bastch)**. 1999. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; SANÁBIO, D.; SANTOS, S. dos. Influência do armazenamento na germinação de grãos de pólen de pessegueiro cv. Aurora. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 8., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1995. p. 117.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de.; RAMOS, J. D.; SANÁBIO, D.; RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M. Efeito do Cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBF, 1996. p. 419.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R.; PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.

PASQUAL, M.; PETRI, J. L.; MATTOS, C. S. Polinização da macieira III. Cultivares BR-1 e Mollies Delicious. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 10, 1477-1481, out. 1982.

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

PFAHLER, 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, n. 6, p. 839-845, June 1967.

POMPEU JÚNIOR., J. Porta emxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. POMPEU JUNIOR, J.; AMARO A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 281-296.

RAMOS, J. D.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de; FARIA, R. A. M.; VALE, M. R. do. Efeito da temperatura, armazenamento e sílica gel na germinação de grãos de pólen de ameixeira "Januária". CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBF, 1996. p. 49.

RASEIRA, M. do. C. B. Influência da temperatura sobre a germinação do pólen e alongação do tubo polínico em pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 177-180, 1992.

ROSELL, P.; HERRERO, M.; GALAN-SAUICO, V. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *In vivo* characterization and optimization of *in vitro* germination. **Scientia-Horticulturae**, Tenerife, v. 81, n. 3, p. 251-265, Sept. 1999.

RUGGIERO, C.; SANCHEZ, L.; MIGUEL, S. Estudo sobre a fertilidade de grãos de pólen de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., 1975, Rio de Janeiro. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1976. p. 515-519.

SAHAR, N.; SPIEGEL, R. P. Citrus pollen storage. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 1, p. 81-82, Feb. 1980.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world**. Norwich: Sinclair International Limited, 2000. 156 p.

SHIVANNA, K. R.; HESLOP-HARRISON, J. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of flouorochromatic (FCR) test procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 67, n. 4, p. 367-75, 1981.

SILVA, M. M. da. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólen do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. 1996. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SIREGAR, I. Z.; SWEET, G. B. The impact of extraction and storage conditions on the viability of radiata pine pollen. **Silvae Genetica**, Bogor, v. 49, n. 1, p. 10-14, 2000.

SNYDER, E. B.; CLAUSEN, K. E. Pollen handling. In: USDA FOREST SERVICE. **Wood plants in the United States**. Washington, 1974. p. 75-97.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SOUSA, V. A. de. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp.** 1988. 155 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SPARKS, D.; YATES, I. E. Pecan pollen stored over a decade retains viability. **HortScience**, Alexandria, v. 37, n. 1, p. 176-177, Feb. 2002.

SPRAGUE, J. R.; JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14., 1977, Gainesville. **Proceeding...** Macon: Eastern Tree Seed, 1977. p. 20- 27.

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

TAKATSU, Y.; KASUMI, M.; MANABE, T.; HAYASHI, M.; INOUE, E.; MARUBASHI, W.; NIWA, M. Temperature effects on interspecific hybridization between *Gladiolus x grandiflora* and *G. tristis*. **HortScience**, Alexandria, v. 36, n. 2, p. 341-343, Apr. 2001.

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. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 56, p. 227-230, July 1950.

TUINSTR, M. R.; WENDEL, J. Estimation of pollen viability in grain sorghum. **Crop-Science**, Madison, v. 40, n. 4, p. 968-970, July/Aug. 2000.

VAKNIN, Y.; EISIKOWITCH, D. Effects of short-term storage on germinability of pistachio pollen. **Plant Breeding**, Tel Aviv, v. 119, n. 4 p. 347-350, Aug. 2000.

VASILAKAKIS, M.; PORLING, I. C. Effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 4, p. 733-735, Aug. 1985.

VIANELLO, R. L.; ALVES, A. R. **Metereologia básica e aplicações**. Viçosa: UFV, 1991. 449 p.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica organografia**. Viçosa: UFV, 1995. 114 p.

WANG, B. S. P. The seeds and pollen storage for genetic conservation. Possibilities and limitation. In: FAO. **The methodology of conservation of forst genetic resources**. Rome, 1975. p. 93-103.

WORSLEY, R. G. F. The processing of pollen. **Silvae Genética**, Frankfurt, v. 8, n. 5, p. 143-148, 1959.