



PAULYENE VIEIRA NOGUEIRA

**DETERMINAÇÃO DE MEIO DE CULTURA E
APLICAÇÃO DE ÁCIDO BÓRICO EM BOTÕES
FLORAIS NA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE
PÓLEN DE NESPEREIRAS**

LAVRAS - MG

2015

PAULYENE VIEIRA NOGUEIRA

**DETERMINAÇÃO DE MEIO DE CULTURA E APLICAÇÃO DE
ÁCIDO BÓRICO EM BOTÕES FLORAIS NA GERMINAÇÃO DE
GRÃOS DE PÓLEN DE NESPEREIRAS**

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

Orientador

Dr. Rafael Pio

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Nogueira, paulyene vieira.

Germinação de grãos de pólen e aplicação de ácido bórico em
botões florais de nespereiras / Paulyene Vieira Nogueira. – Lavras:
UFLA, 2105.

42 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Rafael Pio.

Bibliografia.

1. *Eriobotrya japonica* Lindl. 2. Melhoramento Genético. 3.
Viabilidade de Pólen. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

PAULYENE VIEIRA NOGUEIRA

**GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN E APLICAÇÃO DE ÁCIDO
BÓRICO EM BOTÕES FLORAIS DE NESPEREIRAS**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dr. Marcelo Polo

UNIFAL

Dra. Leila Aparecida Sales Pio

UFLA

Dr. Rafael Pio

Orientador

LAVRAS - MG

2015

*Dedico este trabalho a Deus,
à família e aos amigos*

AGRADECIMENTOS

Gratidão, em primeiro lugar, a Deus e a Virgem Maria, por serem meu suporte contínuo em todos os momentos, me dando o dom e a graça de continuar na luta todos os dias, para alcançar meus objetivos e realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Paulo e Edilene, pelo exemplo de ser humano que são, pelo que me ensinaram e me ensinam, no silêncio e na distância.

Ao meu irmão Paulo Thiago, pelo incentivo, companheirismo, paciência, carinho e amor, e por ser exemplo de foco, força e fé.

A toda a minha família, em especial minhas afilhadas Gabrielly e Maria Cecília, por trazerem a pureza, a pequenez e, ao mesmo tempo, a grandeza de uma criança em minha vida. Gratidão pequeninas!

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos Departamentos de Biologia e Agricultura, pela oportunidade de cursar o mestrado em Botânica Aplicada, no setor de Fruticultura.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Pio, por, antes mesmo de ser orientador, ser AMIGO. Pelos ensinamentos, pela confiança ao me escolher como sua orientada e me ensinar em tão pouco tempo. Gratidão por sua compreensão, pelo incentivo, pela confiança no meu trabalho e por acreditar junto comigo neste sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada e à nossa amada Secretária Eliana, pelo carinho, respeito, amizade e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura, setor de Fruticultura, Arnaldo, Danilo e Evaldo, pela ajuda na execução das atividades.

À "Família Pomar", por ser meu suporte nas lutas diárias, por me ensinar e me proporcionar tantas coisas boas nestes dois anos. Em especial, pela ajuda na execução e na conclusão deste trabalho.

Aos amigos da Botânica que ingressaram na pós-graduação junto comigo e que também sofreram, amaram e lutaram por esta conquista. Gratidão.

Aos amigos do Brejão, por terem sido parceiros (as) e companheiros (as) nos momentos de descontração e descanso.

À Sinara, por sempre estar perto de mim, mesmo a quilômetros de distância.

Aos meus grandes amigos, Flávio, Maraísa e Daniel e às meninas do Apto 403, que foram suporte em todos os momentos, que foram fiéis na amizade, na cumplicidade, na parceria e, principalmente, no cuidado para comigo. Não tenho palavras para agradecer. Se hoje estou aqui, foi porque tive o incentivo de vocês. Enorme gratidão.

Um agradecimento especial ao João Paulo, meu namorado e amigo, confidente, companheiro, parceiro e incentivador, por toda paciência, amor, dedicação, amizade, respeito e suporte. Muito obrigada, amo muito você.

A todos, minha eterna e constante GRATIDÃO!

RESUMO

Buscando dar suporte aos programas de melhoramento genético, o conhecimento das características florais do germoplasma disponível, tais como a viabilidade e a capacidade germinativa do pólen, é de grande importância para a seleção dos progenitores a serem utilizados nas hibridações. Sendo assim, o trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer meio de cultura e avaliar a germinação de grãos de pólen *in vitro* e a posterior aplicação de boro na panícula em cultivares de nespereira. Para isso, foi determinado o meio de cultura ideal para a germinação dos grãos de pólen e avaliada a porcentagem de germinação, utilizando pólen da cultivar Mizauto. Também se avaliou o melhor estágio de desenvolvimento floral e o horário do dia para coleta do pólen, bem como o tempo de incubação para a germinação dos mesmos. Após estabelecido o meio, foi determinada a germinação de 9 cultivares: Mizauto, Mizuho, Fukuhara, Parmogi, Centenária, Kurisaki, Néctar de Cristal, Mizumo e Precoce de Campinas. Em campo, avaliou-se a aplicação de ácido bórico em panículas de nespereiras 'Mizauto', nas concentrações 600, 1.200 e 1.800 mg.L⁻¹, além do controle sem aplicação. O meio de cultura estabelecido foi de 200 g.L⁻¹ de sacarose, 1.200 mg.L⁻¹ de ácido bórico, solidificado com 10 g.L⁻¹ de ágar e pH 6, incubado por sete horas. O melhor estágio do botão floral foi na pré-antese, coletado entre 14 e 18 horas. A aplicação de 900 mg.L⁻¹ de ácido bórico em campo elevou a germinação dos grãos de pólen para 57,68%.

Palavras-chave: *Eriobotrya japonica* Lindl. Melhoramento Genético. Viabilidade de Pólen.

ABSTRACT

This study aimed to establish a culture media and evaluate pollen grains germination in vitro and after boron applying in the panicles of Loquat cultivars. Was established an appropriate culture media for pollen grains germination and evaluated the germination percentage in Mizauto cultivar. Was also evaluated the best stage of floral growth and the best period of the day to collect the pollen, beyond the evaluation of incubation time for their germination. After established the appropriate culture media, it was determined the germination of 9 cultivars: Mizauto, Mizuho, Fukuhara, Parmogi, Centenária, Kurisaki, Néctar de Cristal, Mizumo and Precoce de Campinas. On the field, was evaluated the applying of boric acid with different concentrations 600, 1200 and 1800 mg.L⁻¹ and without applying on the panicles of Mizauto cultivar. The culture media established was composed by 200 g. L⁻¹ of sucrose, 1200 mg.L⁻¹ of boric acid, solidified with 10 g.L⁻¹ of Agar and pH 6, and incubated during seven hours. The best stage of floral bud was in pre-anthesis, collected between two and six pm. The applying of 900 mg.L⁻¹ of boric acid on field raised the pollen grain germination to 57.68%.

Keywords: *Eriobotrya japonica* Lindl. Breeding Programs. Pollen Viability.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Importância da fruticultura e o cultivo de nêspera	13
2.2	Nespereira	15
2.3	Caracterização botânica aspectos gerais.....	17
2.4	Polinização, fecundação e desenvolvimento do fruto.....	18
2.5	Floração	19
2.6	Grão de pólen e sua importância para o melhoramento genético de plantas.....	19
2.7	Testes de germinação <i>in vitro</i>	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Definição do meio de cultura e análise da germinação.....	25
3.2	Verificação do número de grãos de pólen por antera e por flor	27
3.3	Pulverização das panículas com ácido bórico.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Definição do meio de cultura e análise da germinação.....	30
4.2	Verificação do número de grãos de pólen por antera e por flor	34
4.3	Pulverização das panículas com ácido bórico.....	36
5	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de nêspersas está relacionado, principalmente, ao sabor peculiar dos seus frutos, bem como às suas características nutriterapêuticas. As nêspersas são ricas em ácido galacturônico, málico e fumárico, flavonoides e carotenoides, entre outros compostos antioxidantes, localizados na casca e na polpa dos frutos. Além disso, tem elevada concentração de pectina, que favorece o processamento industrial na fabricação de doces e geleias, atividade ainda não explorada comercialmente.

No Brasil, a nespereira é uma excelente opção de cultivo para a diversificação de propriedades rurais, principalmente na época de maturação de seus frutos, que se concentra entre os meses de julho e setembro, quando há escassez de outras frutas no mercado.

Apesar de a nespereira apresentar algumas vantagens de cultivo em relação a outras frutíferas, a lucratividade ainda é baixa, devido a problemas relacionados ao desempenho produtivo das cultivares. A disponibilização de novas seleções avançadas é primordial para o cultivo em São Paulo, principalmente no que tange aos incrementos produtivos, para, assim, elevar a renda em unidades produtoras dessa frutífera.

Com base no exposto, nota-se a necessidade de investir de maneira intensa no programa de melhoramento genético de nespereira no Brasil, em busca, principalmente, de cultivares altamente produtivas e aptas a serem cultivadas, principalmente em São Paulo, maior produtor nacional.

A análise da fertilidade dos grãos de pólen dos progenitores coletados a campo é condição preliminar indispensável para os cruzamentos. Na natureza, a única maneira de verificar a viabilidade dos grãos de pólen é por meio da realização de cruzamentos a campo e posterior avaliação da frutificação. No entanto, este processo é oneroso e demorado. Uma alternativa mais rápida é a

utilização de testes de germinação *in vitro* dos grãos de pólen, nos quais se pode observar a relação entre a porcentagem de germinação e a viabilidade do pólen.

Sabe-se que vários compostos orgânicos e inorgânicos interferem na germinação *in vitro*, sendo cálcio e boro os mais importantes. Verifica-se, em outros trabalhos, que o ácido bórico é fundamental na germinação dos grãos de pólen de outras espécies e que a aplicação de boro no período de floração aumentou a fixação e a produção dos frutos. Assim, caso o ácido bórico influencie a germinação de grãos de pólen *in vitro* da nespereira, a aplicação desse elemento nas panículas pode aumentar o número de sementes e a fixação de frutos, influenciando o aumento da massa unitária e o aumento da produção das nespereiras.

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de ajustar os componentes básicos do meio de cultura para verificar a capacidade germinativa dos grãos de pólen de cultivares de nespereira, quantificar o número de grãos de pólen por antera e por flor e, ainda, verificar a influência da pulverização de boro nas panículas sobre a germinação de grãos de pólen.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da fruticultura e o cultivo de nêspera

A produção mundial de frutas frescas tem apresentado crescimento contínuo, mas com volumes estáveis, nos últimos anos. A colheita foi calculada em 822,301 milhões de toneladas, em 2012, com incremento de 9,509 milhões de toneladas sobre o montante do ano anterior. Os dados são da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Também a área cultivada de 2012 foi ampliada em 1,088 milhão de hectares, passando de 71,977 milhões de hectares para 73,066 milhões de hectares. Os cultivos abrangem grande variedade de espécies, com o predomínio das frutíferas de clima temperado, as quais, por questão geográfica, são mais produzidas e consumidas, principalmente no hemisfério norte. As frutas tropicais e subtropicais, embora tenham elevado potencial de consumo, ainda se ressentem de maior distribuição.

Entre os países produtores, China, Índia e Brasil, juntos, colheram 357,761 milhões de toneladas de frutas frescas, em 2012, o que equivale a mais de 40% do total mundial. Quase toda a produção dos três países é destinada ao consumo interno. Chile e Peru são os países que se destacam como exportadores, pois produzem além da demanda interna. Na lista da FAO, o Brasil ocupa a terceira colocação do ranking da produção mundial de frutas, com resultado estipulado em 43,912 milhões de toneladas, em 2012. Acima disso estão a China, com desempenho gigantesco, de 224,816 milhões de toneladas e a Índia, com 83,032 milhões de toneladas.

Entre as frutas mais produzidas do mundo estão a banana e a melancia. Por enquanto, a banana tem se mantido como a principal, com 106,541 milhões de toneladas, em 2011, conforme números da FAO. Já a produção de melancia chegou a 104,472 milhões de toneladas naquele mesmo ano. Volumes

significativos igualmente foram ofertados nas colheitas mundiais de maçã (75,635 milhões de toneladas), uva (69,654 milhões de toneladas) e laranja (69,605 milhões de toneladas) (ANUÁRIO..., 2014).

A fruticultura participa diretamente da economia do país, por meio do valor das exportações e do mercado interno, podendo-se salientar, ainda, a importância no aspecto econômico-social, uma vez que está presente em todos os estados brasileiros. É responsável pela geração de 5,6 milhões de empregos diretos, o equivalente a 27% do total da mão de obra agrícola do país (FACHINELLO et al., 2011).

Grande parte da produção brasileira de frutas frescas continua sendo consumida pelo mercado interno. O mesmo cenário é verificado nos demais países produtores de frutas do mundo, que igualmente destinam suas safras para abastecer a população local. Os últimos dados são os da colheita de 2012, que chegou a 42,416 milhões de toneladas de frutas frescas. Deste total, cerca de 53% ficaram no mercado de frutas frescas e o restante (47%) seguiu para a indústria de processamento (ANUÁRIO..., 2014).

Estima-se que a produção mundial de nêspera é de, aproximadamente, 200.000 toneladas, destacando-se a China, os países mediterrâneos (Espanha, Argélia, Turquia, Israel e Itália), Japão e Brasil, como produtores potenciais da fruta. Na Índia se cultiva em proporções menores e, em escala ainda mais restrita, cultiva-se no Chile, nos Estados Unidos e em Portugal (fenologia de nêspera). A China é o principal produtor mundial, com produção estimada de 102.000 t, Japão e Brasil com 18 t (LLACER et al., 1995 citados por GRASSI, 2008).

Pode-se afirmar que o Brasil tem potencial para aumentar a demanda de frutas frescas, uma vez que a população ainda não consome a quantidade ideal, a fim de garantir boa alimentação. "Nos países desenvolvidos, o consumo supera a média de 100 quilos de frutas por habitante ao ano", destaca o gerente do Ibraf.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a ingestão diária de, pelo menos, 400 g de frutas e hortaliças, o equivalente a cinco porções desses alimentos (BUENO, 2005).

2.2 Nespereira

A nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl.) é um fruto tipo pomo originário da China, sendo amplamente distribuído para as áreas temperadas de outros países e cultivado para fins comerciais desde o século XIX. Atualmente, os principais produtores de nêspera são China e Espanha, que chegam a produzir, respectivamente, 200.00 e 41.487 toneladas. No Brasil, a nêspera é conhecida também como ameixa-amarela e tem uma produção ainda muito pequena, se comparada com os principais produtores (CABALLERO; FERNANDEZ, 2003).

Podemos considerar que o Brasil tem capacidade potencial para a produção de nêspera, pois a produção anual do fruto no país é de 2.400 toneladas, sendo o mercado muito restrito, tendo em vista que quase a metade é comercializada apenas no estado de São Paulo (CABALLERO; FERNÁNDEZ, 2003).

A nespereira foi introduzida no Brasil por imigrantes japoneses e seu cultivo comercial teve início na década de 1940. Ao longo do tempo, seu cultivo se firmou no estado de São Paulo, servindo como fonte de renda complementar aos produtores de caqui (PEROSA; VIEIRA; NITZCHE, 2006). Além disso, a cultura da nespereira não necessita de utilização sistemática de defensivos, o que a torna atraente como alternativa para uma produção intensiva e mais natural dos frutos (OJIMA et al., 1999).

Atualmente, São Paulo é considerado o maior produtor nacional da frutífera. Sua exploração econômica iniciou-se no estado na década de 1940, aumentando o interesse entre os fruticultores para esta cultura, chegando a cerca

de 200 mil plantas em 1985, principalmente nas regiões produtoras de Mogi das Cruzes e Atibaia. Segundo dados fornecidos pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA), entre os anos de 2000 e 2004, houve um aumento significativo de novas plantas no estado de São Paulo, destacando-se os municípios de Botucatu, Itapetininga, Sorocaba e Mogi das Cruzes, sendo este último o responsável pela produção de 2 milhões de caixas/ano (caixa de 5 kg), do total de 3.700.000 caixas produzidas naquele estado (PIO et al., 2006).

Na cadeia produtiva de frutos de clima temperado paulista, a nespereira é a oitava frutífera mais plantada, sendo encontrada em 27 municípios, com 147 mil plantas cultivadas em 381 ha (BARBOSA et al., 2003).

Nos últimos anos, constataram-se uma sensível redução de nêspers no mercado e a conseqüente diminuição na demanda do produto, como redução de forte retração da cultura nas regiões tradicionais. Esse fato traz grande perspectiva positiva para a cultura, e torna o momento oportuno para a retomada da atividade.

Citam-se algumas razões para este otimismo na retomada da produção da frutífera, dentre elas:

- a) sua produção é nacional, descartando a necessidade de importação da frutífera. Além disso, é uma frutífera com alto potencial de exportação;
- b) as novas culturas têm sido implantadas em zonas novas, de clima subtropical, onde as condições agrícolas são muito propícias à expansão da atividade;
- c) a colheita de nêspers normalmente coincide com a entressafra de outras frutas de mesa (pêssego, ameixa, caqui e goiaba), permitindo ao fruticultor manter a sua renda durante todo o ano;
- d) a nêspers pode ser consumida ao natural e na produção de compota, atividade ainda pouco explorada. Esta atividade industrial da

frutífera vislumbra uma atividade mais lucrativa, podendo servir como incentivo à expansão da cultura;

- e) a produção conta com novas tecnologias para se adaptar às diferentes condições agrícolas e edafoclimáticas, e verificando-se um potencial grande para o melhoramento desta frutífera.

2.3 Caracterização botânica aspectos gerais

A nespereira (*Eriobotrya japonica* Lindl.) é uma árvore perenifólia da família Rosaceae, subfamília Pomoideas, gênero japônica, com copa arredondada, tronco curto, ramos aveludados e sistema radicular raso se estendendo por, aproximadamente, 25-30 cm de profundidade (RODRIGUEZ, 1983). Produz uma fruta pequena, de cor amarelada, rica em vitamina C e sais mineiras, como cálcio e fósforo. As folhas de nêspira, geralmente, são elípticas lanceoladas, verde-escuras e lustrosas na face superior, e brancas ou enferrujadas com pilosidade na face inferior; as nervuras são grossas e duras, com veias paralelas, oblíquas conspícuas, com tamanhos que variam entre 18 e 40 cm de comprimento. As flores são pequenas, brancas, docemente fragrantas e, antes de se abrirem, têm uma textura enferrujado-aveludada (LORENZZI et al., 2006).

Tem origem no sudoeste da China, no entanto, foi introduzida no Japão e logo naturalizada, onde é cultivada há mais de 1.000 anos (MARTINEZ-CALVO; BADENES; LLÁCER, 2000).

A nespereira é uma espécie subtropical, desenvolvendo-se bem em regiões onde a temperatura média anual fica acima de 15 °C. Contudo, não podem ser sujeitas a temperaturas inferiores a -3 °C, pois valores inferiores causam danos nos frutos ("chilling").

O período de safra da nêspira é extenso, normalmente de abril a outubro, uma vez que seu florescimento ocorre em etapas, favorecendo, assim, a

diminuição dos efeitos de intempéries, como geadas fortes, secas prolongadas e granizo, que prejudicam muitas culturas (PIO et al., 2015).

Suas principais cultivares no Brasil são ‘Mizuho’, ‘Fukuhara’ e ‘Precoce de Campinas’. Também foram relatados cultivos de ‘Centenária’, ‘Mizumo’, ‘Mizauto’, ‘Parmogi’ e ‘Néctar de Cristal’, porém, em menor quantidade (OJIMA et al., 1999).

2.4 Polinização, fecundação e desenvolvimento do fruto

Polinização pode ser caracterizada pela 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, denominando-se autopolinização e polinização cruzada, respectivamente (LEITE; SOUZA, 2003). Estes grãos de pólen são constituídos de duas células haploides, sendo uma delas vegetativa e responsável pela formação do tubo polínico e a outra célula generativa que passa por mitose formando as células espermáticas, das quais uma fecundará a oosfera que, posteriormente, dará origem ao embrião.

No mundo, estima-se que mais de 75% das espécies vegetais utilizadas na agricultura sejam dependentes de animais para a polinização (ALVES et al., 2010).

2.5 Floração

A nespereira apresenta flores em panículas de forma piramidal, composta por 5 a 10 ráculos primários de consistência não lenhosa que, por sua vez, são formados por um número variável de flores e outros ráculos secundários, agrupando cerca de 70 a 100 flores no total (CAMPOS, 2009).

Suas flores são hermafroditas, pubescente, de pequenas dimensões (12-20 mm), com aroma peculiar devido à presença de nectários em seu interior, produzindo secreções açucaradas, que atraem os insetos. O cálice persistente é formado por cinco sépalas soldadas de cor castanha e a corola é formada por cinco pétalas brancas livres. Tem cerca de 20 a 40 estames livres e 5 estigmas unidos basalmente a um ovário ínfero com cinco carpelos, cada um com dois óvulos (CAMPOS, 2009).

Em regiões de clima subtropical verifica-se a existência de diferenças entre as cultivares em relação à sua fenologia e produção. As cultivares são agrupadas em cinco cultivares. O primeiro grupo, mais precoce, foi formado pelas cultivares Mizuho e Mizumo, com ciclo médio de 195 dias, contados a partir do início do desenvolvimento das gemas até a colheita dos frutos. As cultivares néctar de cristal e centenária formaram um segundo grupo, apresentando um ciclo intermediário com média de 203 dias. Já a cultivar Mizauto foi a mais tardia, uma vez que seu ciclo foi concluído com 208 dias, em média, após o início do desenvolvimento das gemas (GRASSI, 2008).

2.6 Grão de pólen e sua importância para o melhoramento genético de plantas

O grão de pólen é uma estrutura microscópica de coloração amarelada que apresenta número haploide de cromossomos e dará origem ao gameta

masculino. É formado nas anteras, em estruturas chamadas sacos polínicos que contêm as "células-mãe" dos grãos de pólen; cada uma sofre meiose e origina quatro micrósporos, que sofrerão modificações morfológicas, transformando-se em grão de pólen adulto. O núcleo do pólen sofre mitose, resultando em dois núcleos, um reprodutivo e outro vegetativo. O núcleo reprodutivo originará dois microgametas e o vegetativo formará o tubo polínico (VIDAL; VIDAL, 1995).

O período de formação do tubo polínico é controlado por substâncias naturais de crescimento, as quais incluem tanto promotores quanto inibidores (CARVALHO, 1983). A emissão do tubo polínico é estimulada por meio 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).

A hibridação controlada no campo e a posterior avaliação das progênes é a técnica mais utilizada na obtenção de novas cultivares. A análise da fertilidade dos grãos de pólen dos progenitores coletados no campo ou armazenados é indispensável antes de iniciar os cruzamentos, uma vez que o período anual de floração das plantas em estudo pode ser curto e, caso os pólenes não estejam viáveis, pode inviabilizar os cruzamentos (CHAGAS et al., 2010).

As técnicas para testar a fertilidade dos grãos de pólen são de fundamental importância para os trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genéticos de várias espécies, permitindo um maior sucesso nos cruzamentos, que são realizados com a finalidade de obter novos híbridos e/ou aumentar a variabilidade (NUNES et al., 2001).

Testes de viabilidade polínica são estudos aplicados no melhoramento genético de plantas por meio de uma ciência denominada palinologia, ou seja, ciência que estuda os grãos de pólen e esporos (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999). A viabilidade polínica pode ser verificada por meio da emissão, alongamento e

formação do tubo polínico *in vitro*, auxiliando, assim, os programas de melhoramento genético (SILVA, 1996).

A composição do meio de cultura, o estado de maturação fisiológica do grão de pólen, sua origem, as características genéticas e os agentes ambientais, como umidade e temperatura, são alguns dos fatores primordiais para os testes de fertilidade do grão de pólen (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999).

Fatores ambientais também podem interferir na viabilidade polínica. Quando a abertura da antera coincide com elevada umidade do ar, a alta pressão osmótica do conteúdo celular do grão de pólen, aliada à baixa resistência de sua parede, diminui a viabilidade polínica (SOUSA, 1994).

2.7 Testes de germinação *in vitro*

Em programas de melhoramento genético de frutíferas, os testes de germinação de grão de pólen *in vitro* são técnicas imprescindíveis, 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 estudadas (PIO et al., 2004).

São utilizados três métodos para avaliar a fertilidade do pólen *in vitro* (HARRISON et al., 1970 citados por ZAMBOM, 2014):

- I. procedimento fluorocromático (FCR);
- II. testes de conteúdo celular com corantes;
- III. germinação de pólen em meio artificial.

I) Procedimento fluorocromático (FCR)

Esse teste contém metodologia que faz a correlação entre a integridade da membrana e o crescimento do tubo polínico dos grãos de pólen, por meio de técnicas de microscopia de fluorescência.

Com esta técnica, os grãos de pólen que não são completamente fluorescentes são considerados inviáveis, por apresentarem algum tipo de problema em sua estrutura, enquanto os grãos de pólen que ficam completamente fluorescentes são metodologicamente considerados aptos à germinação, sendo, então, viáveis (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

II) Testes de conteúdo celular com corantes

O teste por corantes apresenta atividade enzimática da desidrogenase durante o processo respiratório dos tecidos, estando esse tipo de atividade enzimática no grão de pólen relacionado com a sua capacidade de germinação. O corante, então, reage com o hidrogênio produzido na respiração celular do pólen, fazendo o grão de pólen adquirir uma coloração diferenciada (HUANG et al., 2004).

III) Germinação em meio artificial

Esta metodologia tem sido muito atrativa, entre os pesquisadores, uma vez que oferece facilidade para a incorporação de açúcar ou outros estimulantes à germinação do pólen, além de proporcionar umidade relativa constante. Outra vantagem também é a preparação de quantidades que podem ser estocadas. 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 do grão de pólen. Os componentes são constituídos, basicamente, por carboidratos e elementos estimulantes (BARBOSA et al., 1991; NUNES et al., 2001; PIO, 2003).

Segundo Miranda e Clement (1990), para a germinação de grãos de pólen, os principais componentes do meio de cultura têm sido diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.

O carboidrato utilizado, no caso a sacarose, no meio de cultura, proporciona o equilíbrio osmótico entre o grão de pólen e o meio de germinação, fornecendo energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). A sua adição como fonte de energia visa suprir as necessidades metabólicas dos explantes, gerando a energia ou a formação de esqueletos carbônicos para os processos biossintéticos implicados na diferenciação celular. A maior porcentagem de germinação com elevação da concentração de sacarose pode ocorrer devido à maior disponibilidade de energia na forma de carboidrato (CHAGAS et al., 2010).

Segundo Askin et al. (1990 citados por CHAGAS et al., 2010), o boro, na presença de sacarose, forma o complexo ionizável sacarose-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares, facilitando o desenvolvimento *in vitro*.

O emprego de cálcio e boro é importante para promover a germinação e o alongamento do tubo polínico (KWACK; BREWBAKER, 1963; SAHAR; SPIEGEL, 1980).

O ágar solidifica o meio de cultura e facilita o depósito dos grãos de pólen no meio. As concentrações e o tipo de frutífera a ser estudado propiciam uma variação na germinação do grão de pólen. Algumas espécies podem germinar melhor em meio com maior concentração de ágar (FREITAS et al., 2006), enquanto outras necessitam de quantidades menores (CHAGAS et al., 2006).

O pH do meio de cultura também é um fator importante, pois pode influenciar a disponibilidade de nutrientes e de fitorreguladores, bem como interferir no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002).

Segundo Pierik (1987 citado por CHAGAS et al., 2009), o pH que proporciona um crescimento adequado da maioria das espécies situa-se na faixa de 5 a 6,5. Valores acima destes podem ocasionar uma paralisação do

crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE, 1974 citado por CHAGAS et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado entre os meses de janeiro a maio de 2014, e foi dividido em três etapas:

- a) definição do meio de cultura e análise da germinação;
- b) verificação do número de grãos de pólen por antera e por flor;
- c) pulverização das panículas com ácido bórico.

3.1 Definição do meio de cultura e análise da germinação

Primeiramente, fez-se a determinação do meio de cultura básico para a otimização da germinação dos grãos de pólen da nespereira. Utilizando-se uma pinça, foram retiradas, no final da tarde, as anteras de 10 botões florais da cultivar Mizauto. As anteras foram armazenadas em placas de Petri destampadas, à temperatura controlada (27 °C), por 12 horas, na ausência de luz, para que ocorressem a antese, a completa deiscência e a liberação dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008).

Após a coleta dos grãos de pólen, foram realizadas as seguintes etapas do experimento:

- 1) concentrações de ágar (4, 6, 8 e 10 g. L⁻¹) e pH do meio (4, 5, 6 e 7);
- 2) concentrações de sacarose (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 g. L⁻¹);
- 3) concentrações de nitrato de cálcio - Ca(NO₃)₂ (0, 200, 400 e 800 mg. L⁻¹);
- 4) concentrações de ácido bórico - H₃BO₃ (0, 400, 800 e 1200 mg L⁻¹);
- 5) tempo de emissão do tubo polínico (germinação): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após inoculação.

A determinação do meio de cultura foi realizada de maneira sequencial (etapas 1 a 5), sempre utilizando o melhor resultado do experimento anterior para a montagem dos tratamentos subsequentes, conforme Figueiredo et al. (2013).

Após determinar o melhor meio de cultura e o tempo de incubação para a germinação do pólen (emissão do tubo polínico), foram determinados o estágio de coleta do pólen e a hora de coleta.

- 1) Estágio de desenvolvimento floral para a coleta das anteras: botão totalmente fechado, pré-antese (botão ainda fechado e com as pétalas evidentes) e antese (flor completamente aberta).
- 2) Horário de coleta dos botões: botões florais coletados às 6, 10, 14 e 18 horas.

O meio foi incubado em laboratório, sob condições controladas (temperatura média de 27 °C), de acordo com metodologia descrita em Chagas et al. (2010) e Figueiredo et al. (2013). Para cada teste, o pólen foi distribuído, por intermédio de um pincel, sobre a superfície das placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura, de modo a promover uma distribuição homogênea. Após, aproximadamente, 6 horas de incubação, com exceção do experimento de diferentes períodos de emissão do tubo polínico, foram contados, com o auxílio de lupa monocular com objetiva de 10×, os grãos de pólen germinados ou não. Foram considerados germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico ultrapassou o dobro do próprio diâmetro (FIGUEIREDO et al., 2013).

Estes experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri, constituída pela média de oito campos de visão.

Após o estabelecimento do meio de cultura básico para a germinação do pólen da nespereira e a determinação do tempo de emissão do tubo polínico, o

estágio de desenvolvimento floral para a coleta das anteras e o horário de coleta dos botões, os grãos de pólen de nove cultivares de nespereira foram submetidos à germinação *in vitro*, para avaliação de sua capacidade de germinação. As cultivares utilizadas foram Mizauto, Mizuho, Fukuhara, Parmogi, Centenária, Kurisaki, Néctar de Cristal, Mizumo e Precoce de Campinas. Os botões florais foram coletados na coleção de nespereira do Núcleo de Produção de Mudas de São Bento do Sapucaí, SP, da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) e o experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras.

Esse experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, composto por nove tratamentos, representados pelas cultivares de nespereira, com quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição constituída pela média de oito campos de visão.

3.2 Verificação do número de grãos de pólen por antera e por flor

Para o experimento de contagem do número de grãos de pólen por antera e por flor, foram coletados seis botões florais no estágio pré-antese de cada cultivar, sendo contado o número de anteras por flor. Em seguida, separaram-se cinco anteras de forma aleatória e cada conjunto de anteras foi armazenado em tubos Eppendorf destampados, à temperatura controlada (27 °C), por 24 horas, na ausência de luz, para que ocorresse a deiscência e, assim, a liberação dos grãos de pólen (RAMOS et al., 2008). Passadas 24 horas, foi acrescentada 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, com o auxílio de microscópio óptico (objetiva de 100x). Esse experimento foi conduzido com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por oito 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 μ l) e dividindo-se este valor pelo produto entre o volume de ácido láctico da amostra (10 μ l) 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.

3.3 Pulverização das panículas com ácido bórico

Para o experimento em campo com ácido bórico foram selecionadas e identificadas panículas em estágio inicial de desenvolvimento dos botões florais. O experimento consistiu na aplicação de quatro concentrações de ácido bórico diretamente nas panículas: 600, 1.200 e 1.800 mg. L⁻¹, além do controle sem aplicação. Após o completo desenvolvimento dos botões florais foi avaliada a viabilidade polínica dos grãos de pólen oriundos das panículas pulverizadas com as diferentes concentrações de ácido bórico. Os botões florais foram removidos no estágio pré-antese, entre 14h00 e 18h00. O pólen foi distribuído, por intermédio de um pincel, sobre a superfície das placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura previamente estabelecido. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição um quadrante da placa de Petri e cada repetição constituída pela média de oito campos de visão.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias quantitativas submetidas à regressão linear ou quadrática, a 5% de probabilidade, e as médias qualitativas avaliadas pelo teste de comparação de médias Scott & Knott. As análises foram realizadas pelo Programa

Computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Definição do meio de cultura e análise da germinação

Para o estabelecimento de um protocolo adequado de meio de cultura para a germinação dos grãos de pólen, observou-se que o pH interferiu na germinação. Em pH 5, obtiveram-se apenas 4,64% de germinação em meio solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar (Figura 1A). Ramos et al. (2008) afirmam que ocorre aumento na germinação de grãos de pólen, em citros, com o aumento do pH no meio de cultivo.

Quando se corrigiu o pH para 6, houve aumento linear da porcentagem de germinação à medida que se aumentou a concentração de ágar, chegando a obter 17,88% de germinação com a adição de 10 g. L⁻¹ de ágar. Uma possível explicação para que a porcentagem de germinação mais alta tenha ocorrido na concentração de 10 g.L⁻¹ de ágar é que a alta concentração desse agente solidificante proporcionou maior consistência do meio de cultura, o que promoveu o equilíbrio do potencial osmótico do meio e, assim, favoreceu a germinação dos grãos de pólen. É importante, para o meio de cultura, que o pH seja aferido adequadamente, pois influencia diretamente a solidificação do meio (CHAGAS et al., 2009).

Com relação à adição de sacarose ao meio de cultura, ocorreu aumento linear à medida que se aumentou a concentração ao meio básico, chegando a serem registrados 46,6% de germinação, com a concentração de 200 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1B). O aumento linear na porcentagem de germinação dos grãos de pólen à medida que se elevou a concentração de sacarose também foi constatado por Chagas et al. (2010), em trabalhos realizados com pereira (*Pyrus* spp.) e por Figueiredo et al. (2013), com amoreira-preta (*Rubus* spp.). Segundo estes autores, o efeito da adição de sacarose na germinação de grãos de pólen

deve estar relacionado ao fornecimento de energia metabólica e à disponibilidade de esqueletos carbônicos para a biossíntese de compostos orgânicos necessários para o crescimento das células.

O mesmo não foi observado com a adição de nitrato de cálcio ao meio, ocorrendo decréscimo linear da germinação à medida que se aumentou a concentração de nitrato de cálcio (Figura 1C), concordando com os resultados obtidos por Figueiredo et al. (2013). Porém, o ácido bórico foi fundamental para o estímulo da germinação dos grãos de pólen, tendo sido obtidos 55,15% de germinação com a concentração de 1.200 mg. L⁻¹ de ácido bórico (Figura 1D), incremento de 15,74% em relação à ausência desse elemento ao meio de cultura. O boro na presença de sacarose forma o complexo ionizável sacarose-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares, facilitando o crescimento *in vitro*. A adição de boro também foi benéfica na germinação dos grãos de pólen de pereira (CHAGAS et al., 2010) e de amoreira-preta (FIGUEIREDO et al., 2013). Os resultados demonstram que apenas a presença do boro foi satisfatória para a germinação de grãos pólen. De acordo com Frazon e Raseira (2006), o boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade de o pólen se romper.

A germinação dos grãos de pólen teve início após uma hora da inoculação no meio, concordando com os resultados obtidos, em pereira, por Chagas et al. (2010). Houve aumento na porcentagem de grãos de pólen que emitiram tubo polínico até 7 horas pós-inoculação (40,63% de germinação) (Figura 1E). No entanto, após 5 horas pós-inoculação, pode-se observar uma elevada e constante capacidade germinativa dos grãos de pólen. Segundo Gaaliche et al. (2013) e Zambon et al. (2014), há aumento na porcentagem de germinação dos grãos de pólen no decorrer do tempo de incubação.

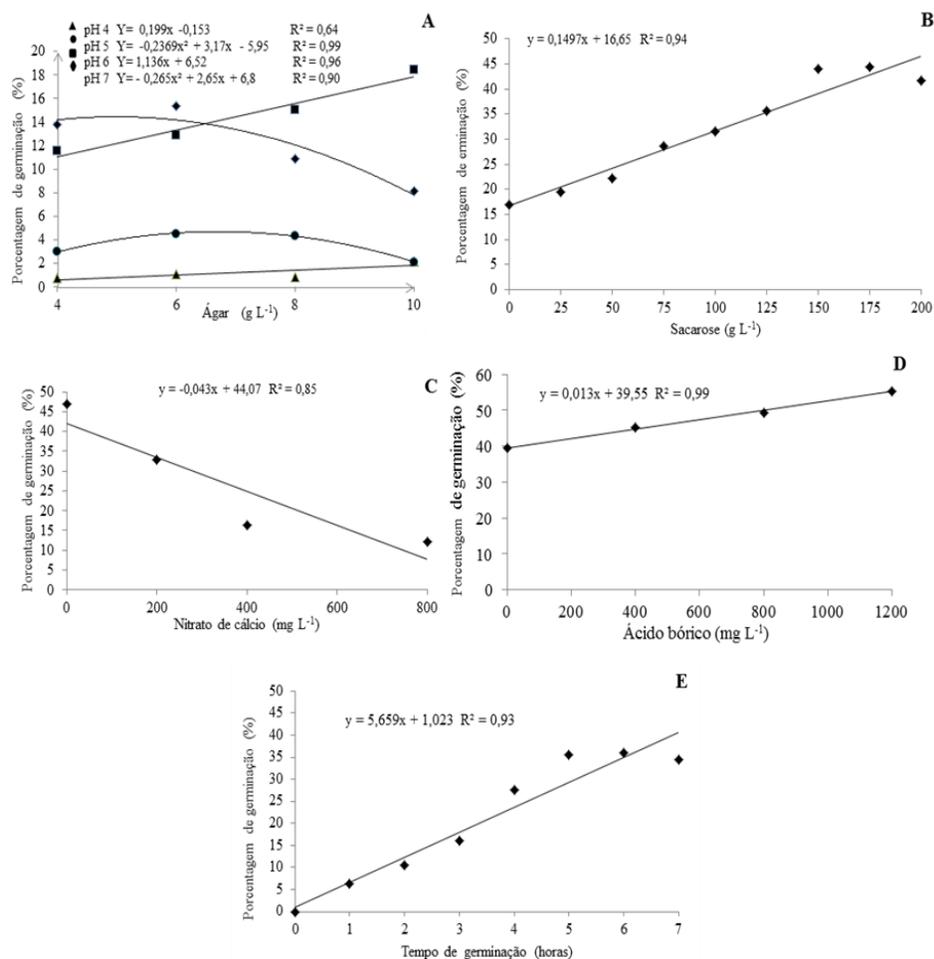


Figura 1 Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen da nespereira 'Mizauto' submetidos a diferentes pH e concentrações de ágar (g L^{-1}) no meio de cultura (A), diferentes concentrações de sacarose (g L^{-1}) (B), diferentes concentrações de nitrato de cálcio (mg L^{-1}) (C), diferentes concentrações de ácido bórico (mg L^{-1}) (D) e diferentes tempos de incubação para a germinação do grão de pólen (E)

Quanto ao estágio de desenvolvimento floral para coleta das anteras, não houve diferença entre a germinação dos grãos de pólen oriundos de botões nos estágios pré-antese e antese, que se sobressaíram em relação à germinação dos grãos de pólen coletados de botões totalmente fechados (Figura 2A). Recomenda-se coletar botões na fase de pré-antese, para se evitar contaminação varietal devido à presença dos agentes polinizadores. Quanto ao horário de coleta dos botões, quando eles foram extraídos das plantas entre às 14 e às 18 horas, houve maior germinação dos grãos de pólen (Figura 2B). Segundo Bonaventure (1999), a melhor germinação de grãos de pólen está associada, principalmente, à umidade relativa do ar e à temperatura, e a melhor germinação de grãos de pólen de muitas espécies, normalmente, ocorre nas primeiras horas da manhã. Contudo, variações podem advir conforme o grau de tolerância à dessecação do grão de pólen. Segundo Oliveira et al. (2012), o ambiente também influencia o horário de maior intensidade de voos das abelhas, com maior intensidade nas horas mais quentes do inverno e da primavera.

Franchi et al. (2011) classificaram como ortodoxos grãos de pólen com maior capacidade de resistência ao ambiente, como os verificados em nespereira. Dessa forma, os grãos de pólen da espécie podem apresentar maior viabilidade nesse período, atuando como estratégia ecológica da espécie.

Com relação aos botões florais coletados na fase da pré-antese, entre às 14 e às 18 horas do dia, para os quais grãos de pólen foram colocados para germinar no meio de cultura acrescido de 200 g. L⁻¹ de sacarose e 1.200 mg. L⁻¹ de ácido bórico, com pH corrigido para 6 e meio solidificado com 10 g. L⁻¹ de ágar, observou-se diferença na germinação entre as cultivares de nespereira estudadas. A maior porcentagem de germinação foi observada com a cultivar Mizauto (51,74%), seguida das cultivares Mizuho, Parmogi, Centenária e Kurisaki (Tabela 1). As demais cultivares apresentaram menor germinação dos

grãos de pólen. Sharafi, Motallebbi-Aza e Bahmani (2011) também verificaram diferença na capacidade de germinação entre cultivares de nespereira.

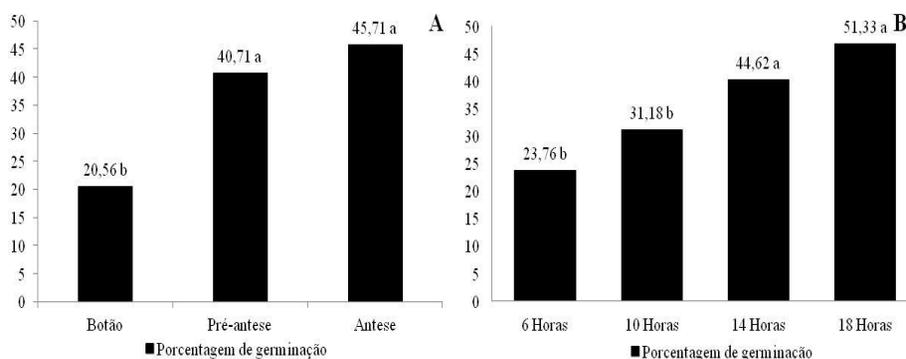


Figura 2 Estágio de desenvolvimento floral para coleta dos grãos de pólen (A) e horário de coleta dos botões para a germinação do grão de pólen (B) da nespereira 'Mizauto'

4.2 Verificação do número de grãos de pólen por antera e por flor

Não houve diferença entre o número de anteras por flor entre as cultivares (Tabela 1). Em outros trabalhos com frutíferas da família Rosaceae foi demonstrado que o número de estames por flor pode apresentar variação entre diferentes cultivares. Contudo, um maior número de anteras não é indicativo de uma maior quantidade de pólen por flor (ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2010). No presente trabalho, o número de pólen por antera variou significativamente entre as cultivares, tendo a cultivar Mizauto apresentado maior valor (Tabela 1), mas o menor número de anteras, apesar de não ter ocorrido diferença estatística entre as demais cultivares. As cultivares Mizauto, Centenária e Mizumo apresentaram o maior número médio de pólen por flor e a Mizuho, a menor média em relação à cultivar Centenária (Tabela 1).

Segundo Gaaliche, Trad e Mars (2011), o número de grãos de pólen por antera e por flor pode influenciar o aumento da produção.

Tabela 1 Porcentagem de germinação média, número de anteras por flor, número de grãos de pólen por antera e por flor, em diferentes cultivares de nespereira

Cultivares	Porcentagem de germinação (%) ⁽¹⁾	Número médio de anteras por flor	Número médio de pólen por antera	Número médio de pólen por flor
Mizauto	51,74 a	18,67 ^{ns}	1.448,00 a	27.228,00 a
Mizuho	43,38 b	20,67	1.058,33 c	22.024,34 c
Fukuhara	25,19 c	20,33	943,00 d	19.055,00 d
Parmogi	41,51 b	20,67	933,00 d	19.040,00 d
Centenária	37,98 b	22,00	1.273,00 b	27.504,00 a
Kurisasi	39,19 b	20,83	1.121,00 c	23.094,00 b
Néctar de Cristal	29,51 c	21,17	1.143,34 c	23.781,34 b
Mizumo	23,71 c	21,00	1.255,34 b	26.480,00 a
Precoce de Campinas	18,55 c	20,33	884,00 d	18.020,00 d
C.V. (%)	22,71	4,88	12,41	11,06

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($P \leq 0,05$). ns – não significativo

4.3 Pulverização das panículas com ácido bórico

Devido ao fato de o elemento boro ter promovido melhorias na germinação dos grãos de pólen, conforme apresentado na Figura 1D, aplicaram-se as diferentes concentrações de ácido bórico nas panículas. Pelo desdobramento da equação de segundo grau, a concentração de 900 mg. L⁻¹ de ácido bórico aplicado, quando os botões estavam no estágio inicial do desenvolvimento, propiciou 57,68% de germinação dos grãos de pólen (Figura 3), acréscimo de 24,3% em relação a não pulverização com ácido bórico. Segundo Nava et al. (2009), a aplicação de boro no período de floração aumentou a fixação e a produção dos frutos de pessegueiro.

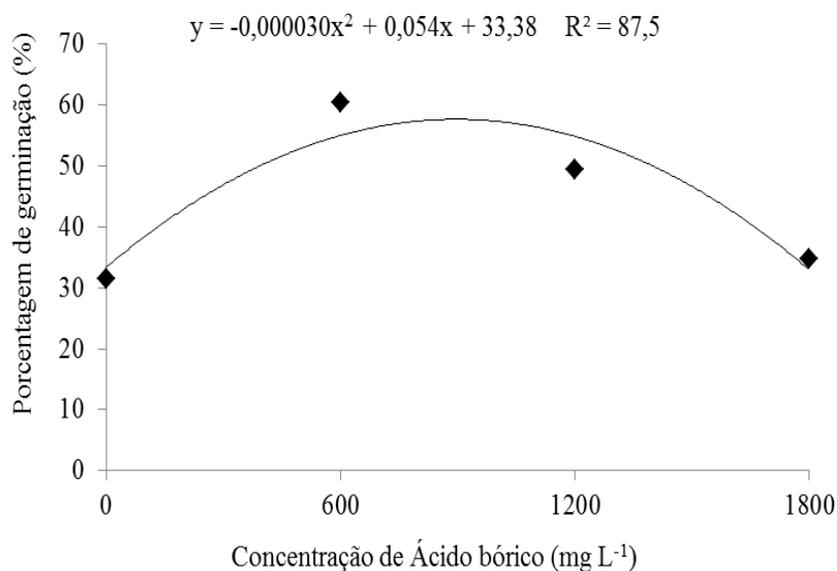


Figura 3 Porcentagem de germinação de grãos de pólen da nespereira 'Mizauto' em cachos florais (panículas) pulverizados com diferentes concentrações de ácido bórico.

Esse aumento da germinação dos grãos de pólen pode ser significativo no aumento da fixação dos frutos e também no aumento da massa unitária dos mesmos, o que poderá elevar os índices produtivos das nespereiras brasileiras (BETTIOL NETO et al., 2010; PIO et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

- a) O meio de cultura ideal para a germinação de grãos de pólen de nespereira é constituído de 200 g.L^{-1} de sacarose e 1.200 mg.L^{-1} de ácido bórico, solidificado com 10 g.L^{-1} de ágar, em pH aferido para 6.
- b) Deve ser avaliado entre 5 e 7 horas pós-inoculação.
- c) Os botões florais devem ser coletados em estágio de pré-antese, entre às 14h00 e 18h00.
- d) O número médio de grãos de pólen por antera e por flor varia entre as cultivares de nespereira.
- e) A aplicação de 900 mg. L^{-1} de ácido bórico em panículas de nespereira Mizauto proporciona aumento na germinação de grãos de pólen.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE JÚNIOR, 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, 2010.
- 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, 2010.
- ANUÁRIO brasileiro da fruticultura. Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2014. 128 p.
- BARBOSA, W. et al. Distribuição geográfica e diversidade varietal de frutíferas e nozes de clima temperado no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 341-344, ago. 2003.
- BARBOSA, W. et al. Polinização das frutíferas de caroço, ameixeira, nectarineira e pessegueiro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 3-13, 1991.
- BETTIOL NETO, J. E. et al. Potencial produtivo de novas seleções de nespereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1277-1282, 2010.
- BONAVENTURE, L. **A cultura da cherimóia e de seu híbrido a atemóia**. São Paulo: Nobel, 1999. 181 p.
- BUENO, G. O. R. **Características de qualidade de biscoitos e barras de cereais ricos em fibra alimentar a partir de farinha de semente e polpa de nêspera**. 2005. 118 p. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- CABALLERO, P.; FERNANDEZ, M. A. Loquat, production and market. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON LOQUAT, 1., 2002, Valencia. **Proceedings...** Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2003. p. 11-20.
- CAMPOS, A. C. **Mecanismo de acção do ácido 1-naftalenoacético (ANA) na monda de frutos de nespereira [Eriobotrya japônica (Thunb.) Lindl.]**. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

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

CHAGAS, E. A. et al. Ajuste da concentração de ágar e sacarose para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarina. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD ROM.

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, 2010.

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, 2009.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 109-120, 2011. Número especial.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Características florais e carpométricas e germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 7, p. 731-740, jul. 2013.

FRANCHI, G. G. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal and survival. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 5267-5281, May 2011.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 7, p. 18-20, 2006.

FREITAS, D. A. F. et al. Avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Pyrus callieriana* Dcne. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD ROM.

GAALICHE, B. et al. Assessment of pollen viability, germination, and tube growth in eight tunisian caprifig (*Ficus carica* L.) cultivars. **ISRN Agronomy**, Cairo, n. 2013, p. 1-4, 2013.

- GAALICHE, B.; TRAD, M.; MARS, M. Effect of pollination intensity, frequency and pollen source on fig (*Ficus carica* L.) productivity and fruit quality. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, n. 4, p. 737-742, 2011.
- GRASSI, M. A. **Fenologia e qualidade de frutos de nespereira**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.
- 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.
- 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, 1963.
- LEITE, D. L.; SOUZA, C. M. Polinização. In: _____. **Frutas do Brasil: pêra produção**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. p. 23-28.
- LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 627 p.
- MARTINEZ-CALVO, J.; BADENES, M. L.; LLÁCER, G. **Descripción de variedades de níspero japonês**. Valencia: Generalitat Valenciana, 2000. 119 p. (Série Divulgación Técnica, 47).
- MIRANDA, P. A.; CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) palmae pollen. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 38, n. 1, p. 29-33, 1990.
- NAVA, G. A. et al. Fenologia e produção de pessegueiros 'granada' com aplicação de cianamida hidrogenada e boro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 297-304, jul. 2009.
- NUNES, J. C. O. et al. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 35-39, 2001.
- OJIMA, M. et al. **Cultura da nespereira**. Campinas: Instituto Agronômico, 1999. 36 p. (Boletim Técnico, 185).

OLIVEIRA, F. L. de et al. Influência das variações climáticas na atividade de vôo das abelhas jandairas *Melipona subnitida* Ducke (Meliponinae). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 598-603, set. 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. **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 Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

PASQUAL, M. et al. Cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 199-200, 2002.

PEROZA, J. M. Y.; VIEIRA, E. M.; NITZCHE, T. Cadeia produtiva de nêspera na região do Alto Tietê: indicadores econômicos da produção e mercado atacadista. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 214-217, ago. 2006.

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, 1967.

PIO, L. A. S. **Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de armazenamento**. 2003. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

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, p. 293-296, jul./set. 2004.

PIO, R. et al. **Aspéctos técnicos do cultivo da nespereira**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Nespereira/Indez.htm>. Acesso em: 10 jan. 2015.

PIO, R. et al. Aspectos econômicos do cultivo de nêspera em São Paulo. **Jornal Toda Fruta**, Jaboticabal, n. 29, p. 1-2, ago. 2006.

PIO, R. et al. Produção de cultivares de nespereira na região leste paulista. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1053-1056, jul. 2007.

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

RODRIGUÉZ, A. **El cultivo del níspero em el Valle del Algar-Guadalest**. Alicante: Sociedad Cooperativa de Crédito de Callosa de Ensarriá, 1983. 262 p.

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

SHARAFI, Y.; MOTALLEBBI-AZA, A. R.; BAHMANI, A. In vitro pollen germination, pollen tube growth and longevity in some genotypes of loquat (*Eriobotria japonica* Lindl.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 41, p. 8064-8069, 2011.

SILVA, M. M. **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, 1996.

SOUSA, P. J. S. Polinização em maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 65-70.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

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.

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

ZAMBOM, R. C. **Meio de cultura para germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.)**. 2014. 39 p. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

ZAMBON, C. R. et al. Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 2, p. 400-407, 2014.