

**AÇÃO DO IPRODIONE E CÁLCIO SOBRE ALGUNS ASPECTOS  
FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DO  
PESSEGUEIRO DIAMANTE ( *Prunus persicae* L. Bastch)**

**ARNALDO FREITAS DE OLIVEIRA JÚNIOR**

1999



**ARNALDO FREITAS DE OLIVEIRA JÚNIOR**

**AÇÃO DO IPRODIONE E CÁLCIO SOBRE  
ALGUNS ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA  
GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DO  
PESSEGUEIRO DIAMANTE (*Prunus persicae*  
(L.) Batsch)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso  
de Mestrado em Agronomia, área de concentração  
em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre"

Orientador  
Prof. José Darlan Ramos

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
1999

**Ficha catalográfica preparada pela Divisão de processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA.**

Oliveira Júnior, Amaldo Freitas de

Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos fisiológicos da  
germinação de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' (*Prunus  
persicae* (L.) Bastch)/

Amaldo Freitas de Oliveira Júnior. - Lavras: UFLA, 1999.

58P.:il.

Orientador: José Darlan Ramos

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Pêssego. 2. Pólen. 3. Defensivo químico. 4. Germinação de grãos  
de pólen. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.25995

**ARNALDO FREITAS DE OLIVEIRA JÚNIOR**

**AÇÃO DO IPRODIONE E CÁLCIO SOBRE ALGUNS  
ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA GERMINAÇÃO DE  
GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUIRO  
DIAMANTE (*Prunus persicae* L. Batsch)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do Curso  
de Mestrado em Agronomia, área de concentração  
em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 01 de março de 1999

Samuel Pereira de Carvalho

UFLA

Moacir Pasqual

UFLA

  
Prof. José Darlan Ramos  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## ***DEDICO***

Aos meus pais, Arnaldo Freitas de Oliveira e Dair Belini Oliveira, que souberam me respeitar e incentivar para que, com seus exemplos de honestidade, paciência e fé, pudesse alcançar mais essa vitória.

À minha filha, que tanto amo, Marina C. de Oliveira.

À minha irmã, Ana e ao meu cunhado, Paulo pela alegria de meu afilhado Gustavo.

Ao meu tio, Luis Sarmiento de Oliveira ( *in memoriam* ).

Amo vocês!

***À vida! À nova vida que nasce!***

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

**Arnaldo Freitas de Oliveira Júnior**, nascido aos 18 de dezembro de 1965 em Presidente Prudente - SP. , é filho de Arnaldo Freitas de Oliveira e Dair Belini Oliveira.

Concluiu o curso de Engenharia Agronômica em julho de 1994 pela então Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, sendo a última turma nesta condição. Hoje Universidade Federal de Lavras – UFLA, tendo sido bolsista de iniciação científica na área de Fruticultura.

Em agosto de 1994 iniciou o curso de especialização em Fruticultura.

Março de 1995 iniciou ao curso de mestrado em Fruticultura, sendo a primeira turma sob a nova condição de Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Em agosto de 1996 foi admitido na Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural - EMATER-MG, como gerente da Unidade Básica em Barbacena-MG.

## ***AGRADECIMENTOS***

A Deus, por toda graça que já recebi, recebo e sempre receberei.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento e Pesquisa do Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do curso.

Ao amigo e professor Dr. José Darlan Ramos que com sua amizade e experiência profissional transmitiu-me importantes ensinamentos, acreditando e confiando em mim, com incansável orientação e sábias contribuições para o enriquecimento desta dissertação, ainda pelo seu total apoio e incentivo tanto para minha formação profissional como pessoal.

Ao professor e amigo Dr. Moacir Pasqual, pela co-orientação, apoio, amizade e incentivo.

À pesquisadora do Instituto de Botânica do estado de São Paulo, Dra. Maria Stella Fernandes Silvestre-Capellato, pela co-orientação e receptividade ao me acolher com boa vontade no departamento de Palinologia, e a todos os funcionários e técnicos daquela instituição.

Aos funcionários do pomar, dos laboratórios de Biotecnologia, Nematologia e Biologia da UFLA, onde fui sempre bem recebido.

Aos colegas com os quais tantas vezes troquei ricas experiências: Denny, Valtemir, Carla, Adenilson, Paulão, Joãozinho ( Barbacena ), Mr. Cleber, Prof. Igor Van Tiensenhausen.

Aos amigos de São Carlos, Marcos, Pedro e Carlos.

Àqueles que direta ou indiretamente participaram de meu processo de evolução pessoal e espiritual, entre eles, a Oficina de Oração, Márcio, Alexandre, Denise Souto,



**Marcia Santos, Daniela, Fernanda Duvra, Delisete, Cléria, Rozane, ao grupo “Fé e Política”.**

**À mulher, que teve participação definitiva nesse trabalho quando estimulando-me e acompanhando-me em todos os momentos finais para alcançar a mais essa vitória soube fazer-se presente dando-me luz, paz e alegria. Bebel (*Feia!*)**

**Ao Departamento de Agricultura, pela colaboração.**

**Aos professores de Fruticultura, Nagib, Ramires, Pasqual.**

**À EMATER-MG, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais, nas pessoas de A. C. de M. Giovanini e Eluse Duarte por me disponibilizarem para a execução deste trabalho, e aos funcionários Olivia Maria, Célia, Tânia, Sérgio, Carlos, Adahil, Mário, Rubens e a toda Unidade Básica de Barbacena, pelo apoio e amizade recebidos.**

**A todos que também contribuíram para meu crescimento pessoal, profissional e espiritual, a fim de que eu alcançasse mais esta vitória.**

**A todos, meu muito obrigado!**

## **PENSAMENTO**

Durante nossa jornada de vida encontramos muitas pessoas especiais. Pessoas com luz própria, que brilham por si mesma se possuem a capacidade de iluminar a vida daqueles que estão por perto ou ainda, aqueles que passam por suas vidas.

As pessoas que me foram luz! Luz que iluminaram meus caminhos. Caminhos que me conduziram ao meu crescimento, meus agradecimentos. Pessoas assim, tocam a nossa vida num instante, e se eternizam para sempre em nosso coração e nunca mais deixam de viver em nós.

É assim que acontece. Os mistérios da vida nos entrelaçam confusamente, nos levam para longe, nos trazem de volta e nos mostram a verdade. Desentrelaçam enfim, nos trazendo a sabedoria de sermos o que somos e aprendemos. No entanto, não temos a consciência de que nós somos muito mais do que aquilo que pensamos ser...

Todas as respostas para os imponderáveis mistérios da vida se encontram dentro de nós mesmos, e que todas as coisas das quais precisamos se originam de dentro de nós, e se ajuntam para criar nossa vida. É como se fosse um ímã que atrai diversas peças em nosso interior, à medida em que vamos precisando no dia-a-dia, de acordo com cada situação distinta.

Tudo isso é energia! É o princípio de usarmos a energia que há em cada um. Devemos aprender a trabalhar com as energias que existem dentro de nós. Quando aprendermos a usar a energia interior, essa poderosa energia, estaremos prontos para vencermos o ódio, a dúvida, a violência, a amargura, a insegurança, o medo, a doença e até mesmo a falta de confiança, pois trata-se de canalizarmos nossa energia para o bem, e, naquilo que cremos e/ou queremos. Acredite que quando você canaliza suas energias em determinado ponto ou objetivo, o cosmo energético está sintonizado com suas energias e, portanto, nesse momento, passa a existir uma coesão, uma junção sincronizada de fluxos de energias direcionadas para um único ponto: seu objetivo!

***Arnaldo Freitas de Oliveira Júnior.***

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	3
2.1 Pólen .....	3
2.2 Cálcio .....	8
2.3 Pesticidas .....	10
2.4 Doenças durante o período de floração .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1 Escolha e coleta dos botões florais .....	14
3.2 Meio básico de cultura .....	14
3.3 Características toxicológicas do fungicida.....	15
3.4 Grãos de pólen .....	16
3.4.1 Contagem .....	16
3.4.2 Análise morfológica.....	17
3.4.3 Tratamento estatístico.....	19
3.4.4 Ilustrações.....	20
3.5 Pulverização do fungicida em campo experimental.....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUEIRO 'DIAMANTE'.....</b>	<b>21</b>
4.1.1 Dimensões de grãos de pólen .....	21
<b>4.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DOS GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUEIRO 'DIAMANTE'SUBMETIDOS À APLICAÇÃO DO ÍON CÁLCIO.....</b>	<b>21</b>
4.2.1 Determinação da concentração ideal de cálcio.....	21

4.2.2	Porcentagem de tubos polínicos estourados .....	23
4.2.3	Comprimento do tubo polínico.....	25
4.2.3.1	Comportamento de crescimento do tubo polínico .....	26
4.2.4	Diâmetro do grão de pólen .....	28
4.2.5	Velocidade de crescimento do tubo polínico.....	29
<b>4.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUEIRO 'DIAMANTE' SUBMETIDOS À APLICAÇÃO DO IPRODIONE E CÁLCIO .....</b>	<b>32</b>
4.3.1	Efeitos do fungicida sobre a fisiologia dos grãos de pólen.....	32
4.3.2	Porcentagem de germinação de grãos de pólen .....	32
4.3.3	Porcentagem de germinação de grãos de pólen após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos de aplicação do iprodione .....	33
4.3.4	Porcentagem de tubos polínicos rompidos após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 minutos de aplicação do iprodione .....	35
4.3.4	Comprimento de tubos polínicos após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 320 minutos de aplicação do iprodione .....	37
4.3.5.1	Comportamento do crescimento do tubo polínico .....	40
4.3.6	Diâmetro de grãos de pólen após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos de aplicação do iprodione.....	42
4.3.7	Velocidade de crescimento do tubo polínico após aplicação do iprodione .....	44
<b>4.4</b>	<b>EFEITOS DAS ÉPOCAS DE PULVERIZAÇÕES DO IPRODIONE SOBRE ASPECTOS DA PRODUÇÃO DO PESSEGUEIRO 'DIAMENTE' .....</b>	<b>46</b>
4.4.1	Determinação da época adequada para pulverização do iprodione.....	46

<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>6 ANEXO .....</b>	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>50</b>

## **ANEXO**

<b>Anexo ( Fotos – Foto 1 a Foto 16) .....</b>	<b>49</b>
--	-----------

**Foto 1** Início do processo de prolongamento da intina – Germinação de grãos de Pólen.

**Foto 2** Rompimento da membrana celular.

**Foto 3** Tubo polínico em meio contendo cálcio, evidenciando a integridade e boa aparência da membrana.

**Foto 4** Efeito de população.

**Foto 5** Amostra para contagem com poucos números de grãos de pólen.

**Foto 6,7, 8, 9 e 10** Comprimento do tubo polínico em concentrações de cálcio (0, 100, 200, 300, e 400 ppm).

**Foto 11** Germinação com fungicida.

**Foto 12** Germinação fungicida+cálcio.

**Foto 13,14** Tubos polínicos sem rompimento na presença de cálcio+fungicida.

**Foto 15** Efeito negativo do fungicida sobre o crescimento do tubo polínico.

**Foto 16** Liberação do conteúdo citoplasmático devido ao rompimento da membrana da parede celular em meio contendo fungicida.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINAS</b>
1 Porcentagem de germinação de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' sob diferentes concentrações de cálcio. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	22
2 Porcentagem de tubos polínicos rompidos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante'. UFLA, Lavras, MG, 1998 .....	24
3 Comprimento do tubo polínico de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' sob diferentes concentrações de cálcio e do fungicida a 1500ppm. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	26
4 Comprimento do tubo polínico medidos a cada 15 minutos em meio de cultura contendo cálcio a 200ppm e da testemunha. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	27
5 Ganho de crescimento dos tubos polínicos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante', durante 4 horas em meio contendo cálcio a 200ppm. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	28
6 Diâmetro de grãos de pólen sob diferentes concentrações de cálcio e 1500ppm de iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	29
7 Velocidade de crescimento dos tubos polínicos ( $\mu\text{m/h}$ ) do pessegueiro 'Diamante' medidos a cada sessenta minutos, num total de quatro horas. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	30
8 Porcentagem de germinação de grãos de pólen de pessegueiro 'Diamante' em diferentes situações. UFLA, Lavras, MG., 1998.....	33
9 Porcentagem de germinação de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' após aplicação nos tempos de 0, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 minutos de iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	35
10 Porcentagem de tubos polínicos rompidos em sua extremidade apical após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos, de aplicação do iprodione - 1500ppm. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....	36
11 Comprimento dos tubos polínicos após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos, de aplicação de iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998. .	38

- 12 Comprimento dos tubos polínicos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' sob efeito do cálcio e da interação fungicida e cálcio. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....40
- 13 Ganho de crescimento do tubo polínico após 4 horas de avaliação de grãos de pólen de pessegueiro 'Diamante'. UFLA, Lavras, MG., 1998..41
- 14 Diâmetro de grãos de pólen germinados do pessegueiro 'Diamante' após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos de aplicação do iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998. ....43
- 15 Velocidade de crescimento dos tubos polínicos do pessegueiro 'Diamante' após 4 horas de observação. UFLA, Lavras, MG.,1998. ....44
- 16 Épocas de pulverização do iprodione em plantas de pessegueiro 'Diamante'. UFLA, Lavras, MG., 1998. .... 48

## RESUMO

OLIVEIRA JR., Arnaldo Freitas de. Ação do iprodione sobre alguns aspectos fisiológicos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' (*Prunus persicae* Batsch ). Lavras: UFLA, 1997. 61p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).\*

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios de Biotecnologia e Nematologia da Universidade Federal de Lavras ( UFLA ), Lavras, MG, durante o período de setembro de 1997 a março de 1998. O experimento foi dividido em quatro partes: 1 - caracterização morfológica de grãos de pólen ( vista polar e equatorial ); 2 - estudar os efeitos do íon cálcio sobre aspectos fisiológicos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante'; 3 - estudar os efeitos do fungicida ( i.a. iprodione ) sobre todos aspectos fisiológicos; 4 - Determinar a melhor época de pulverização do fungicida durante o período da floração. O objetivo foi estudar os efeitos do cálcio e caracterizar os efeitos do fungicida (i.a. iprodione) sobre os aspectos fisiológicos: percentagem de germinação, percentagem de tubos polínicos rompidos, comportamento e velocidade de crescimento para formação dos tubos polínicos e diâmetro dos grãos de pólen de pessegueiro 'Diamante'. O experimento constou de quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado. O cálcio é um importante componente das células vegetais e, portanto, constituinte das organelas e membranas; promotor da germinação de grãos de pólen, na velocidade de crescimento e formação de tubos polínicos. Obteve-se a melhor concentração de 200ppm de cálcio para a germinação de grãos de pólen.

---

\*Orientador: José Darlan Ramos, Membros da banca: Samuel Pereira de Carvalho e Moacir Pasqual.



A partir desse resultado, foram realizados todos demais estudos de caracterização fisiológica referente ao processo de emissão e formação dos tubos polínicos. Durante o período de floração utilizou-se o fungicida com i.a. iprodione no controle do fungo *Monillinia fructicola*, causador da podridão parda. O mesmo fungicida, foi utilizado nas concentrações recomendadas pelo fabricante (1500ppm) para estudar seus efeitos, *in vitro*, sobre os aspectos fisiológicos dos grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante'. Observou-se que o efeito desse ingrediente ativo foi negativo sobre todos os aspectos estudados. No entanto, quando utilizou-se o cálcio, pôde-se verificar que este ion participou como fator atenuante dos efeitos do fungicida, reduzindo seu impacto sobre todos os aspectos fisiológicos caracterizados. Foram realizadas pulverizações em um hectare na cultura de pessegueiro 'Diamante' com o mesmo fungicida em uma propriedade rural durante todo o período de floração, ou seja, no início, em plena floração, ao final e ainda o controle. Observou-se que as épocas de pulverização em plena floração e no seu término apresentaram os melhores resultados para produção de pêssegos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA JR., Arnaldo Freitas de. The action of iprodione and calcium over some physiological aspects of pollen grains from the "Diamante" type of peach tree (*Prunus persicae* (L.) Bastch). Lavras, UFLA, 1999 - (Master in Phytotechny).

This piece of work was conducted at the Biotechnology and Nematology laboratories at UFLA (Federal University of Lavras), Lavras, MG, Brazil, from September of 1997 to March of 1998. The experiment was divided into four parts: I - Morphological characterization of peach tree pollen; II - Studying the effects of the calcium ion on the physiological aspects of peach tree pollen; III - Studying the effects of the pulverization of fungicide during the flowering stage. The aim was to study the effects of calcium and to characterize the effects of the fungicide (i.a. iprodione) over the physiological aspects: the rate of germination (percentual), percentual rate of burst pollen tubes; behavior and speed of growth for the formation of pollen tubes and the diameter of pollen grains from the "Diamante" type of peach tree. The experiment consisted of four repetitions in completely randomized outlining. It is known that calcium is an important component in vegetable cells, and therefore part of the organelles and membranes. It is the element which promotes the germination of pollen grains in the speed of growth and formation of pollen tubes. The best concentration of 200ppm of calcium for the germination of pollen grains was obtained. All posterior studies on the physiological characterization concerning the process of emission and formation of pollen tubes were carried using the obtained result as a reference.

---

Oriented by: José Darlan Ramos; Guidance committee: Samuel Pereira de Carvalho (UFLA, teacher) e Moacir Pasqual (UFLA, teacher).

During the flowering period a fungicide on i.a. iprodione was used for controlling the *Monillina fructicola* which causes the brown kind of putrefaction. The very same fungicide was used in quantities recommended by the manufacturer (1500ppm) for studying its *in vitro* effects on the physiological effects of the "Diamante" peach tree pollen grains. It was observed that the effects of such active ingredient fared negative results over all of the aspects studied. However, when calcium was used, it was noticed that such ion acted as an attenuation factor for the effects of the fungicide, reducing its impact over all the characterized physiological aspects. Pulverizations were carried out on one hectare of a "Diamante" plantation using the same fungicide, in a rural area throughout the flowering period, as follows: In the beginning of the flowering period, during the flowering period, at the end of the flowering period, and during the ones at the end of flowering period were the ones which fared the best results as for the production of peaches.

## 1 INTRODUÇÃO

O pessegueiro Prunus persicae (L.) Batsch. é uma frutífera importante para a economia nacional pois o Brasil é atualmente o sétimo produtor mundial de pêssego chegando a uma produção em torno de 130.000 toneladas por ano (Nakasu et al., 1997). No estado de Minas Gerais essa cultura tem tido um grande incremento na área plantada, tanto para a produção de fruta fresca quanto industrializada cujo consumo vem aumentando. Minas Gerais ocupa hoje a quinta posição como produtor de pêssego, precedido pelo Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (IBGE, 1995), aumentando sua produção a cada ano, cujo maior impulso foi nos últimos cinco anos.

A distribuição das áreas de plantio varia de acordo com as condições climáticas, sendo que devido principalmente aos trabalhos de melhoramento vegetal, surgiram variedades menos exigentes quanto ao frio e sua dispersão é ampla. Hoje, encontra-se plantios tanto em locais de clima temperado como subtropical e são inúmeras as cultivares exploradas: 'BR-1', 'BR-3', 'Marli', 'Diamante', 'Premier', 'Coral', 'Ouro-mel', 'Biuti', 'Douradão', 'Jóia', 'Eldorado', entre outras (Informe Agropecuário, 1997). O município de Barbacena é hoje o maior produtor de Minas Gerais com uma área aproximada de 200ha e produtividade média de 10 toneladas por hectare, com perspectivas de aumento desta produção.

Assim como outras culturas, o pessegueiro é também prejudicado por inúmeras pragas e doenças, o que acarreta o uso intensivo de agrotóxicos, que são prejudiciais ao meio ambiente, especificamente aos insetos polinizadores, ao homem e ainda interferem no processo de emissão do tubo polínico, responsável pela fertilização. O uso indiscriminado de defensivos provavelmente exerce influência negativa sobre a taxa de fecundação resultando num menor índice de produtividade por planta. Verifica-se portanto, que deve haver grande preocupação quanto ao uso indiscriminado de agrotóxicos, pois além de

prejudicar a saúde humana, agride e interfere nos processos ambientais, podendo ser fator de redução na produção de frutos. Sugere-se, então, que estudos devam ser realizados visando minimizar o efeito de defensivos sobre o meio ambiente e a saúde humana, diminuindo também interferências no processo fisiológico vegetal, reduzindo perdas na produção. Tais estudos devem associar a utilização de produtos que venham contribuir controlando patógenos e simultaneamente favorecendo a cultura. Alguns resultados indicam que determinados produtos químicos utilizados exercem efeitos indesejáveis sobre o processo de emissão de tubos polínicos em algumas culturas.

Outro aspecto importante é o estudo dos processos relacionados aos grãos de pólen. A palinologia, ciência que estuda os grãos de pólen e esporos, possui íntima relação com outros ramos da ciência, como, por exemplo, a citologia, genética, física, química e matemática. Dentre as inúmeras aplicações da palinologia destaca-se a utilização prática no melhoramento de plantas, notadamente nos estudos de viabilidade de pólenes e 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. Vários fatores estão relacionados com esse processo, destacando-se os ligados à composição do meio básico de cultura, intrínsecos à própria natureza do pólen, quanto a seu estágio de maturação fisiológica, origem, características genéticas, nutrição da planta, agentes químicos e ambientais como temperatura e umidade.

Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo elucidar os efeitos *in vitro* da utilização do fungicida, cujo princípio ativo é o iprodione, e do cálcio nas etapas que sucedem o processo de prolongamento e emissão da intina, formação e desenvolvimento do tubo polínico, instantes antes da fertilização.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Pólen

O pessegueiro apresenta altas taxas de autofecundação e ainda uma parcela de fecundação cruzada em que seus principais polinizadores são as abelhas européias *Apis mellifera* ou *Trigona spinipes*, abelha irapuá ou arapuá (Sousa, 1988). Por isso devem-se adotar critérios bem definidos para o controle de pragas e doenças evitando comprometer o meio ambiente, o homem e principalmente a polinização, fator essencial para a produção de frutos. A cultura do pessegueiro é susceptível a inúmeros ataques de pragas e doenças durante todo seu ciclo. Segundo Southerland et al. (1984), Philomena e David (1985), Wetzstein (1989) e Lacerda et al. (1994), o uso de alguns pesticidas, como fungicidas e inseticidas, interferem negativamente no prolongamento da intina, emissão, alongamento e formação do tubo polínico dos grãos de pólen, não permitindo, portanto, a ocorrência da fertilização. Assim sendo, há necessidade de estudos mais detalhados a respeito do grão de pólen, sua morfologia e seu comportamento fisiológico.

Os primeiros estudos sobre esse assunto tiveram início há muito tempo, sendo a palinologia considerada uma ciência à parte (do grego *palynein*= espalhar poeira), e termo que foi introduzido pelos pesquisadores Hyde e Williams (1954), cujo objetivo é estudar as características morfológicas externas dos grãos de pólen e esporos, tanto fósseis como atuais, bem como sua dispersão e aplicações (Melhem, 1978). No entanto, há poucos estudos detalhados sobre a fisiologia e o comportamento dos pólenes diante de sua exposição a pesticidas de um modo geral.

Grãos de pólen são geralmente estruturas microscópicas e de coloração amarelada, apresentando como estruturas principais a intina, parte interior do grão de pólen, na qual ocorre o processo de emissão, prolongamento,

desenvolvimento e formação do tubo polínico, e a exina, parte externa que confere escultura ao grão de pólen, sendo uma estrutura rígida e de composição química estável, devido a esporopopelina (Melhem, 1973). Através do estudo da composição morfológica pode-se identificar gêneros e até mesmo espécies de plantas auxiliando sua classificação botânica.

Rempe (1937), Linskens (1987) e Linskens & Jorde (1986), através de coletores instalados em aviões e balões de gás constataram a presença de pólen na atmosfera, devendo-se sua sustentação nessas condições a fatores ambientais como umidade relativa do ar, temperatura, chuvas e ventos. Correntes de ar horizontais são capazes de transportar grãos de pólen a quilômetros de distância (Maher, 1964); mas, as correntes de ar verticais sustentam os grãos de pólen na atmosfera por dias, semanas e até mesmo meses.

A palinologia auxilia nos estudos de alergias causadas por pólen de algumas espécies. Identificam-se espécies através de pólen presentes em fezes humanas ou animais; podem-se identificar ainda espécies através dos pólen aderidos a objetos relacionados a crimes, além da identificação de pólen presentes no mel, contribuindo com apicultores no maior controle de qualidade e melhoria deste produto; através da identificação do pólen fóssil e de cropólitos fossilizados podem-se estabelecer correlações de costumes humanos, rotas migratórias, hábitos funerários, hábitos alimentares e, principalmente, a evolução florística ocorrida ao longo do tempo e conseqüentemente o clima de uma região e todas as mudanças relacionadas a essa evolução.

Outra aplicação importante e recente é a sua utilização no melhoramento de plantas, a exemplo de estudos de viabilidade de pólen e substâncias químicas promotoras no prolongamento da intina e alongamento e formação do tubo polínico, contribuindo para perspectivas de aumento de produção em várias culturas.

É por meio da expansão da intina através de seu alongamento e formação do tubo polínico que ocorre a fertilização, sendo necessário que o pólen esteja em contato com o estigma para que o grão de pólen germine dando início ao processo de fecundação e posterior frutificação. O estigma exsuda uma secreção altamente específica em lipídeos que evita sua desidratação e favorece a fixação dos grãos de pólen, garantindo ótimas condições para o prolongamento da intina à “germinação”, originando uma estrutura denominada tubo polínico, que irá fecundar o óvulo (Carvalho, 1983). 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).

O início da emissão do tubo polínico é geralmente rápido (Kwack & Brewbaker, 1963) iniciando-se através do estímulo de componentes químicos, podendo-se utilizar água destilada, ácido bórico, ácido nítrico, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, sacarose e nitrato de potássio (Kwack & Brewbaker, 1963; Pfahler, 1967). Todo o período de formação do tubo polínico é controlado por substâncias naturais de crescimento, às quais se incluem tanto tipos de promotores quanto inibidores, sugerindo que os promotores de crescimento dirigem o tubo polínico por quimiotropismo (Carvalho, 1983). Estudos utilizando o cálcio e boro evidenciaram que esses são importantes promotores na germinação e alongamento do tubo polínico (Kwack & Brewbaker, 1963; Sahar & Spiegel-Roy, 1980). Nos testes envolvendo a emissão do tubo polínico, sugere-se que os meios utilizados podem ser líquidos (Chichirico & Grilli Caiola, 1985) ou sólidos (Pasqual et al., 1982; Raseira, 1992). Tornam-se necessários estudos complementares que permitam a determinação de concentrações adequadas de substâncias químicas específicas acrescidas ao meio de cultura para cada espécie ou cultivar, pois as respostas são diferenciadas em função de sua maturação fisiológica, morfologia e origem, além de nutrição da planta.



Alguns fatores afetam a viabilidade do pólen e o princípio de emissão do tubo polínico. A longevidade do pólen também pode ser afetada por fatores genéticos (Sousa, 1988). Em pólen binucleados há maior viabilidade em relação aos trinucleados (Brewbaker, 1967; 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, 1967). Através da análise em 42 espécies de angiospermas numa amplitude de 25 famílias, Kirby & Smith (1974) observaram maior quantidade de compostos de superfície nos pólen binucleados do que em pólen trinucleados e atribuíram essas diferenças quantitativas ao número de núcleos existentes no pólen (Sousa, 1988). Observando grãos de pólen de pessegueiro "Aurora" após um período de trinta dias de armazenamento em sílica gel e temperatura ambiente, Oliveira Júnior (1995) observou que os mesmos sofreram uma queda drástica em sua viabilidade, atribuindo esse fenômeno a alterações fisiológicas.

Acúmulo de produtos metabólicos secundários, alteração dos lipídeos da exina do pólen, alteração na velocidade de respiração e conversão dos ácidos orgânicos foram observados por Stanley & Linskens (1974).

A umidade presente nos grãos de pólen é fator importante em sua viabilidade. O baixo teor de umidade do pólen (8 a 10%) quando armazenado propicia boa longevidade, independentemente do método de armazenamento (Sprague & Johnson, 1977). Torna-se necessário determinar o teor adequado de umidade do grão de pólen para cada espécie, obtendo sua maior longevidade quando armazenado por longo período, já que a presença desse fator interfere negativamente na porcentagem de emissão do tubo polínico.

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 & Van Der Wall, 1988). Temperaturas em torno de 25°C são satisfatórias para o início

da emissão do tubo polínico (O. Reuvini & Golobovitz, 1986; Ebadi, et al., 1995). Estudando espécies da família Compositae, Hoekstra & Bruinsma (1975) observaram que a viabilidade do pólen possui comportamento inverso ao da temperatura e umidade relativa do ar durante o período de pré-colheita.

A necessidade da retirada de umidade do grão de pólen favorece a diminuição da atividade metabólica e também da ação de microorganismos indesejáveis (Stanley & Linskens, 1974; Matthews & Kraus, 1981; Martins et al., 1981).

Para a preservação da viabilidade do pólen, mesmo que seja por algumas semanas, é necessário reduzir a umidade do mesmo, segundo Snyder & Clausen (1974). O teor ideal de umidade varia para cada caso estudado (Sousa, 1988); Segundo a mesma autora, a presença de alto teor de umidade poderá induzir à formação de cristais de gelo intracelulares que implicarão na ruptura da parede celular. Ramos et al. (1996) citam a necessidade da presença de sílica-gel no armazenamento para manutenção do potencial germinativo por curto período, de grãos de pólen de ameixeira cv. januária. A intina de grãos de pólen se rompe em contato com alta umidade, devido ao aumento da pressão osmótica e da baixa resistência da parede celular (Akamine & Girolami, 1959). O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se ligado a redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade (Sousa, 1988).

Oliveira Júnior (1995) armazenou pólenes de pessegueiro cv. Aurora a temperatura ambiente por 15 e 30 dias e obteve resultados não satisfatórios com 1,81% de germinação aos 30 dias de armazenamento contra 64,95% da testemunha dos grãos de pólen com tubos polínicos emitidos. Já Eenik (1983) armazenou pólen de alface a temperatura ambiente (20°C) e em refrigerador (4°C), e observou a perda de viabilidade depois de 2 dias a temperatura ambiente. Entretanto, no refrigerador isso ocorreu após 4 dias, indicando que

temperaturas baixas são responsáveis por manter a viabilidade do pólen por um período prolongado de tempo.

Pólens de 30 angiospermas mantiveram-se viáveis por um período de 5 a 7 anos em nitrogênio líquido (-196°C) em trabalhos realizados por Livingston & Ching (1967). O acondicionamento de pólen em nitrogênio líquido é um método de armazenamento bem sucedido (Haunold & Stanwood, 1985). A longevidade do pólen pode ser afetada pelo estado nutricional da planta (Stanley e Linskens, 1974).

São necessários vários estudos para determinar tanto qualitativa como quantitativamente os componentes para a melhor composição do meio de cultura que possa expressar o maior índice de emissão do tubo polínico, seu alongamento e formação. Há necessidade de uma fonte de carboidrato para o início do processo de emissão e alongamento do tubo polínico (Sousa, 1988).

Seguindo o mesmo raciocínio, Bhojwani & Bhatnagar (1974) atribuem aos açúcares funções de substrato respiratório e controle da pressão osmótica.

## 2.2 CÁLCIO

Em trabalho sobre germinação de grãos de pólen de três cultivares de citros após um período de um ano de armazenamento, Sahar & Spiegel-rey (1980) estimularam a germinação utilizando o ácido bórico e o cálcio. Oliveira Júnior (1996), pesquisando emissão de tubos polínicos em limoeiro “cravo” e pessegueiro “aurora”, obteve bons resultados com concentração de 800 ppm e 200 ppm de cálcio, respectivamente, registrando 64,05% e 54,64% de grãos de pólen com tubo polínicos emitidos, nesta ordem. Segundo Poovaiah e Leopold (1976), o cálcio é essencial para manter a integridade estrutural da membrana e paredes celulares. As membranas tornam-se não seletivas, a compartimentalização celular é perdida e a interligação com as pectinas da

lamela média é afetada, em condições de deficiência de cálcio (Marinos, 1962). Esse íon exerce efeito cimentante ao pectato de Ca da lamela média (Fukumoto & Nagai, 1982 ) e, segundo esses autores, quando as células crescem, a superfície de contato entre elas aumenta bastante, o que explica a necessidade de um suprimento contínuo de cálcio.

Nesse estudo, pôde-se constatar esse afirmativa em condições *in vitro*, avaliando-se a formação do tubo polínico. O cálcio é tido como um dos componentes importantes na emissão do tubo polínico (Sousa, 1988) quando há um grande número de grãos de pólen aglomerados, fenômeno denominado “efeito de população”, observa-se maior índice de tubos polínicos emitidos (Bhojwani & Bhatnagar, 1974; Snyder & Clausen, 1974). Segundo Sousa (1988), o cálcio é responsável pelo “efeito de população”, pois difunde-se em meio aquoso e, quando em contato com grupos de pólen sobre o meio semi-sólido de cultura, o cálcio fica aderido entre os grãos de pólen contribuindo para o “efeito de população”. Para dados mais precisos da porcentagem de tubos polínicos emitidos, a densidade de população de grãos de pólen deve ser baixa para facilitar a contagem individual (Snyder & Clausen, 1974).

O cálcio adicionado ao meio básico de cultura durante a observação de grãos de pólen que emitem tubos polínicos propicia características fisiológicas como: o tubo polínico, assim como grão de pólen, com menor sensibilidade a variações do meio básico; menor permeabilidade do tubo polínico; crescimento do tubo polínico é mais vigoroso; tubo polínico com forma linear e 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, citados por Sousa, (1988). Essa mesma autora afirma que, a exceção do ácido giberélico, não há outro elemento químico que promova com tanta eficácia a emissão, alongamento e formação do tubo polínico como o cálcio. Ele liga-se a

uma proteína, a calmodulina, presente na maioria dos organismos eucarióticos. A calmodulina (CaM) é uma proteína reguladora encontrada no citoplasma e/ou ainda associada com membranas e organelas (Fukumoto & Nagai, 1982). Quando a CaM é ativada por meio do complexo Ca-CaM é possível o reconhecimento da proteína receptora (enzima) ligando-se a ela. Esta ligação leva ao complexo ativo CaM-Ca-enzima (Paliyath & Poovaiah, 1985).

### 2.3 PESTICIDAS

Apesar do cálcio exercer influência positiva sobre a emissão e formação do tubo polínico, existem outros fatores que afetam este processo. Podem-se destacar fatores intrínsecos relativos à própria natureza do pólen, quanto ao seu ponto de maturação fisiológica, estado nutricional da planta fornecedora de pólen, sua umidade e agentes externos, especificamente os pesticidas. Vários ingredientes ativos de produtos atuam como inibidor em todos os processos fisiológicos dos grãos de pólen e da formação do tubo polínico, não permitindo a fertilização. Entre eles pode-se citar o iprodione.

Estudos *in vitro* mostram que vários pesticidas registrados para algumas culturas específicas atuam na redução da porcentagem de emissão, alongamento e formação do tubo polínico (Gentile et al., 1971). Alguns pesticidas reduzem o crescimento do tubo polínico tanto *in vitro* (Reis, 1978; Gentile & Gallagher, 1972; Gentile et al., 1971; Bunu & Shapa, 1984), como *in vivo* (Gentile et al., 1973; Stainer, 1986). Vários grupos de agrotóxicos têm sido relatados em muitas culturas como fator negativo na emissão, alongamento e formação do tubo polínico de grãos de pólen (Southerland et al., 1984; Philomena & David, 1985; Wetzstein, 1989; Lacerda et al. 1994). Gentile & Gallagher (1972), trabalhando com petúnia, relataram que grãos de pólen *in vitro* apresentaram o processo de emissão do tubo polínico severamente reduzido quando aplicado

Malathion e medianamente pelo Trichlorfon. Lacerda (1991) verificou que agrotóxicos como Ethion e Lambfacyhalothrin condicionaram a menor porcentagem de emissão de tubos polínicos de grãos de pólen *in vitro* de tomateiro, seguidos por Malathion, Fenthion, Trichlorfon, N-dodecil benzeno de sulfato de sódio. Elezaby et al. (1995) citam que fungicidas inibiram a emissão do tubo polínico e sua formação mesmo quando com o uso de reguladores de crescimento.

O fungicida Benomyl induziu a formação anormal da morfologia do tubo polínico (He et al., 1996; Surena et al., 1995). Kimura et al. (1996), trabalhando com ácido giberélico (100 ppm) e estreptomicina (PM - 200 ppm) em uva cv. Muscat Baily A. (*Vitis vinifera* X *Vitis labrusca*), observaram que a emissão e alongamento do tubo polínico foram severamente inibidos pela giberelina e estreptomicina simultaneamente e o desenvolvimento do óvulo também. No entanto, a emissão e alongamento do tubo polínico não foram afetados quando usou-se giberelina exclusivamente. A presença de sais de cloreto e sulfato no meio básico de cultura reduziu a respiração em torno de 30 minutos, sugerindo ser esta a causa na redução do crescimento do tubo polínico em grãos de pólen (Dhingra, 1994).

A poluição com metais pesados em diferentes concentrações foi estudada por Sawidis & Reiss (1995), os quais adicionaram ao meio de cultura metais pesados como o Cd<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Mn<sup>+2</sup>, e Zn<sup>+2</sup> e observaram sua interferência sobre o prolongamento da intina e o crescimento do tubo polínico de *Lilium longiflorum* usando microscópio óptico. Esses metais ainda causaram efeito anormal na organização celular e nas vesículas secretoras do complexo de Golgi. Chibi & Maitilla (1994), estudando o efeito de poliaminas (putrescina e streptomicina) em tabaco, verificaram a inibição da maturação e emissão do tubo polínico, principalmente em altas concentrações. Em trabalhos com o fungicida propiconazol para a análise de sua influência na

emissão do tubo polínico, observou-se sua ação inibitória sobre a emissão e distribuição de organelas e microtúbulos, afetando-os severamente, demonstrando assim seu efeito sobre as membranas (He, Wetzein & Palevitz, 1995).

#### **2.4 DOENÇAS DURANTE O PERÍODO DA FLORAÇÃO**

A podridão parda é uma doença disseminada em várias regiões de clima temperado onde se cultiva o pessegueiro e outras rosáceas, provocada pelo fungo *Monilinia fructicola* Honey. Nas condições climáticas do estado de Minas Gerais, essa doença é considerada de grande expressão econômica para a cultura do pessegueiro, sendo responsável pela destruição de quantidade considerável de frutos maduros tanto na árvore como durante o período de comercialização. Na primavera ocorre intenso ataque em botões florais de pessegueiro causando-lhes enegrecimento e morte, ficando aderente ao pedúnculo por tempo indeterminado. A partir daí formam-se lesões necróticas nos pedúnculos e ramos, que podem se transformar em cancras persistentes. Aparecem nos botões florais atacados, em condições úmidas, bolor cinzento formado por frutificações de *M. fructicola*. Os tecidos dos capulhos florais sofrem desidratação continuando, inclusive, após a queda do fruto até sua mumificação (Manual de Fitopatologia, 1980).

O interesse no estudo do efeito de agrotóxicos, em especial o fungicida de princípio ativo iprodione e suas implicações por ocasião da floração para controlar a podridão parda - *Monilinia fructicola* Honey (*Monilia fructicola*), está associado a interesses de melhoramento de plantas e seu efeito *in vivo* na redução de seu impacto sobre a produtividade da cultura do pessegueiro. Seu efeito *in vitro* ainda é pouco estudado, sendo possível, inclusive, alterar o desenvolvimento do tubo polínico.

Este trabalho foi realizado em duas etapas: primeiramente avaliar a concentração de cálcio (0, 100, 200, 300, 400 ppm) *in vitro* que expressasse a melhor porcentagem de tubos polínicos emitidos e a partir desse resultado, analisar o uso do cálcio como fator atenuante do efeito do fungicida sobre as características: crescimento, integridade da membrana e comprimento dos tubos polínicos, porcentagem de tubos polínicos emitidos, rompidos, além da velocidade de crescimento do tubos polínicos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante'.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia, Fitopatologia de Sementes e Nematologia da Universidade Federal de Lavras-UFLA, Minas Gerais, no ano de 1998 durante o período da floração, no final de julho e início de agosto, do pessegueiro 'Diamante' *Prunus persicae* (L.) Batsch.

A cidade está localizada 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 o clima Cwb (Köppen, 1970) 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% (Brasil, 1992).



### **3.1 Escolha e coleta dos botões florais**

Para realização do trabalho foi selecionada uma planta do pomar da UFLA que apresentava-se fenotipicamente saudável. Os botões florais foram colhidos em estágio balão eliminando-se aqueles que apresentavam-se abertos, de acordo com a metodologia de Pasqual, Petri & Pereira (1981). Foram coletados 8 botões florais no período da manhã, próximo às 12 horas, em frascos de vidro, fechados e levados para o laboratório onde permaneceram em BOD com temperatura de 26°C até às 16 horas quando foram inoculados.

### **3.2 Meio básico de cultura**

Os grãos de pólen foram inoculados com auxílio de uma lupa com aumento de quatro vezes em placas de Petri contendo o meio de cultura. Para inoculação foram preparados os meios básicos de cultura compostos por: 1,0% de ágar + 10% de sacarose, complementando com os tratamentos 0, 100, 200, 300, 400 ppm de cálcio, na forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Nessa primeira fase do experimento objetivou-se definir qual a concentração de cálcio que propiciaria a melhor porcentagem de tubos polínicos emitidos pelos grãos de pólen. Não utilizou-se controle do fotoperíodo da BOD, pois Carvalho (1983) sugere que os promotores de crescimento dirigem o tubo polínico em direção ao ovário por quimiotropismo.

Após determinada a melhor concentração de cálcio que forneceria o maior índice de porcentagem de tubos polínicos emitidos, iniciou-se a segunda fase do trabalho que envolveu o uso de pulverizações com iprodione em placas de Petri contendo o meio básico de cultura. Foram pulverizadas todas as placas com 0,5ml do fungicida, utilizando-se um pulverizador manual (Lacerda, 1994) na concentração recomendada pelo fabricante (1.500 ppm).

### 3.3 Características toxicológicas do fungicida

O fungicida de i.a. iprodione pertence à Classe Toxicológica  $\bar{IV}$ , ao Grupo químico das hidantoínas e de composição 3-(3,5 diclorofenil)-N-ispropil-2,4-dioxoimidazolidine-1. O fungicida em pó molhável contém 50% de Iprodione (i.a.). De acordo com o Compêndio de Defensivos Agrícolas (1996), a sua aplicação é recomendada em plena floração para a cultura do pessegueiro, e nos demais períodos respeitando-se o período de carência de 3 dias, utilizando-se 1000l de calda/ha.

Avaliaram-se os características: desenvolvimento, comprimento e integridade da membrana dos tubos polínicos, porcentagem de tubos polínicos emitidos e rompidos, diâmetro dos grãos de pólen e comprimento dos tubos polínicos interagidos com o fungicida (iprodione) em tempos de 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 minutos após sua aplicação em grãos de pólen de pessegueiro e após serem mantidos em BOD por 12 horas. Todos os meios de cultura foram aferidos para pH=7,0. Ensaios de campo têm demonstrado que, mediante do uso de água não destilada, ocorrem grandes variações do PH diminuindo a eficiência do fungicida, assim como outros pesticidas.

Após o preparo do meio básico, os grãos de pólen foram dispersos em meios de cultura em placas de Petri, as quais permaneceram em BOD pelo período de 12 horas com temperatura controlada e mantida a 26°C, com a umidade relativa próxima de 100%. A temperatura utilizada está de acordo com Ebadi et al. (1995) que, trabalhando com Vitis vinífera 'Chardonnay' e 'Shiraz', citam ser satisfatória a temperatura em torno de 25°C para a iniciação do processo de prolongamento da intina. Após esse período, foram realizadas as leituras em microscópio óptico utilizando-se a objetiva de aumento de 40 vezes.

### 3.4 Grãos de pólen

#### 3.4.1 Contagem

Foram realizadas contagens em cinco campos diferentes, ao acaso, num total de aproximadamente 200 grãos de pólen por tratamento. Para avaliação dos grãos de pólen que emitiram seus tubos polínicos consideraram-se germinados aqueles que apresentaram tamanho do tubo polínico igual ou superior ao seu diâmetro (Pasqual, Petri & Mattos, 1982). Foram medidos em microscópio com câmara clara, o comprimento do tubo polínico e sua conformação, a porcentagem de tubos polínicos que apresentavam sua base terminal rompida liberando conteúdo e a porcentagem de grãos de pólen que emitiram seus tubos polínicos a partir do prolongamento da intina. Avaliou-se ainda o número de grãos de pólen por antera e o número de anteras por flor. As anteras de pessegueiro são deiscentes e por sua vez coletaram-se os pólenes em vidro côncavo, no qual adicionou-se 1mm<sup>3</sup> de ácido láctico. Após perfeita homogeneização retirou-se uma porção da suspensão e colocou-se uma gota sobre a placa de Newbauer, para a contagem em microscópio. Essa operação foi repetida seis vezes. O número de grãos de pólen foi estimado através da fórmula:

$$X = \frac{1000 \times 01}{0,1 \quad 30}$$

Sendo:

- X : número de grãos de pólen contados;
- 0,1: volume da câmara de placa de newbauer;
- 30: número de anteras contadas em cada flor;
- 1000: mm<sup>3</sup> de ácido láctico.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo que cada flor constituía uma repetição em cada placa de Petri.

### **3.4.2 Análise morfopolínica**

Esta análise foi efetuada em microscopia óptica preparando-se os grãos de pólen pelo método de acetólise de Erdtman (1960), que método visa reagir o principal componente da parede dos grãos de pólen, a esporopopelina, com o anidrido acético em meio ácido (Silvestre-Capelato, 1993). Após a coleta de botões florais, em fase de pré-antese, procedeu-se ao método de acetólise que consiste nas seguintes etapas:

1. Dissecação dos botões florais sobre papel de filtro utilizando-se pinça e estilete esterilizados ao rubro em chama de lamparina, para separação dos estames. Troca do papel de filtro para cada material e esterilização da pinça e estiletos, a fim de evitar contaminações;
2. Colocação dos estames em tubos de ensaio de vidro numerados, comprimindo-os no fundo do tubo com um bastão de vidro para a liberação dos grãos de pólen. Acrescenta-se cerca de 5ml de ácido acético glacial em cada tubo, e permanecendo em repouso por, pelo menos, 24 horas;
3. Centrifugação do material fixado durante 5 minutos a 2.000rpm, eliminando-se, em seguida o sobrenadante;
4. Preparação da mistura de acetólise no momento em que será usada, associando-se uma parte de ácido sulfúrico e nove partes de anidrido acético, adicionando-se 5ml dessa mistura em cada tubo;
5. Os tubos com a mistura são deixados em banho maria, a cerca de 100°C, agitando-se sempre seu conteúdo com um bastão de vidro, por um período de um minuto e meio a dois minutos;

6. Centrifugação da mistura por 5 minutos, a 2.000 rpm e, em seguida, retira-se o sobrenadante;
7. O resíduo polínico deve ser lavado em 10 ml de água destilada mais álcool etílico (3 gotas), usando um bastão de vidro para cada tubo durante 2 minutos;
8. O material é submetido a uma nova centrifugação, a 2000rpm por 5 minutos eliminando-se o sobrenadante;
9. Acréscimo, aos tubos, de 5ml da mistura água destilada mais glicerina (1:1), mantendo-a por 24 horas;
10. Após a centrifugação e decantação, o tubo deve ser colocado de cabeça para baixo sobre o papel de filtro, ficando assim o material em condições de ser depositado em lâminas;
11. os tubos devem voltar à posição normal após a montagem da lâmina, acrescentando-se 2 ml de glicerina pura, mantendo-o nessas condições até a conclusão dos estudos.

Para efetuar a montagem das lâminas permanentes utiliza-se gelatina glicerinada preparada segundo Erdtman (1971), obedecendo os seguintes passos:

- A. com o auxílio de um estilete ao rubro, encostar um pedaço de gelatina com cerca de 2mm de lado no sedimento contido no fundo do tubo mantido na posição vertical e de boca para baixo;
- B. colocar o fragmento de gelatina em contato com o pólen aderido sobre a lâmina de microcópico e repicá-lo em fragmentos menores a fim de distribuí-los por, pelo menos, cinco lâminas;
- C. aquecer a lâmina até ocorrer a fusão da gelatina;
- D. colocar a lamínula sobre a lâmina, tomando-se o cuidado de deixar esfriar para evitar deformações dos grãos de pólen (Melhem & Matos, 1972);
- E. lutar a lâmina com parafina aplicando-se em um dos lados para que penetre, por capilaridade entre a lâmina e a lamínula envolvendo o pólen e a gelatina. Coloca-se a lâmina para baixo, deixando em contato com o papel de filtro para

que os pólenes sejam depositados junto à lâmina, facilitando as observações ao microscópio;

F. retira-se o excesso de parafina com bisturi e, em seguida, com xilol.

Após a preparação das lâminas, proceder às medições dos grãos de pólen, conforme estabelecido por Erdtman (1952) e Salgado-Labouriau (1973). Essas medidas foram tomadas na Seção de Dicotiledôneas do Instituto Botânico do Estado de São Paulo.

Mensurou-se o diâmetro equatorial em vista polar e diâmetros polar e equatorial da vista equatorial de 25 grãos de pólen tomados ao acaso, distribuídos em três lâminas a fim de uniformizar a amostra, segundo a metodologia de Salgado-Labouriau et al. (1965).

### 3.4.3 Tratamento estatístico

Para 25 medidas dos grãos de pólen, calculou-se a média aritmética ( $\bar{x}$ ), o desvio padrão de média ( $Sx$ ), o desvio padrão da amostra (s), o coeficiente de variabilidade (v) e o intervalo de confiança a 95%. Para 10 medidas, calculou-se apenas a média aritmética.

As comparações entre duas médias foram feitas através da análise do intervalo de confiança (IC) a 95% usando-se o teste de significância "t" a 95%, de acordo com a fórmula citada em HELLER (1968):

$$IC: X \pm Sx \cdot (tn-1)$$

Sendo:

$\bar{x}$ : média aritmética

Sx: desvio padrão da média

N: número de medições

Tn-1: "t" de Student, para n-1 graus de liberdade a 95%

#### **3.4.4 Ilustrações**

Os grãos de pólen preparados para exame em microscopia óptica foram ilustrados através de fotomicrografias obtidas por um fotomicroscópio modelo VANOX, com câmara de exposição automática e com objetivas de 20, 40 e 100x optovar 1,0, 1,25 e 1,5x carregado com filme ASA 32.

#### **3.5 Pulverização do fungicida em campo experimental**

Para averiguação da melhor época de aplicação do fungicida para amenizar o efeito negativo sobre a germinação dos grãos de pólen e seus efeitos fisiológicos, foram realizadas três pulverizações do fungicida de mesmo princípio ativo no município de Barbacena, MG, no sítio Sete Fogões comunidade rural de Senhoras das Dores, de propriedade do senhor José Carlos da Silva. Escolheram-se plantas de uma mesma área que sofreram o mesmo trato cultural na colheita do ano anterior e que aparentemente demonstravam-se sadias, de porte uniforme e próximas entre si.

A primeira aplicação se deu no início da floração, a segunda em plena floração e a terceira no final da floração. Uma parcela foi mantida sem aplicação alguma. Todas as aplicações estiveram de acordo com a recomendação do fabricante. A água utilizada para a aplicação do fungicida teve sua acidez corrigida e aferida para PH 7. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições.

Posteriormente, todas as plantas foram submetidas aos mesmos tratos culturais de irrigação, capina, adubação e pulverizações.

A colheita foi realizada separadamente em caixas de 5kg, de acordo com o amadurecimento dos frutos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUEIRO 'DIAMANTE'

#### 4.1.1 Dimensões de grãos de pólen

Os grãos de pólen de *Prunus persicae* (L.) Batsch são médios, com âmbito triangular, subprolatos, 3-colporados, com endoaberturas lalongadas e estriadas. Em vista polar os grãos de pólen medem ca.  $53,79 \pm 0,8\mu\text{m}$  de diâmetro quatorial e em vista equatorial medem ca.  $46,31 \pm 1,0\mu\text{m}$  de diâmetro polar e ca.  $36,64 \pm 1,1\mu\text{m}$  de diâmetro equatorial.

### 4.2 CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DOS GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUEIRO 'DIAMANTE' SUBMETIDOS À APLICAÇÃO DO ÍON CÁLCIO

#### 4.2.1 Determinação da concentração ideal de cálcio

A primeira parte do experimento consistiu na determinação da concentração de cálcio que expressasse a mais alta porcentagem de grãos de pólen emitidas por seus tubos polínicos (germinação dos grãos de pólen). Consideraram-se germinados aqueles que possuíam tamanho igual ou superior ao diâmetro do grão de pólen (Pasqual; Petri & Matos, 1982). A Foto 1 representa o início da formação do tubo polínico.

A importância da determinação da concentração ideal de cálcio nos processos fisiológicos que envolvem os grãos de pólen está associada à maior porcentagem de germinação que este possa oferecer, garantindo maiores chances de fertilização e, conseqüentemente, maiores frutificações, assim como melhor índice de produção no campo.





Pode-se observar, na Figura 1, que a concentração de cálcio a 200ppm permitiu a mais alta porcentagem de germinação de grãos de pólen, 53,84% do total.

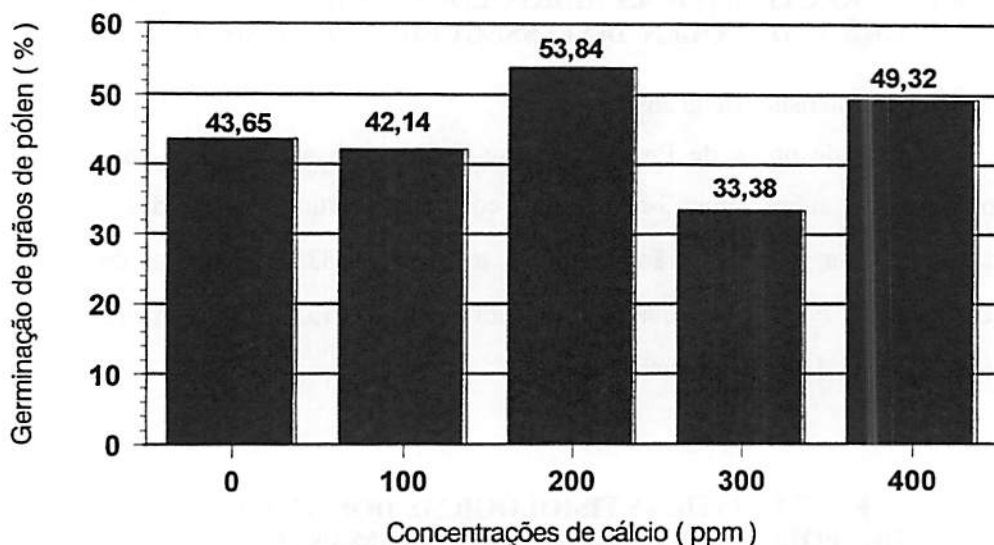


FIGURA 1 Porcentagem de germinação de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' sob diferentes concentrações de cálcio. UFLA, Lavras, MG, 1998.

A mesma Figura 1 evidencia que a presença de cálcio no meio de cultura mostrou-se mais eficiente no processo de germinação dos grãos de pólen que a testemunha. O resultado apresentado pelo histograma da Figura 1 está de acordo com o obtido por Oliveira Júnior (1996) que, utilizando a mesma concentração deste íon (200 ppm de cálcio) obteve melhor resultado de germinação com o pessegueiro 'Aurora'.

O cálcio mostrou-se como agente estimulante para a germinação de grãos de pólen. Este efeito é corroborado pelos resultados obtidos por Kwack & Brewbaker (1963; 1964) e Sahar & Spiegel-roy (1980), os quais citam ser o cálcio importante promotor no processo de germinação de grãos de pólen e no desenvolvimento do tubo polínico.

A resposta do cálcio para germinação e formação do tubo polínico está também de acordo com as afirmações de Brewbaker & Kwack (1963), citados por Sousa (1988), que afirmaram ser o cálcio e boro elementos essenciais para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro*. A alta exigência de cálcio sob a forma de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e sua baixa concentração no interior do pólen confere a este íon a responsabilidade pelo crescimento do tubo polínico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

A partir desse resultado adotou-se a concentração de 200ppm de cálcio para se realizar todos os demais estudos fisiológicos inerentes aos grãos de pólen.

#### **4.2.2 Porcentagem de tubos polínicos estourados**

Na Figura 2 estão representadas as concentrações de cálcio que promoveram a menor porcentagem de tubos polínicos rompidos em sua base terminal.

As concentrações entre 200 e 300 ppm de cálcio exerceram maior efeito sobre a integridade da membrana dos tubos polínicos, 34% e 34,34%, respectivamente, evitando o rompimento da membrana e a liberação de seus metabólitos. Essas mesmas concentrações foram responsáveis também pela melhor expressão do comprimento do tubo polínico. Tal resultado está de acordo com Sousa (1988) que cita a necessidade de uma fonte de carboidrato para o início do processo de germinação e alongamento do tubo polínico. Segundo Akamine & Girolami (1959), tubos polínicos se rompem devido, entre outros fatores, a alta umidade e a variação do meio, ocasionadas pelo aumento da pressão osmótica e da baixa resistência da parede celular. Explica-se assim a alta porcentagem de tubos polínicos rompidos pela testemunha.

O resultado apresentado na Figura 2 está de acordo com Bhowani & Bhatnagar (1974) que atribuem ao cálcio a responsabilidade pela menor variação do meio básico, conferindo menor permeabilidade da membrana do tubo polínico. Fumukoto & Nagai (1982) atribuem a resistência encontrada na membrana do tubo polínico ao efeito cimentante do cálcio ao pectato de cálcio da lamela média. Segundo Poovaiah & Leopold (1976), o cálcio é responsável pela integridade estrutural da membrana que forma a parede celular. Na ausência deste íon obteve-se 60,98% de rompimento das membranas dos tubos polínicos dos grãos de pólen germinados, liberando o conteúdo citoplasmático para o meio exterior (Foto 2 - em anexo). O déficit desse íon causou o rompimento da membrana e a liberação dos metabólitos internos para o meio externo, como observado por Stanley & Linskens (1974), que citam a ocorrência da liberação de organelas na ausência do cálcio.

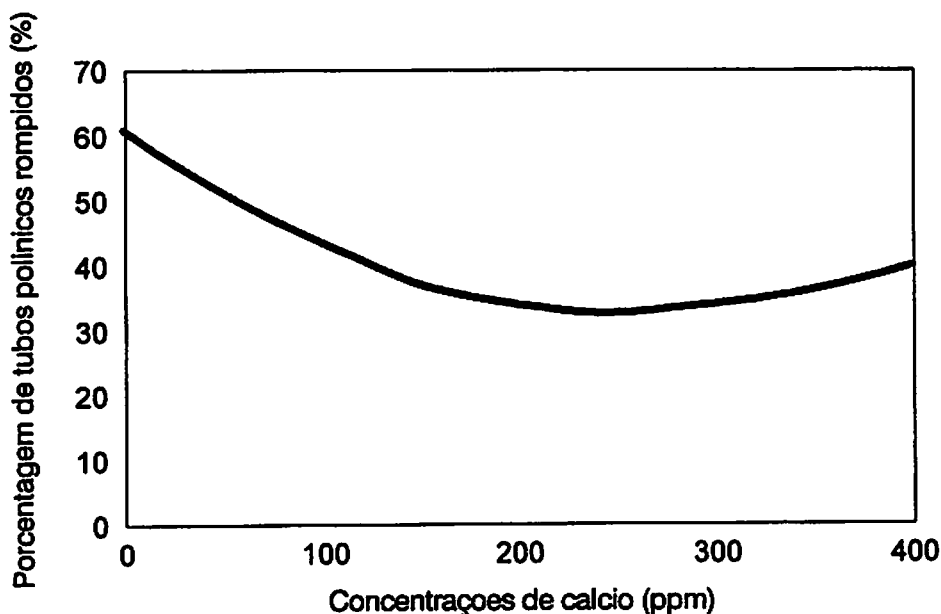


FIGURA 2 Porcentagem de tubos polínicos rompidos de grãos de pólen de pessegueiro 'Diamante'. UFLA, Lavras, MG, 1998.

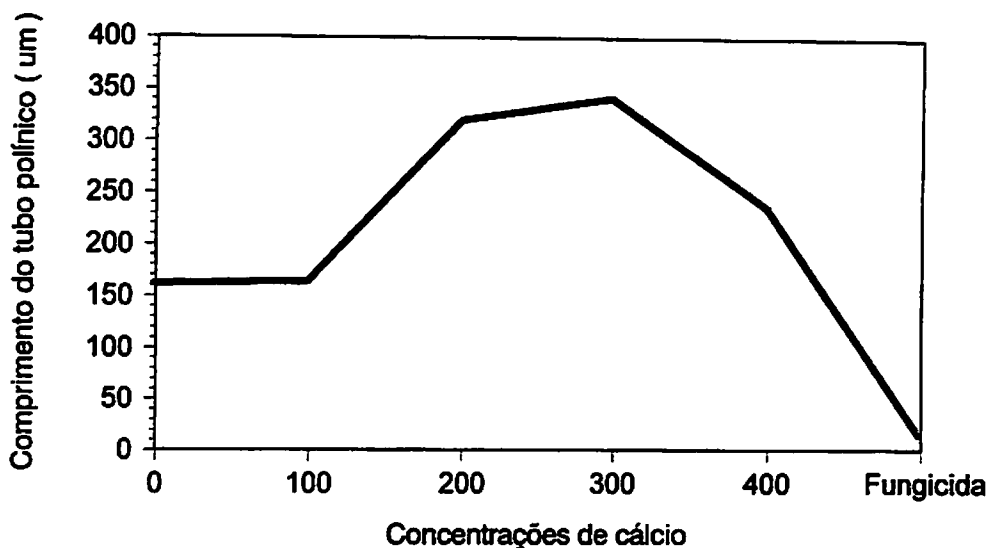
### **4.2.3 Comprimento do tubo polínico**

A Figura 3 evidencia o comprimento do tubo polínico em meio de cultura sob diferentes concentrações de cálcio e a presença do fungicida.

Seu alongamento é favorecido por esse íon que é integrante nas lamelas médias e presente nas membranas, fato confirmado por Poovaiah & Leopold (1985), para os quais o fornecimento contínuo de cálcio permitirá a ativação citológica do complexo CaM-Ca-enzima, possibilitando o alongamento das membranas dos tubos polínicos. Segundo esses mesmos autores, o cálcio é essencial para a integridade da membrana da parede celular como pode-se ver através da Foto 3 (em anexo). O cálcio ainda possui o poder de causar o “efeito de população” pois o quando diluído se difunde em meio aquoso, ficando aderido entre os grãos de pólen, como visto na Foto 4 (em anexo), devendo-se, para facilitar a contagem, ter baixa densidade de população (Foto 5 – em anexo).

Nota-se que a testemunha apresentou o menor comprimento do tubo polínico e, à medida em que se foi adicionando cálcio ao meio de cultura, obtiveram-se maiores comprimentos de tubos polínicos (Fotos 6,7,8,9, e 10 – em anexo). Esse resultado está de acordo com Kwack e Brewbaker (1963), que citam a importância do cálcio como promotor da germinação e alongamento do tubo polínico.

O tratamento com 200ppm mostrou-se superior durante todo o período avaliado. Tal resposta é favorecida pela presença do íon cálcio, por ser o responsável pelo alongamento da membrana dos tubos polínicos. Segundo Fukumoto & Nagai (1982), quando as células crescem, a superfície de contato entre elas aumenta, e por ocasião há necessidade de fornecimento contínuo de cálcio. Esse fato explicaria, então, o crescimento contínuo e de forma constante dos tubos polínicos, em meio básico de cultura contendo cálcio, o que é corroborado pela Figura 4.



**FIGURA 3** Comprimento do tubo polínico de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' sob diferentes concentrações de cálcio e do fungicida a 1500 ppm. UFLA, Lavras, MG, 1998.

#### 4.2.3.1 Comportamento do crescimento do tubo polínico

Durante o período de quatro horas foi analisado o comportamento de crescimento do tubo polínico ( $\mu\text{m}$ ) a cada quinze minutos.

A Figura 4 mostra o comportamento do crescimento do tubo polínico no meio contendo cálcio e no meio na ausência deste íon (testemunha) os quais apresentam-se de forma bastante similar. Os tubos polínicos demonstram comportamento de crescimento análogo, diferindo apenas na intensidade de resposta. O tratamento com cálcio mostrou-se 43,65% superior à testemunha, superioridade atingida logo aos primeiros 15 minutos de exposição e assim mantida até ao final das 4 horas de observação. Assim sendo, pode-se atribuir ao cálcio a responsabilidade de estimular a velocidade de crescimento do tubo

polínico e seu comprimento 24 vezes superior à testemunha logo no primeiro tempo de observação (T1).

Pode-se ainda atribuir a esse íon a constância na velocidade de crescimento do tubo polínico analisado a cada 15 minutos e durante todo o período observado para o tratamento, o que está de acordo com Pierson et al. (1995) que, trabalhando com *Lilium longiflorum* e *Petunia hybrida*, observaram que os tubos polínicos apresentaram crescimento pulsatório e estável, aumentando de tamanho em intervalos de tempos sucessivos a cada 15 segundos. No entanto, a testemunha apresentou-se com comportamento de crescimento lento e variável. Somente ao final de 1 hora (T4) de exposição ao meio básico de cultura houve aumento na velocidade média de crescimento do tubo polínico, passando de  $0,2917\mu\text{m}/\text{minuto}$  na primeira hora pra  $0,7917\mu\text{m}/\text{minuto}$  na segunda hora, ou seja, um aumento de 36,84%.

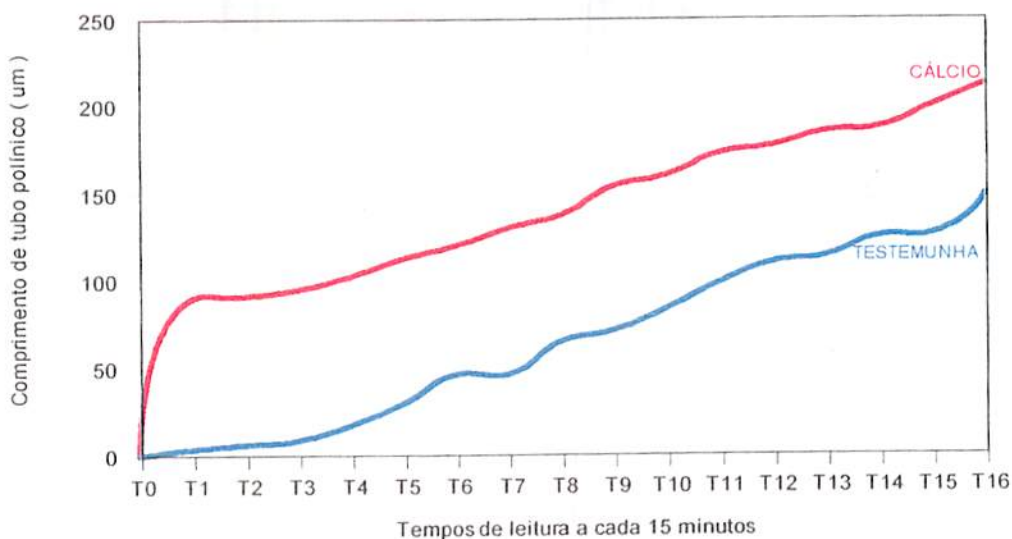


FIGURA 4 - Comprimento do tubo polínico medido a cada 15 minutos em meio de cultura contendo cálcio a 200ppm e da testemunha. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Ao final de todo período de observação (T16) em meio contendo cálcio, o comprimento do tubo polínico do tratamento atingiu 212,91 $\mu$ m 43,65%, superior à testemunha que só atingiu 148,21 $\mu$ m.

No entanto, observou-se que houve um ganho de crescimento maior do tubo polínico para a testemunha do que para o tratamento com cálcio na segunda e terceira hora, como pode ser observado na Figura 5:

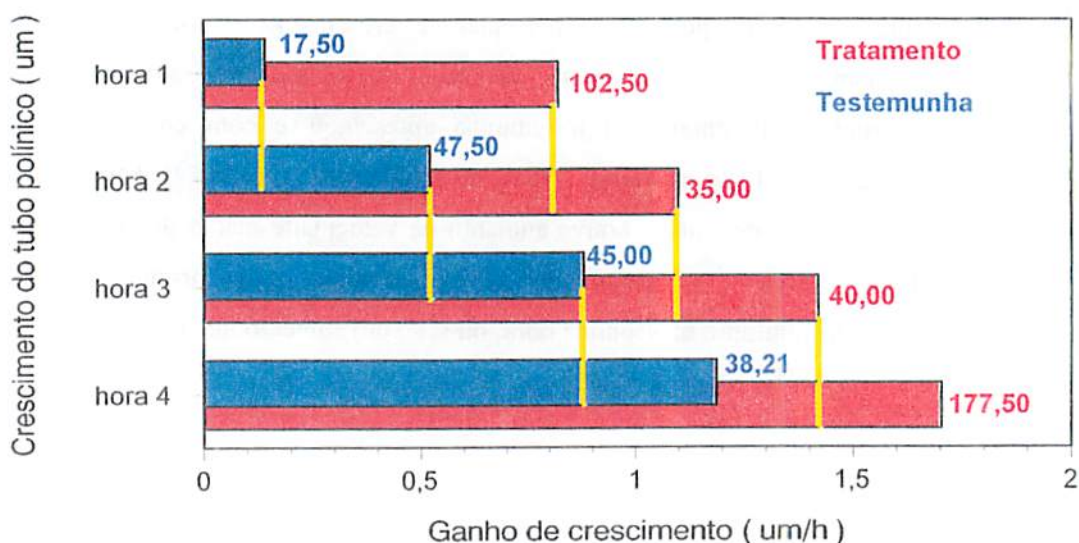


FIGURA 5 - Ganho de crescimento de tubos polínicos de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante', durante 4 horas, em meio contendo cálcio 200ppm. UFLA, Lavras, MG, 1998.

#### 4.2.4 Diâmetro do grão de pólen

Independentemente da concentração de cálcio, o diâmetro dos grãos de pólen não apresentou diferenças significativas para a porcentagem de germinação e porcentagem de tubos polínicos estourados ou comprimento do tubo polínico. Para obtenção das medidas desses grãos de pólen foram tomadas

medidas sem a utilização do método da acetólise, ou seja, mediu-se o diâmetro a partir da câmara clara e o curvímeter.

Pode-se dizer que os grãos de pólen com diâmetros entre  $5,00$  e  $7,50\mu\text{m}$  apresentam-se em condições de maturidade fisiológica e, portanto, aptos a responder a estímulos externos para germinarem na presença ou ausência de cálcio, como pode ser observado na Figura 6.

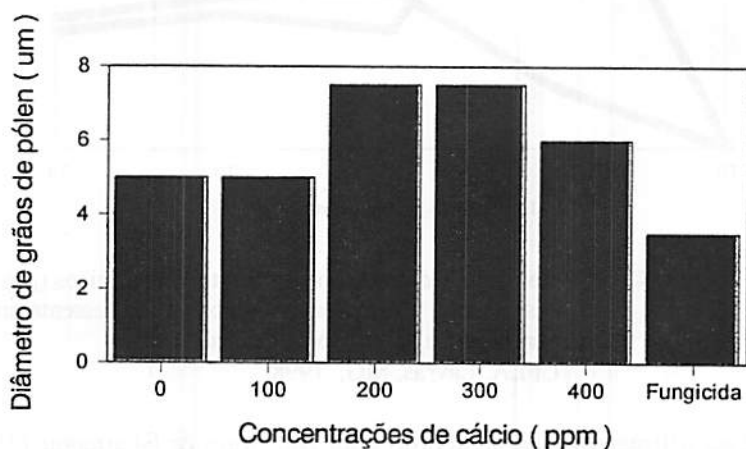


FIGURA 6 - Diâmetro de grãos de pólen em diferentes concentrações de cálcio e 1500ppm do iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998.

#### 4.2.5 Velocidade de crescimento do tubo polínico

O ganho de crescimento para o tratamento com cálcio foi significativo indo de  $35\mu\text{m}$  na segunda hora de observação, para  $40\mu\text{m}$  na terceira hora e depois, para  $35\mu\text{m}$ , novamente. Já o ganho de crescimento para a testemunha apresentou menor variação:  $47,5\mu\text{m}$  na segunda hora  $43,75\mu\text{m}$  na terceira hora e  $38,21\mu\text{m}$  na última hora de observação. Apesar da menor variação ao longo de quatro horas, houve grande variação de velocidade de crescimento a cada



período de 15 minutos analisados, como observa-se na Figura 7. Essa variação não ocorre no tratamento devido a presença do cálcio que mantém o crescimento dos tubos polínicos de forma mais constante.

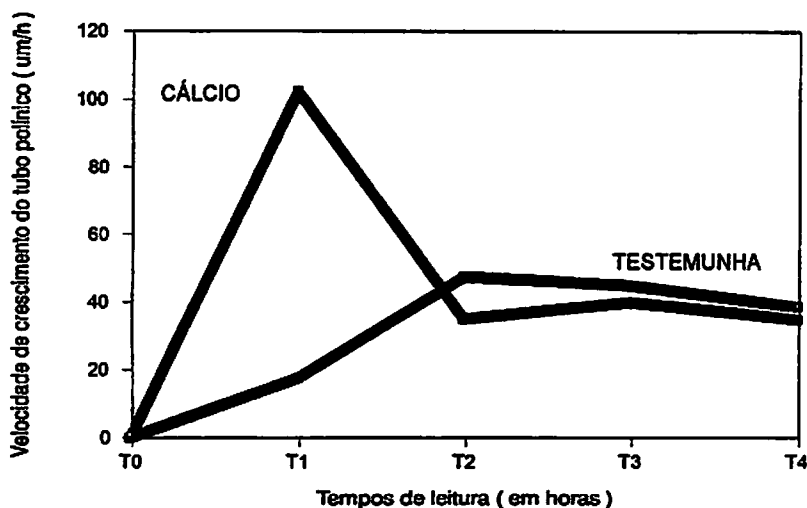


FIGURA 7 Velocidade de crescimento dos tubos polínicos ( $\mu\text{m/h}$ ) do pessegueiro 'Diamante', medidos a cada sessenta minutos num total de quatro horas de observação. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Essa afirmativa está de acordo com Bhojwani & Bhatnagar (1974), que atribuem ao cálcio a capacidade de proporcionar menor variação ao meio básico de cultura. A variação de velocidade pode ser observada através da Tabela 1.

TABELA 1 - Velocidade média de crescimento dos tubos polínicos ( $\mu\text{m}/\text{minuto}$ )

Tratamento	Testemunha
V1= 102,50	V1= 17,50
V2= 35,0 $\Rightarrow \Delta= 67,50$	V2= 47,50 $\Rightarrow \Delta= 30,0$
V3= 40,0 $\Rightarrow \Delta= 5,00$	V3= 45,00 $\Rightarrow \Delta= 2,50$ -
V4= 35,41 $\Rightarrow \Delta= 4,59$ - cte.*	V4= 38,21 $\Rightarrow \Delta= 6,79$ -

\*cte = velocidade constante

A germinação dos grãos de pólen respondeu à presença do cálcio prontamente, emitindo o maior comprimento do tubo polínico e com maior velocidade, como pode-se notar também na Figura 7.

Na primeira hora, os tubos polínicos do tratamento com cálcio atingiram uma velocidade de crescimento da ordem de  $102,5\mu\text{m}/\text{hora}$ , enquanto a testemunha apenas  $17,5\mu\text{m}/\text{hora}$ , ou seja, uma velocidade de crescimento 5,86 vezes maior para o tratamento com cálcio. A partir desse momento, isto é, da primeira hora para a segunda, houve uma diminuição da velocidade para o tratamento e uma aceleração até  $47,5\mu\text{m}/\text{h}$  para a testemunha, quando o crescimento atingiu sua velocidade máxima. A partir da segunda hora, o tratamento com cálcio apresentou pouca variação de velocidade, até estabilizar-se por volta da terceira hora. Sugere-se que essa menor variação de velocidade deve-se à presença do cálcio ao meio de cultura, mas, a testemunha apresentou grande variação de velocidade. Observa-se que os dois gráficos complementam-se, pois onde a velocidade de crescimento é maior, tem-se o maior comprimento de tubo polínico, como pode-se observar comparando-se os gráficos das Figuras 4 e 7.

O fator “velocidade de crescimento” torna-se importante para evitar a desidratação dos grãos de pólen, dos estigmas e ainda dos tubos polínicos, e assim permitir que a fertilização se dê tão logo os núcleos dos tubos polínicos atinjam o ovário e fecundem o óvulo. Quanto mais rápido isso acontecer, maior será a garantia de fecundação e, conseqüentemente, a produção.

### **4.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS GRÃOS DE PÓLEN DO PESSEGUIRO 'DIAMANTE' SUBMETIDOS À APLICAÇÃO DE IPRIDIONE E CÁLCIO**

#### **4.3.1 Efeitos do fungicida sobre a fisiologia dos grãos de pólen:**

Para a terceira parte do experimento foram avaliados todos aspectos fisiológicos inerentes aos grãos de pólen do pessegueiro "Diamante" como: porcentagem de germinação, porcentagem de tubos polínicos estourados, comprimento dos tubos polínicos, velocidade de crescimento dos tubos polínicos e diâmetro dos grãos de pólen.

A análise ocorreu após serem submetidos à aplicação do iprodione (1500 ppm), de acordo com a recomendação do fabricante, isto é, 1500ppm do produto, tendo-se como fator atenuante ao seu efeito o íon cálcio.

#### **4.3.2 Porcentagem de germinação de grãos de pólen**

A Figura 8 mostra a porcentagem de germinação dos grãos de pólen após 12 horas de incubação em BOD a 26°C em diferentes situações. Nota-se que em meio contendo apenas cálcio, atingiu-se 53,84% de germinação contra 27,80% do tratamento cálcio+fungicida, isso porque houve o efeito negativo do fungicida agindo sobre a germinação dos grãos de pólen. Observa-se nessa figura que, em meio absolutamente sem cálcio, obteve-se 43,65% de germinação, índice ainda maior que o tratamento. No entanto, em meio de cultura básico sem cálcio em que foi aplicado fungicida obteve-se 24,24% de germinação. Dessa forma, nota-se, nas Fotos 10 e 11 (em anexo) que o cálcio agiu como fator atenuante ao efeito do fungicida para o índice de germinação.

Essa baixa porcentagem de germinação do tratamento cálcio+fungicida está de acordo com Lacerda (1991), o qual constatou que agrotóxicos como Ethion e Lambfacyhalothrin condicionaram a menor porcentagem de germinação em grãos de pólen de tomateiro.

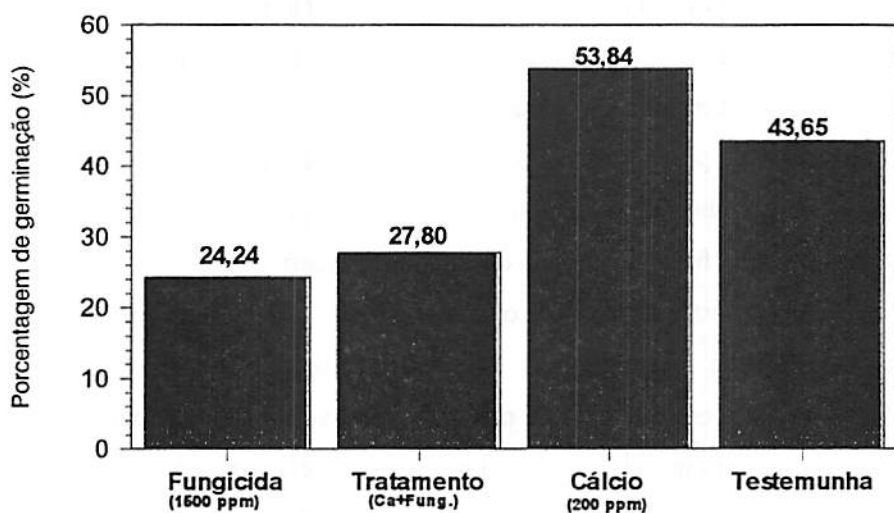


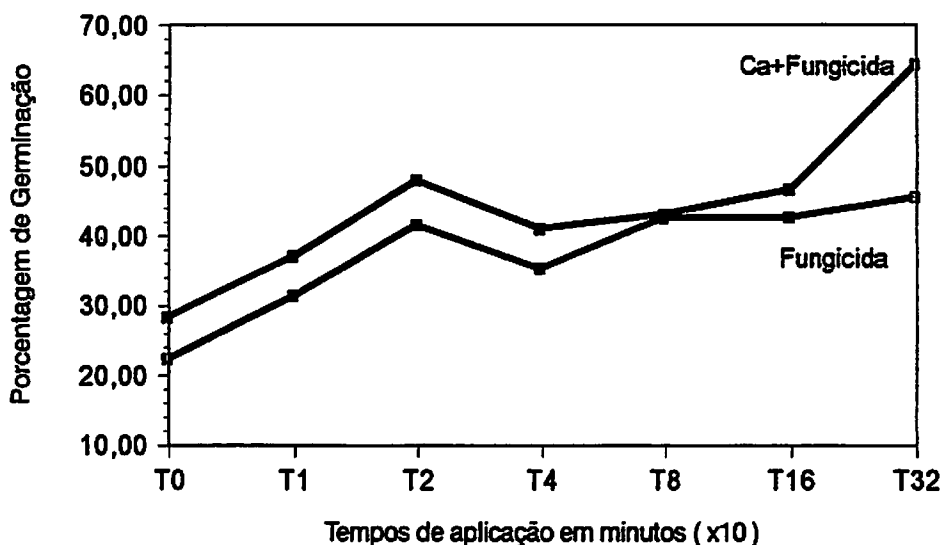
FIGURA 8 Porcentagem de germinação de grãos de pólen de pessegueiro 'Diamante' em diferentes situações. UFLA, Lavras, MG, 1998.

#### 4.3.3 Porcentagem de germinação de grãos de pólen após os tempos (10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos) de aplicação do iprodione.

Foi avaliada a porcentagem de germinação depois da aplicação de fungicida Iprodione com concentração de 1500ppm em tempos de 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos. Os resultados são apresentados na Figura 9, na qual pode-se observar que a porcentagem de germinação do tratamento foi superior à testemunha em todos os tempos de aplicação do fungicida. O gráfico mostra que o cálcio agiu como fator atenuante ao efeito do fungicida sobre a germinação dos grãos de pólen em todos os tempos de observação.

Até os 20 minutos de exposição as linhas representativas da germinação dos grãos de pólen crescerem de formam ascendente, similares e paralelas, tanto para o tratamento como para a testemunha, chegando ambos a um decréscimo aos 40 minutos. Sugere-se que esse decréscimo esteja ligado a fatores fisiológicos dos grãos de pólen. A germinação do tratamento atingiu seu índice máximo, 53,38%, aos 320 minutos, enquanto a testemunha nesse mesmo tempo, atingiu 42,39%. Esse crescimento exponencial do tratamento a partir dos 160 minutos deve-se à longa exposição dos grãos de pólen, ao cálcio presente no meio básico de cultura que favoreceu a germinação e, ainda, a uma possível degradação da composição química do fungicida, o que diminuiu seu efeito.

Pode-se presumir que, até T4, o efeito do meio de cultura para a germinação manteve-se constante nos dois casos diferindo apenas na intensidade de resposta em que havia a presença apenas do cálcio. A partir de T4 passariam a germinar aqueles grãos de pólen que em condições normais de campo, não germinariam, pois necessitariam condições favoráveis de temperatura, umidade e/ou alguma substância química promotora, como o cálcio, boro ou giberelina para germinação.



**FIGURA 9** Porcentagem de germinação de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' após aplicação nos tempos de 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos, de iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998.

#### **4.3.4 Porcentagem de tubos polínicos rompidos após os tempos (0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos) de aplicação de iprodione.**

A Figura 10 apresenta a porcentagem de tubos polínicos estourados quando submetidos ao efeito do fungicida iprodione. Observa-se que a testemunha foi a mais susceptível ao fungicida por possuir o maior porcentagem de tubos polínicos rompidos a cada tempo de pulverização, desde o início (81,38%) até o fim da aplicação (54,67%). O índice de porcentagem de tubos polínicos estourados a cada tempo de aplicação do fungicida, tanto para o tratamento com cálcio como para a testemunha, mostra que tal fenômeno ocorre no momento de sua aplicação e que em ambos os casos ocorre comportamento fisiológico semelhante, sugerindo que, independentemente do tratamento, os grãos de pólen apresentaram o mesmo comportamento fisiológico, diferindo apenas na presença de um

elemento promotor. Quanto maior o tempo de exposição do grão de pólen ao cálcio contido no meio básico de cultura, menor foi a porcentagem de tubos polínicos que tiveram sua região apical rompida.

A Foto 12 (em anexo) mostra os tubos polínicos estourados por ocasião da pulverização com o fungicida e a ocorrência da liberação do conteúdo citoplasmático para o meio. Pode-se atribuir o efeito positivo do cálcio agindo sobre a integridade da membrana dando-lhe maior resistência à ruptura, pois, a porcentagem de tubos polínicos estourados é reduzida em todos os tempos de aplicação, atenuando o efeito do fungicida (Foto 13). A grande variação ocorrida para a testemunha e sua alta porcentagem de tubos polínicos estourados está de acordo com Elezaby et al. (1995), que citam fungicidas como inibidores da germinação e a formação de tubos polínicos, mesmo na presença de reguladores de crescimento. Deduz-se, portanto, que o cálcio foi o responsável por diminuir o efeito de inibição do ingrediente ativo iprodione sobre a membrana dos tubos polínicos.

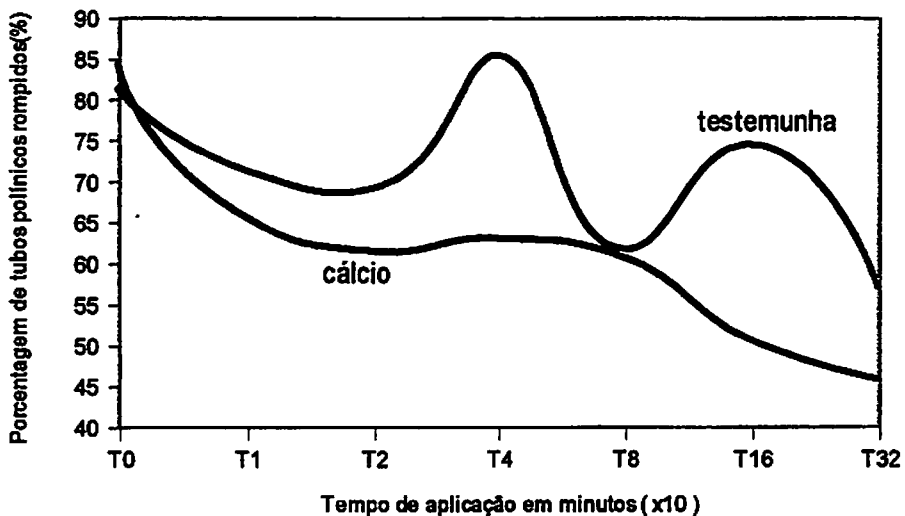


FIGURA 10 Porcentagem de tubos polínicos rompidos em sua extremidade apical após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 minutos de aplicação de iprodione (1500ppm). UFLA, Lavras, MG, 1998.,

#### **4.3.5 Comprimento dos tubos polínicos após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 minutos de aplicação de iprodione.**

Na Figura 11 observa-se o comprimento dos tubos polínicos, após os tempos (0, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 minutos) de aplicação do fungicida (iprodione - 1500 ppm), havendo semelhança no comportamento entre o tratamento e a testemunha, que apresentou-se superior até 160 minutos. No entanto, a partir desse período, esta similaridade passou a demonstrar o mesmo comportamento de crescimento, atingindo seu valor máximo de 61µm.

O crescimento e a formação do tubo polínico para o tratamento com cálcio não apresentaram grandes oscilações, demonstrando que o cálcio exerceu efeito positivo sobre a divisão das células das paredes das membranas de forma contínua. Esse resultado está de acordo com o relatado por Bhojwani & Bhatnagar (1974), que citam a ação do cálcio favorecendo o crescimento do tubo polínico como sendo vigoroso e de aparência rígida. Após os 160 minutos de aplicação do fungicida, observou-se que o comportamento foi o mesmo, tanto para o tratamento com cálcio como para a testemunha, porém, ainda com menor comprimento ao final do tempo avaliação. Pelos baixos valores de comprimento do tubo polínico nota-se que o fungicida inibiu o crescimento daqueles avaliados, sempre no momento de sua aplicação. O mesmo resultado negativo foi obtido por He et al. (1996) que trabalhando com o fungicida Benomyl, observaram a indução à deformação morfológica dos tubos polínicos.



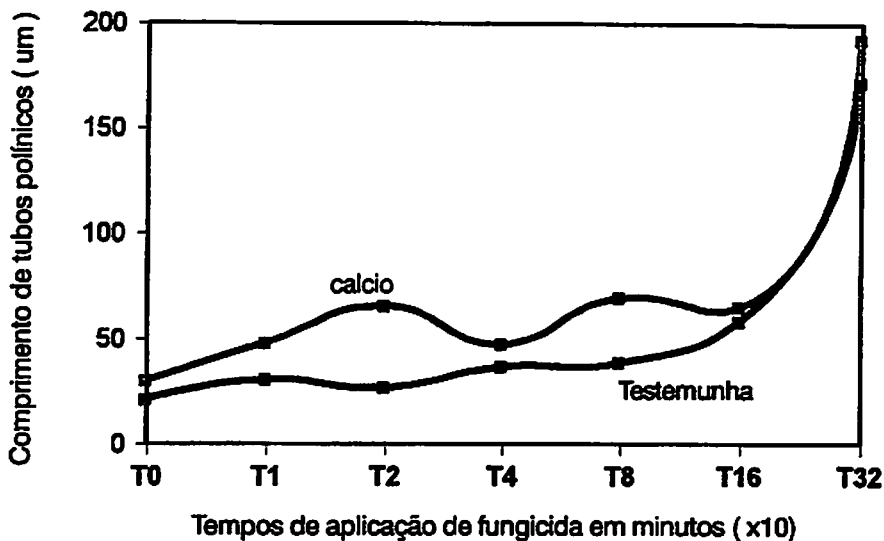


FIGURA 11 Comprimento do tubo polínico após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos de aplicação do iprodione em grãos de pólen do pessegueiro "Diamante". UFLA, Lavras, MG, 1998.

Até os 80 minutos, o tratamento com cálcio e a testemunha apresentaram um índice de crescimento semelhante, entretanto, o tratamento com cálcio apresentou, aos 40 minutos após a inoculação dos grãos de pólen, um decréscimo de comprimento. O mesmo não ocorreu para a testemunha, que se mostrou linear. Esse fato provavelmente está associado a uma amostra ou a um campo amostral cujos os grãos de pólen possivelmente não se apresentaram em condições de maturidade fisiológica para emitirem seus tubos polínicos. Até os 160 minutos, momento em que as placas contendo os grãos de pólen foram pulverizadas com o iprodione a 1500ppm, o tratamento com cálcio apresentou-se superior. Após esse tempo, observa-se que há um aumento substancial no índice de velocidade de crescimento do tubo polínico em aproximadamente 67%, tanto para a testemunha como para o tratamento (0,10mm em 160 minutos). Dessa forma, conclui-se que o fungicida foi fator limitante para o crescimento do tubo polínico até os 160

minutos. Esse resultado corroborando os resultados obtidos por Stanley & Linskens (1974), que observaram alterações na taxa de velocidade de respiração e conversão de ácidos orgânicos. De acordo com a Figura 11, o iprodione influenciou negativamente sobre esses aspectos e sobre o comprimento final dos tubos polínicos. A Foto 14 evidencia esse efeito atenuado pela presença do cálcio. O i.a iprodione inibiu um grande número de grãos de pólen de emitirem seus tubos polínicos. Pode-se notar ainda seu efeito na desintegração da membrana do tubo polínico, onde ocorreu a liberação de seu conteúdo citoplasmático (Foto 15). A ocorrência dessa liberação de conteúdo não permite que ocorra a fertilização, em condições de campo.

A Figura 12 apresenta o efeito do fungicida sobre o comprimento do tubo polínico evidenciando o menor comprimento ( $3\mu\text{m}$ ), em contraste com a testemunha que apresentou-se 10 vezes superior ( $32,5\mu\text{m}$ ). No entanto, quando o íon cálcio foi adicionado ao meio que continha fungicida, pôde-se reduzir seu efeito, permitindo um acréscimo no comprimento do tubo polínico. O cálcio, em concentrações entre 200 e 300 ppm, possibilitou o maior comprimento de tubo polínico ( $212,91\mu\text{m}$ ).

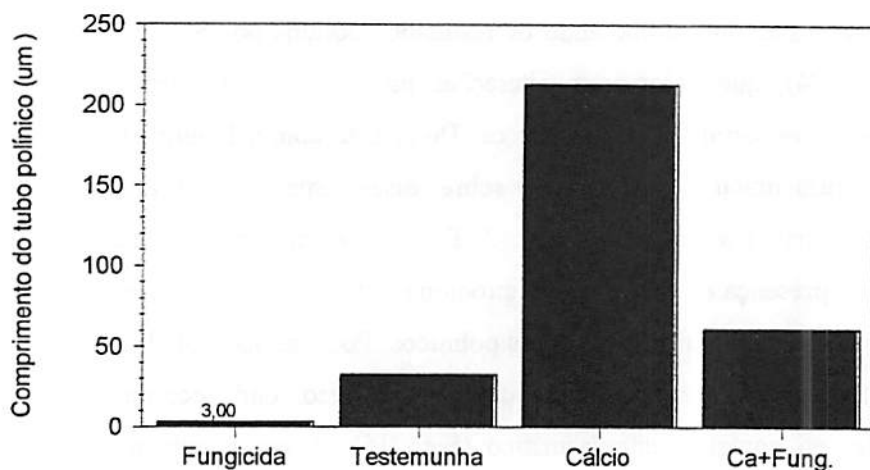


FIGURA 12 Comprimento do tubo polínico de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante' sob o efeito do iprodione, de cálcio e da interação fungicida e cálcio. UFLA, Lavras, MG, 1.998.

#### 4.3.5.1 Comportamento do crescimento do tubo polínico

O crescimento do tubo polínico foi analisado durante o período de 4 horas em placas de Petri contendo iprodione. A Figura 13 evidencia o ganho de crescimento entre o tratamento com cálcio e a testemunha. Tanto para o tratamento com cálcio como para a testemunha, o comportamento mostrou-se bastante similar, diferindo somente na intensidade de resposta. O tratamento com cálcio mostrou-se 65,96% superior ao comprimento da testemunha no primeiro tempo de observação.

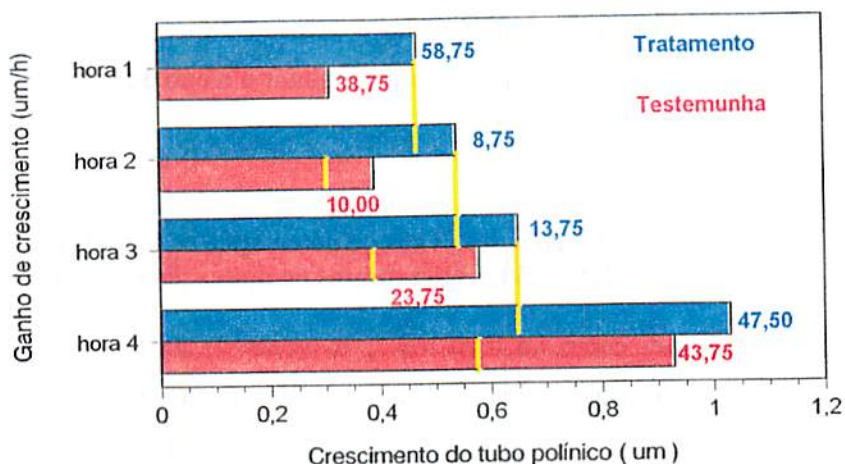


FIGURA 13 Ganho de crescimento do tubo polínico após 4 horas de avaliação de grãos de pólen do pessegueiro 'Diamante'. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Mesmo na presença do fungicida, na primeira hora houve um crescimento visível devido ao vigor do grão de pólen. Porém, a partir da segunda hora, o ganho de crescimento passou a ser menor. No entanto, ao final do período avaliado o ganho foi maior para o tratamento com cálcio. Esse ganho deve-se à presença do cálcio e à possível degradação da composição química do fungicida, pois, a partir da terceira hora de avaliação, o ganho de crescimento tornou-se maior, tanto para o tratamento com cálcio como para a testemunha, atingindo os valores de 128,75um e 116,25um, respectivamente, ao final do período, como pode ser observado pelo histograma da Figura 13. Quando compara-se esse gráfico com o da Figura 5 observa-se que o ganho de comprimento do tubo polínico contendo cálcio (212,91um) foi de 60,47% maior naquele caso, o que atribui-se ao

fungicida como fator limitante para o crescimento do tubo polínico e que o cálcio funcionou como um fator para diminuir o efeito do fungicida.

#### **4.3.6 Diâmetro dos grãos de pólen após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 minutos de aplicação do iprodione**

Assim como no item 4.2.5, os grãos de pólen não apresentaram diferença significativa entre si para o diâmetro que pudesse influenciar sobre os aspectos fisiológicos quanto à germinação, comprimento do tubo polínico, porcentagem de tubos polínicos estourados e velocidade de crescimento do tubo polínico.

A Figura 14 evidencia o diâmetro dos grãos de pólen. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tempos de aplicação do fungicida, tendo sido obtido o mesmo resultado na Figura 6, em diferentes concentrações de cálcio e o fungicida a 1500ppm. Não houve variação significativa entre os diâmetros  $5\mu\text{m}$  e  $7,5\mu\text{m}$ .

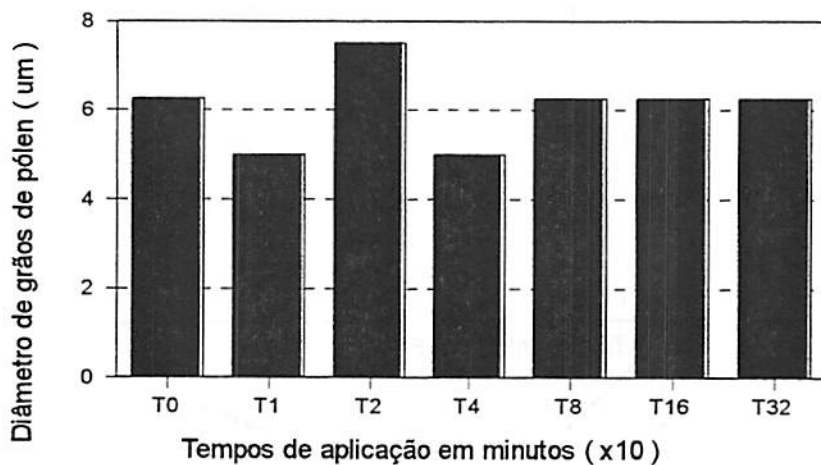
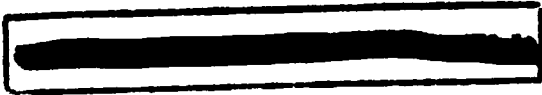


FIGURA 14 Diâmetro de grãos de pólen germinados do pessegueiro 'Diamante' após os tempos 0, 10, 20, 40, 80, 160, e 320 minutos de aplicação do iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998.



#### 4.3.7 Velocidade de crescimento dos tubos polínicos após aplicação do iprodione

A Figura 15 mostra a velocidade de crescimento do tubo polínico durante 4 horas de observação ( $\mu\text{m/h}$ ).

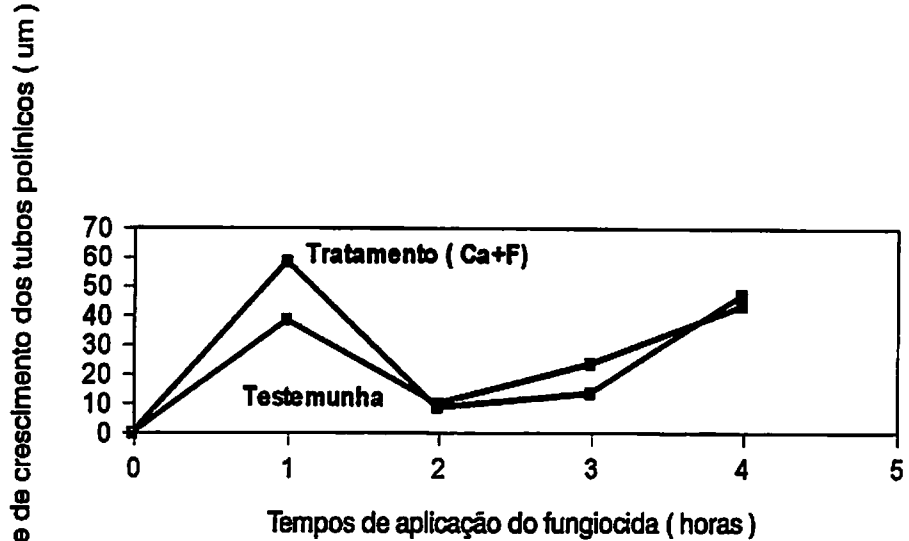


FIGURA 15 Velocidade de crescimento dos tubos polínicos do pessegueiro 'Diamante' após 4 horas de observação mediante aplicação de fungicida iprodione. UFLA, Lavras, MG, 1998.

Tanto para a testemunha como para o tratamento, as duas retas demonstraram um comportamento de velocidade semelhante entre si, mostrando uma resposta análoga, diferindo somente na intensidade. A diferença existente entre ambos é atribuída à ação do fungicida agindo negativamente nos dois casos. Mesmo assim, o tratamento mostrou-se com velocidade de crescimento superior à testemunha.

Após 1 hora de exposição ao meio de cultura com cálcio, observou-se velocidade de  $58,75\mu\text{m/h}$  contra  $38,75\mu\text{m/h}$  da testemunha. Da primeira

hora para a segunda houve um decréscimo na velocidade devido, certamente, ao maior tempo de exposição ao fungicida, e ainda ao efeito do i.a. iprodione. Tal resposta está de acordo com Dhingra (1994) que cita a presença de sais de cloreto e sulfato no meio de cultura que reduziram a respiração em torno de 30 minutos, sugerindo ser essa a razão na redução da velocidade de crescimento do tubo polínico. Após 2,5 horas dá-se o início do crescimento da velocidade, sugerindo que a partir daí o fungicida deixe de atuar efetivamente e ocorra mudança em suas propriedades químicas e degradação em suas moléculas. Assim, os tubos polínicos retomam sua atividade metabólica.

De 2,5 a 3 horas aproximadamente, o tratamento com cálcio+fungicida apresentou velocidade inferior à testemunha o que se deve a fatores fisiológicos, pois o fungicida mostrou-se como fator a limitar o crescimento dos tubos polínicos. Porém, em torno de 3,5 horas os tubos polínicos do tratamento com cálcio cresceram em velocidade maior que a testemunha atingindo sua velocidade final ( $47,5\mu\text{m/h}$ ) em 4 horas de observação. O cálcio atuou como agente atenuante ao efeito negativo do fungicida sobre a velocidade de crescimento dos tubos polínicos. O efeito negativo do fungicida sobre a velocidade de crescimento pode ser observado comparando-se com o gráfico da Figura 7. A velocidade de crescimento dos tubos polínicos inoculados em meio contendo cálcio, mostrou-se superior à testemunha e atingiu velocidade de  $102,5\mu\text{m/h}$  na primeira hora, quase o dobro da observada nesse gráfico.

Observa-se, na Figura 36, que a velocidade de crescimento vai diminuindo com o passar do tempo, até 2 horas, devido à eficiência do princípio ativo do fungicida. Até esse ponto tem-se o menor comprimento dos tubos polínicos. A partir daí, aparentemente, seu princípio ativo começa a decompor-se diminuindo seu efeito e a velocidade de crescimento dos



tubos polínicos passa a aumentar. Nota-se assim, um comportamento semelhante ao gráfico da Figura 21.

A variação de velocidade de crescimento do tubo polínico pode ser observada na tabela 2 abaixo:

**TABELA 2 Velocidade média de crescimento dos tubos polínicos ( $\mu\text{m/h}$ )**

Tratamento	Testemunha
V1= 58,75	V1= 38,75
V2= 8,75 $\Rightarrow \Delta= 50,0-$	V2= 11,25 $\Rightarrow \Delta= 27,50-$
V3= 13,75 $\Rightarrow \Delta= 5,0$	V3= 23,75 $\Rightarrow \Delta= 12,50$
V4= 47,50 $\Rightarrow \Delta= 33,75$	V4= 43,75 $\Rightarrow \Delta= 20,0$

#### 4.4 EFEITOS DAS ÉPOCAS DE PULVERIZAÇÕES DO IPRODIONE SOBRE ASPECTO DA PRODUÇÃO PESSEGUEIRO 'DIAMANTE'

##### 4.4.1 Determinação da época adequada para pulverização do iprodione

A Figura 16 evidencia a produção de frutos em função das épocas de pulverização do fungicida no controle da podridão parda causada pelo fungo *Monillinia fructicola*.

Obteve-se, melhor resultado com as, pulverizações realizadas em plena floração e no fim. Não houve diferença significativa entre essas duas épocas, mas sim entre a testemunha e o início da floração. As pulverizações realizadas em plena floração e ao final dela permitiram maior produção por planta, 39kg e 36kg, respectivamente.

Plantas pulverizadas no início da floração e plantas sem pulverização alguma tiveram produções por planta de 31kg/planta e 27kg/planta, respectivamente.

Esses resultados estão de acordo com os itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.4, pois, como observou-se, o fungicida atuou negativamente sobre a fertilização no início da floração, fase em que os grãos de pólen estão começando a desenvolver-se fisiologicamente para atingir sua maturação. De acordo com a Figura 16, quanto mais tardiamente se fizer a pulverização, mais estará garantida a fertilização, sem com isto comprometer a produção de frutos. Isto porque a porcentagem de germinação dos grãos de pólen será a maior obtida, o comprimento do tubo polínico terá atingido seu comprimento em uma máxima velocidade de crescimento e com a menor porcentagem de tubos polínicos rompidos em sua base terminal. Todos esses fatores associados, interagindo simultaneamente, garantem alta probabilidade de fertilização e, por consequência, produção máxima.

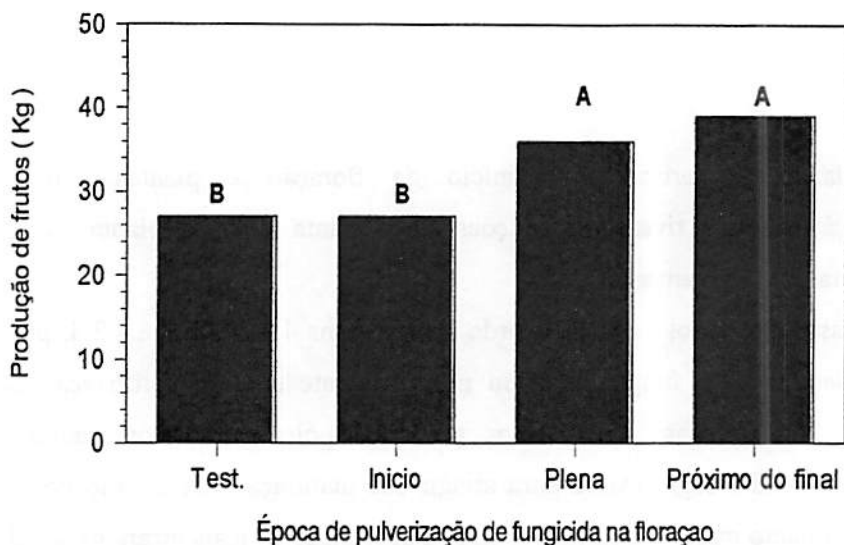


FIGURA 16 Épocas de pulverização do iprodione em plantas de pessegueiro 'Diamante'. UFLA, Lavras, MG, 1998.

## 5 CONCLUSÕES

Foram as seguintes as conclusões obtidas nesse experimento:

- O cálcio mostra-se eficiente em todos os aspectos fisiológicos.
- O fungicida com i.a. iprodione atua negativamente em todos os processos de emissão, formação e desenvolvimento do tubo polínico.
- O cálcio atua como agente atenuante dos efeitos negativos causados pelo fungicida com i.a. iprodione em todos os processos fisiológicos dos grãos de pólen.
- A melhor época para a pulverização com fungicida com i.a. iprodione em condições de campo, é em plena floração e ao seu término.

## ANEXO



Fig.1 - Início do processo de prolongamento da intina -  
Germinação de grãos de pólen;

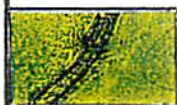


Fig.2 - Rompimento da membrana celular;



Fig.3 - Tubo polínico em meio contendo cálcio,  
evidenciando a integridade e boa  
aparência da membrana;



Fig.4 - Efeito de população;



Fig.5 - Amostra para contagem com poucos  
números de grãos de pólen;



Fig.6,7, 8, 9 e 10 - comprimento do tubo polínico em concentrações de cálcio ( 0, 100, 200, 300, e 400 ppm );



Fig.11 - Germinação com fungicida;

Fig.12 - Germinação fungicida+cálcio;

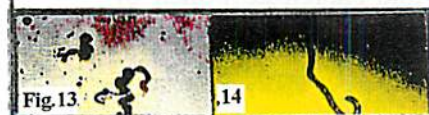


Fig.13,14 - Tubos polínicos sem rompimento  
na presença de cálcio+fungicida;



Fig.15

Fig.16

Fig.16 - Liberação do conteúdo citoplasmático devido ao rompimento  
da membrana da parede celular em meio contendo fungicida.

Fig.15 - Efeito negativo do fungicida sobre o crescimento  
do tubo polínico;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, G. Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. Honolulu: Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii, 1959. 44p. (Technical bulletin, 39).
- BHOJWANI, S. S. & BHATNAGAR, S. P. The Embryology of Angiosperms. New Delhi, Skylark Printers, 1974. 264p.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The calcium ion and substances influencing pollen growth, *in* Linskens, 1964b. (Pollen Physiology and Fertilization Symposium), 1964.
- BREWBAKER, J. L. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. *Amer. J. Bot.*, 54(9): 1069-1083, 1967.
- BRISTOW, P. R. & SHAWA, A. Y. The influence of fungicides on pollen germination and Yield of Cranberry. Washington State University, Pullman. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* V. 106. N.3, p.209-292, 1981.
- BRUNU, V. A. & SHAPA, V. A. Efecto of fungicides on the pollen and physiological indices of peach. *Vinogradarstvo i Vinodelie Moldavii*, v.12, p.38-9, 1984.
- CARVALHO, N. M. de. Sementes: Ciência, tecnologia e produção. 2ª ed. Campinas: Fundação Cargill. Cap.5, p.23, 1983.
- CHIBI, F. & MAITILLA, A. Effect of polyamines and their inhibitors on *in vitro* maturation and germination of mid-binucleate pollen of *Nicotiana tabacum*. Universidad de Granada. Granada, Spain. *Cytobios.* 1.994, v.79, n.318, p.161-167.
- CHICHIRICCO, G.; CAIOLA, M. G. *Crocus sativus* pollen germination and pollen tube growth *in vitro* and after intraspecific and interspecific polination. *Canadian Journal Botany.* v.64(11), p. 2.774-2.777, 1986.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. Edição Andrei 5°. Edição, 448p., 1996.

DHINGRA, H. R.; KAJAL, N.; CHHABRA, S. VARGHESE, T. M. Proline, hydroxyproline, putrescine and pollen tube elongation in chickpea. Haryana Agricultural University, Hisar, India. *Indian Journal of Plant Physiology*. 1995, v.38, n.1, p.90-91.

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, Australian*. 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 aid in lettuce breeding. *Euphytica*, Wageningen, v.32, n.2, p.521-6, jun. 1983.

ERDTMAN, G. An introduction to pollen analysis. *Chronica Botanica*, Waltham, Mass., 239p., 1943.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms. Stockholm: Almqvist & Wiksell. 1.952, 539p.

ERDTMAN, G. The acetolysis Method - a revised description. *Sv. Bot. Tidskr Lund*, 54 (4): 561-564, 1960.

ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy - Angiosperms. New York: Hafner Publishing Company. 553p., 1.971.

FRANKEL, R & GALUN, E. *Pollination Mechanism Reproduction and Plant Breeding*. New York, Springer-Verlag, 1977, 281p.

FUKOMOTO, M. & NAGAI, K. Effects of calmodulin antagonist on the mitochondrial and microsomal  $Ca^{+2}$  uptake in apple fruit. *Plant and Cell Physiol*. 23: 1.435-1.441, 1982.

GENTILE, A. G.; GALLAGHER, K. J. SANTNER, Z. Effect of some formulated insecticides on pollen germination in Tomato and

- Petunia. *Journal of Economic Entomology*, v.64, n.4, p.916-919, 1971.
- GENTILE, A. G.; VAUGHAN, A. W. RICHMAN, S. M.; EATON, A. T. Corn pollen germination and tube elongation inhibited or reduced by commercial and experimental formulations of pesticides and adjuvants. *Environmental Entomology*, v.2, n.3, p.473-76, 1973.
- GENTILE, A. G; GALLAGHER, K. J. Pollen germination and tube elongation in Petunia inhibited or reduced by commercial formalation of pesticides *in vitro*. *Journal of Economics Entomology*, v.65, n.2, p. 488-491, 1972.
- GRILLI CAIOLA, M. A study onpollen grains of *Crocus cartwrightianus* ( Iridaceae ). Universita di Roma "Tor Vergata", Roma, Italy. *Plant Systematics and Evolution*. 1995, v.198: 3-4, p.155-166.
- HAUNOLD, A. & STANWOOD, P. C. Long-term preservation of hop pollen in liquid nitrogen. *Crop Science*, Madison, v.25, n.1, p.194 a 196,1985.
- HE, Y. I.; PALEVITZ, B.A.; WETZSTEIN, H.Y.; HE, Y. Pollen germination, tube growth and morphology, and microtubule organization after expusere to benomyl. *Physiologic Plantarum*. Athens. V. 96, n.1, p.152 – 157, 1996.
- HE, Y.; WETZSTEIN, H.Y; PALEVITZ, B. A. The effects of a triazole fungicide, propiconazole, on pollen germination, tube growth and cytoskeletal distribution in *Tradescantia virginiana*. *Sexual Plant Reproduction*. University of Georgia. v. 8, n.1, p. 210-216, 1995.
- HOEKSTRA, F. A. & WALL, V. D. Dessecaton tolerance of Papaver dubium L. pollen during its development in the anther. *Plant physiol.*, v.88, p.626-632, 1988.
- HYDE, H. A. & WILIAMS, D. A. Palimology. *Nature*, 155:264, 1954.
- KIMURA, P. H.; OKAMOTO, G.; HIRANO, K. Effects of giberellic acid and streptomycin on pollen germination and ovule and seed development in Muscat Bailey A. University Okayama. Okayama. 1996, v.47, n.2, p. 152-156.

- KIRBY, E. G. & SMITH, J. E. Elutable substance of pollen grain walls. In: LINSKENS, H. F. *Fertilization in higher plants*. Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1974. p. 127-30.
- KWACK, B.H. & BREWBAKER, J. L. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. *American Journal Botany*. v.50, p. 859-865, 1963.
- LACERDA, C. A. de; et all. Interferência *in vitro* de agrotóxicos na germinação e no desenvolvimento do tubo polínico do tomateiro, cultivar Santa Cruz Kada. Viçosa, MG. 52p. Dissertação. ( Mestrado em Entomologia ) – Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- LINSKENS, H. F. Pollen physiology and fertilization. Amsterdam: *University of Nijmegen*, p.143-151, 1964.
- LINSKENS, H. F. Pollen as a tool of the plant breeder. *Biol. Zbl.* 196: 3-11, 1987.
- LINSKENS, H. F. & JORDE, W. Pollen transport in groben Hopfen-Beobachtungen Wahend der fahr mit einem Gasballon. *Allergologie*. 9: 55-58, 1986.
- LIVINGSTON, G. K. & CHING, K. K. The longevity and fertility of freeze-dried Douglas-fir pollen. *Silvae Genetics*, Frankfurt, v.16, p. 98-101, 1967.
- MAHER, L. J. JR. Ephedra pollen in sediments of the Great Lakes region. *Ecology*. 45:391-5, 1964.
- MANUAL DE FITOPATOLOGIA. Doenças das plantas cultivadas. Edição Ceres IV. Vol. II, 587p., 1980.
- MARINOS, N. G. Studies on sub-microscopic aspects de mineral deficiency. J. calcium deficiency in the shoot apex of barley. *Amer. J. Bot.* V. 49, p.834-841, 1962.
- MARTINS, M. E.; PRERA, L. E. H.; KAGEYAMA, P. Y. Manejo e pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. *Circular técnica. IPEF*, Piracicaba, v.128, p.1-8, 1981.



- MATOS, M. E. R.; MELHEM, T. S. Pollen grains of plants of the "Cerrado" XIV - Labitae. *An Acad. Brasileira de Ciências*. 38 (2): 315-326, 1966.
- MATTHEWS, F. R. & KRAUS, J. Pollen storage. In: USDA FOREST SERVICE. *Pollen Management Handbook*. Washington, 1981. P.37-9.
- MELHEM, T. S. & MATOS, M. E. R. Variabilidade de forma nos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. - Labiatae. Hoehnea, São Paulo. V.2, 1.972, p.1-10.
- MELHEM, T.S. & SALGADO-LABOURIAU, M.L. Pollen grains of plants of the "Cerrado" V - Leguminosae - Caesolpinodae. *Rev. Brasileira Biol.*, 23 (4): 369-387, 1973.
- MELHEM, T. S. Palinologia - Suas aplicações e perspectivas no Brasil. Coleção Museu Paulista, Série Ensaios. Separata - Fundo de Pesquisas do Museu Paulista. 336-350p. vol .2, 1978.
- OLIVEIRA JÚNIOR, ARNALDO FREITAS 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, Curitiba, PR.,1996. *Anais*. p.419,
- OLIVEIRA JÚNIOR, ARNALDO FREITAS 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. Lavras, MG. 1995. *Anais*. p. 117.
- PASQUAL, M.; PETRI J. L.; PEREIRA, A. J. Polinização da macieira. I. cultivar Golden Delicious. *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, v. 16, n.2, p. 242-252, mar. 1981.
- PASQUAL, M.; PETRI, J. L.; MATTOS, C. S. Polinização da macieira. III. Cultivares BR-1 e Mollie's Delicious. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.17, n.10, 1.477-1481, out. 1.982.

- PALIYATH, G. & POOVAIAH, B. W. Identification of naturally occurring calmodulin inhibitors in plant and their effects on calcium- and salmodulin-promoted protein phosphorylation. *Plant and Cell Physiol.* 26:201-209, 1985.
- PFAHLER, P. L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays*) pollen. 1. Calcium and born effects. *Can. J. Bot.*, v.45, p.839-845, 1967.
- PFAHLER, P. L. *In vitro* germination characteristics of maize pollen to detect biological activity of environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* 37, 125, 1981.
- PHILOMENA, P. A.; DAVID, B. V. Effect of pesticides on *in vitro* pollen germination and growth and yield of okra. *Current Science*, v. 54, n. 9270928, 1985.
- PIERSON, E. S.; LI, Y. Q.; ZHANG,H.Q.; et al. Pulsatory growth of pollen tubes: investigation of a possible relationship with the periodic distribution of cell wall components. Siena, Italy. *Acta Bot. Neerl.* 44:2, p.121-128, june, 1995.
- POOVAIAH, B. W. & LEOPOLD, A. C. Deferral of leaf senescence with calcium. *Plant phisiology.* V. 58, p182-185, 1976.
- RAMOS, J. D.; OLIVEIRA JÚNIOR, ARNALDO FREITAS 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. Curitiba, PR., 1996. *Anais.* p.49.
- RASEIRA, M. do C. B. Influência da temperatura sobre a germinação do pólen e alongação do tubo polínico em pessegueiro. *Rev. Bras. Frutic.*, Cruz das Almas, v.14, n.1, p. 177-180, 1992.
- REIS, S. M. Germination of apple pollen as influenced by fungicides. *Fruit Varieties Journal*, v.32, n.1, p.1206, 1978.
- REMPE, H. Palynological evidence onearly diferentiation of angiosperm. *Biol. Rev.* 15: 117-150, 1970.

- REMPE, H. Untersuchungen über die Verbreitung des Blutentaubes durch die Luftströmungen. *Plant.* V.27, p. 93-147., 1937.
- SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P. Citrus pollen storage. *Hortscience*, St Joseph, v. 15, n.1, p. 81-82, february, 1980.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L. Contribuição à palionologia dos Cerrados. Rio de Janeiro: Edit. *Acad. Brasil. Ciências.* p. 1-17, 1973.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L.; VANZOLINI, P. E. & MELHEM, T. S. Variation of polar axes and equatorial diameters in pollen grains of two species of *Cassia*. *Grana Palynol.*, Stockholm, v.6, n.1, 1.965, p.166-176.
- SAWIDIS, T. & REISS, H. D. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. University de Thessaloniki, Greece. 1995, v.185: 3-4, p. 113-122.
- SHIVANNA, K. R. & HESLOP-HARRISON, J. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of flourochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v.67, n.4 p.367-75, 1981.
- SHYAM, P. G.; LOGISWARAN,G.; PRASSAD. G.S. Influence of some pesticides on pollen germination and tube growth in brinjal. *Journal of the Andaman Science Association*. India. V.8, n.1, p. 161-162, 1992.
- SILVA, M. M. da. Influência de abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação do pólen do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flvicarpa* Deg.) Mairon Moura da Silva – Viçosa: UFV, MG., 59p., Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SILVESTRE-CAPELATO, M. S. F. Palinologia das leguminosae da reserva biológica do Parque Estadual da Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP. 187p., 1993. (Tese de Doutorado).

- SNYDER, E. B. & CLAUSEN, K. E. Pollen handling. In: USDA FOREST SERVICE. Seeds of Wood Plants in the United States. Washington, 1974. p.75-97.
- SOUSA, VALDEREZ APARECIDA de. Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp. Piracicaba: ESALQ, 1988, 155p., (Tese de mestrado).
- SOUTHERLAND, J. R.; WOODS, T. A. D.; MILLER, G. E. Effect of selected insecticides and fungicides on germination of Douglas-fir and white spruce pollen. *Tree Planter's Notes*, v.35, n.1, p.22-24, 1984.
- SPRAGUE, J. R. & JOHSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14, Gainesville, 1977. Proceeding. Macon, Eastern Tree Seed, 1977. p.20-7.
- STAINER, R. Pollination and fertilization. *Obstbau Weinbau*, v.23, n.2, p.40-2, 1986.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. Pollen-Biology Biochemistry Management Springer Berlin heidelberg. New York. 1974.
- SUREENA, C.; NIRMAL, K.; DHINGRA, H. R.; VARGHESE, T. M.; CHHABRA, S.; KAJAL, N. Haryana Agricultural University, Hisar, India. *Indian Journal of Plant Phisiology*, v.38, n.2, p.168-170, 1995.
- VASIL, I. K. Effect of boron on pollen germination and pollen tube growth. Pollen physiology and fertilization. Amsterdam: *University of Nijmegen*. p. 107-119, 1964.
- WEISS, J.; NERDI, A.; MIZRAHI, Y. Flowering behavior and pollination requeriments in climbing cacti with fruit crop potencial. Bem-gurion University of the Negev, Israel. 1.994, v.29, n.12, p.1487- 1492.
- WETZSTEIN, H. Y. Loss of stigma and inhibition of pollen germination follwing fungicide and insecticide applications in pecan. *HortScience*, v. 24, n5, p.748, out. 1989.

**WODHOUSE, R. P. Pollen grains. N.Y., McGraw Hill, 123 figs.,  
574p., 1935**