

# ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA GERMINAÇÃO DE PÓLEN DE *Musa velutina* H. WENDL. & DRUDE

## ESTABLISHMENT OF PROTOCOL FOR GERMINATION OF *Musa velutina* H. WENDL. & DRUDE POLLEN

MAURÍCIO REGINALDO ALVES DOS SANTOS<sup>1</sup>; MARIA DAS GRAÇAS RODRIGUES FERREIRA<sup>2</sup>;  
JOSILENE FÉLIX DA ROCHA<sup>3</sup>; ARÊSSA DE OLIVEIRA CORREIA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador - Doutor em Agronomia - Embrapa Rondônia - Cx. Postal 127 - 76815-800 - Porto Velho, RO - mauricio@cpafro.embrapa.br;

<sup>2</sup>Pesquisadora- Doutora em Produção Vegetal- Embrapa Rondônia - Cx. Postal 127 - 76815-800 - Porto Velho, RO - mgraca@cpafro.embrapa.br

<sup>3</sup>Graduanda em Ciências Biológicas - Bolsista PIBIC/CNPq - Embrapa Rondônia - Cx. Postal 127 - 76815-800 - Porto Velho, RO - josifelixrocha@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Mestranda em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente - Universidade Federal de Rondônia - BR 364, km 9,5 - 78900-000 - Porto Velho, RO - aressa\_oliveira@yahoo.com.br

### RESUMO

A formulação do meio de cultura adequado para a germinação de grãos de pólen é um ponto básico a ser observado na fertilização *in vitro*. A bananeira ornamental, *Musa velutina* H. Wendl. & Drude, da família Musaceae, é uma espécie de grande potencial comercial. Neste Trabalho, objetivou-se a determinação de meios de cultura adequados para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*. Grãos de pólen foram coletados no momento da antese e imediatamente inoculados em placas de Petri com 10,0 mL de meio de cultivo sólido, contendo concentrações variáveis de sacarose, ácido bórico e nitrato de cálcio e com diferentes níveis de pH. Foram conduzidos quatro ensaios, variando-se o pH e as concentrações dos componentes do meio de cultura. A maior porcentagem de germinação foi obtida com o pH 6,0 (24%). Para o ensaio com sacarose obteve-se maior porcentagem de germinação na concentração de 50 g L<sup>-1</sup>, com 41% de germinação. Nos testes com ácido bórico, a germinação atingiu 51% na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup>. Em relação às concentrações de nitrato de cálcio testadas, observou-se maior germinação (80%) com 400 mg L<sup>-1</sup>. A combinação do pH 6,0 com 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico e 400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio resulta em 80% de germinação dos grãos de pólen de *M. velutina*.

**Termos para indexação:** Viabilidade de pólen; tubo polínico; bananeira ornamental.

### ABSTRACT

The determination of the adequate medium for pollen grain germination is essential for the *in vitro* fertilization. The ornamental banana tree, *Musa velutina* H. Wendl. & Drude, belongs to the Musaceae family and is a species with great commercial potential. The objective of this work was the determination of adequate medium characteristics for the establishment and *in vitro* germination of *M. velutina* pollen grains. Pollen grains were collected at the moment of anthesis and immediately inoculated in Petri dishes with 10.0 mL of solid medium, supplemented

with variable concentrations of sucrose, boric acid and calcium nitrate at different levels of pH. Four experiments were carried out varying pH and concentrations of these components of the medium. The highest percentage of germination was achieved with pH 6.0 (24%). In the test with sucrose, a higher percentage of germination was obtained by the concentration of 50 g L<sup>-1</sup>, with 41% of germination. In the test with boric acid the germination reached 51% at the concentration of 300 mg L<sup>-1</sup>. In relation to the tested calcium nitrate concentrations, the highest germination (80%) was observed using 400 mg L<sup>-1</sup>. The combination of pH 6.0, 50 g L<sup>-1</sup> sucrose, 300 mg L<sup>-1</sup> boric acid and 400 mg L<sup>-1</sup> calcium nitrate results in 80% germination of the *M. velutina* pollen grains.

**Index terms:** Pollen viability; pollen tube; ornamental banana tree.

### INTRODUÇÃO

A polinização e a fertilização *in vitro* têm sido usadas na recuperação de híbridos, que apresentam mecanismos de incompatibilidade sexual, impedindo a hibridação natural entre espécies. A polinização *in vitro* envolve a associação íntima entre óvulos e grãos de pólen, eliminando, assim, barreiras de incompatibilidade que porventura estejam no estigma, estilete ou ovário e, nesse processo, a formulação do meio de cultura adequado para a germinação dos grãos de pólen e o desenvolvimento dos óvulos em sementes são pontos básicos a serem observados (TORRES et al., 1998).

A germinação do grão de pólen consiste na emissão do tubo polínico. Sendo um organismo altamente reduzido, o pólen executa funções especializadas para gerar e

(Recebido em 29 de outubro de 2009 e aprovado em 08 de setembro de 2011)

transportar as células espermáticas até o óvulo (DAI et al., 2006). Quando o grão de pólen entra em contato com o estigma, absorve a secreção deste e germina, desenvolvendo o tubo polínico. O tubo cresce por meio do estilete, até atingir o óvulo, onde libera as duas células espermáticas. Uma dessas células fecundará o óvulo, dando origem ao zigoto diplóide. A outra se une aos núcleos polares, dando origem ao endosperma (TAIZ & ZEIGER, 2006).

A composição do meio e o pH estão entre os fatores que afetam a germinação *in vitro*. Os grãos de pólen das angiospermas invariavelmente precisam de uma fonte de carbono, de boro e, frequentemente, de outros nutrientes para promovê-la (BOAVIDA & MACCORMICK, 2007).

O açúcar empregado no meio de cultura tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de cultura e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico, sendo a sacarose, o açúcar mais utilizado, pelo fato de ser a principal forma de transporte de fotoassimilados entre fonte e dreno nas plantas superiores (HACKEL et al., 2006).

A adição de cálcio ao meio de cultura para germinação de grãos de pólen propicia características fisiológicas como tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do mesmo com forma linear e aparência rígida. Essa relativa estabilidade do grão de pólen e do tubo polínico é essencial, pois o grão de pólen, uma vez liberado da antera, age como uma unidade funcional independente (KAKANI et al., 2005). O conhecimento do início da emissão do tubo polínico e de sua estabilização em trabalhos de palinologia é de grande importância, pois permite determinar o tempo ideal para avaliação dos testes de viabilidade após a inoculação (KASI et al., 2008).

O pH é um fator muito importante no meio de cultura, pois além de influenciar na disponibilidade de nutrientes e fitorreguladores, interfere no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002). Segundo Pio et al. (2006), o pH é importante nos processos fisiológicos envolvidos na germinação dos grãos de pólen e pode estar associado à

porcentagem de germinação que estes possam oferecer, influenciando nas chances de fertilização e, consequentemente, nas frutificações e na produção no campo.

A bananeira ornamental (*Musa velutina* H. Wendl. & Drude) é uma espécie da família Musaceae. É um arbusto perene, de textura herbácea, ereta, entouceirada, rizomatosa, com folhas largas, de cor verde-brilhante, lisas com pecíolos longos. Sua inflorescência é ereta, curta, disposta no ápice do pseudocaule, com brácteas róseas. Tanto a planta quanto a sua inflorescência têm amplo uso ornamental, tornando-se uma espécie de interesse econômico (LORENZI & MELO FILHO, 2001).

Neste trabalho, objetivou-se a determinação de meio de cultura adequado para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Musa velutina*, sendo esta a etapa inicial do processo de fertilização *in vitro*.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados grãos de pólen de flores de *M. velutina*, no momento da antese, às 6 h 30, a partir de plantas cultivadas em casa de vegetação no campo experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho (8°45'43"S, 63°54'14"W). Esses grãos de pólen foram imediatamente inoculados em placas de Petri, contendo 10,0 mL de meio de cultivo sólido, com concentrações variáveis de sacarose, ácido bórico e nitrato de cálcio e diferentes níveis de pH. A incubação foi feita a 24±1°C, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia. Foram conduzidos quatro ensaios, variando-se o pH e as concentrações dos componentes do meio de cultura, conforme demonstrado nas Tabelas 1 a 4.

As observações foram realizadas em intervalos de uma hora, com auxílio de um estereomicroscópio, com aumento de 80 x, até 12 horas. A partir de então, começou a ocorrer degeneração dos tubos polínicos. Todos os ensaios foram realizados com quatro repetições (placas de Petri) por tratamento, avaliando-se 100 grãos de pólen em cada placa. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ .

**TABELA 1** – Ensaio 1 - composição do meio de cultivo utilizado para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando o pH do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	100,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	200,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	600,0
pH	4,0; 5,0; 6,0 e 7,0

**TABELA 2** – Ensaio 2 - composição do meio de cultivo utilizado para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando a concentração de sacarose do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	0,0; 50,0; 100,0; 150,0 e 200,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	200,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	600,0
pH	6,0*

\*pH que resultou em maior porcentagem de germinação no ensaio 1.

**TABELA 3** – Ensaio 3 - composição do meio de cultivo utilizado para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando a concentração de ácido bórico do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	50,0*
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,0; 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	600,0
pH	6,0

\*Concentração de sacarose que resultou em maior porcentagem de germinação no ensaio 2.

**TABELA 4** – Ensaio 4 - composição do meio de cultivo utilizado para o estabelecimento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, variando a concentração de nitrato de cálcio do meio.

Reagentes	Concentrações
Agar (%)	8,0
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	50,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	300,0*
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	0,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0
pH	6,0

\*Concentração de ácido bórico que resultou em maior porcentagem de germinação no ensaio 3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

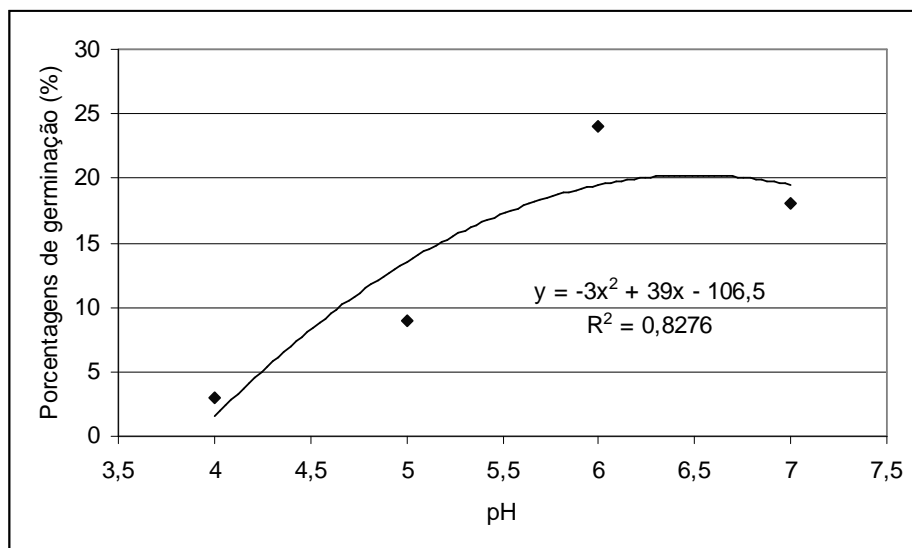
A germinação dos grãos de pólen de *M. velutina* foi gradualmente aumentada, do ensaio 1 ao 4, com a adequação crescente das condições de cultivo.

O pH teve efeito considerável sobre a germinação dos grãos de pólen. O pH 6,0 apresentou porcentagem de germinação de 24%, enquanto que, nos pH 7,0, 5,0 e 4,0 foram observadas porcentagens de germinação de 18, 9 e 3%, respectivamente (Figura 1).

O mesmo foi observado por Silva et al. (1999), que testaram a germinação de grãos de pólen de maracujazeiro com concentrações de 12,5 a 300,0 g L<sup>-1</sup>, e obtiveram a maior germinação, em torno de 47%, com a utilização de 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Resultados diferentes foram obtidos por Kobayashi et al. (1991) em estudos com um híbrido de *Citrus sinensis x Poncirus trifoliata* (Benton [citrange], Winter Haven, FL), obtendo germinação máxima de 50% em meio de cultura com 200 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O mesmo foi observado por Dantas et al. (2005), que utilizaram concentrações entre 0 e 500 g L<sup>-1</sup> de sacarose na germinação de grãos de pólen de macieira (*Malus domestica* Borkh.), observando maior germinação na faixa entre 150 e 250 g L<sup>-1</sup>.

Esses resultados são similares aos obtidos por Pio et al. (2006), que testaram a germinação de grãos de pólen de três variedades de citros em pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5, obtendo a maior porcentagem de germinação, em torno de 12%, com pH 6,5. Esses autores mencionam que o pH estimula marcadamente o processo de germinação. Cuchiaro et al. (2008) observaram que a cultivar IAC-226 apresentou a maior germinação polínica, de 76%, em pH 6,0. Kasi et al. (2008) observaram aumento na porcentagem de germinação em grãos de pólen de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), à medida que se aumentava o pH do meio de cultivo, até o máximo valor testado, de 6,5. Chagas et al. (2006) observaram que o melhor nível de pH do meio de cultura para maximizar a germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarineiras [*Prunus persica* (L.) Batsch] foi de 6,5.

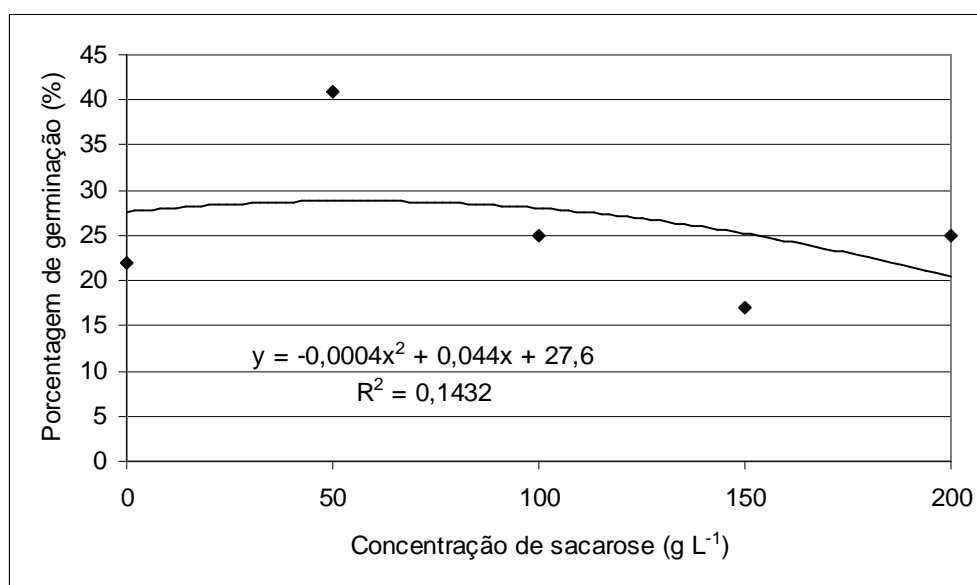
Utilizando o pH 6,0 (resultado de maior germinação no primeiro ensaio), foram então testadas cinco concentrações de sacarose. A maior porcentagem de germinação obtida foi de 41%, concentração de 50 g L<sup>-1</sup>, enquanto que, nas concentrações de 100, 150 e 200 g L<sup>-1</sup>, obteve-se 25, 17 e 25% de germinação, respectivamente. A ausência de sacarose no meio resultou em 22% de germinação (Figura 2).



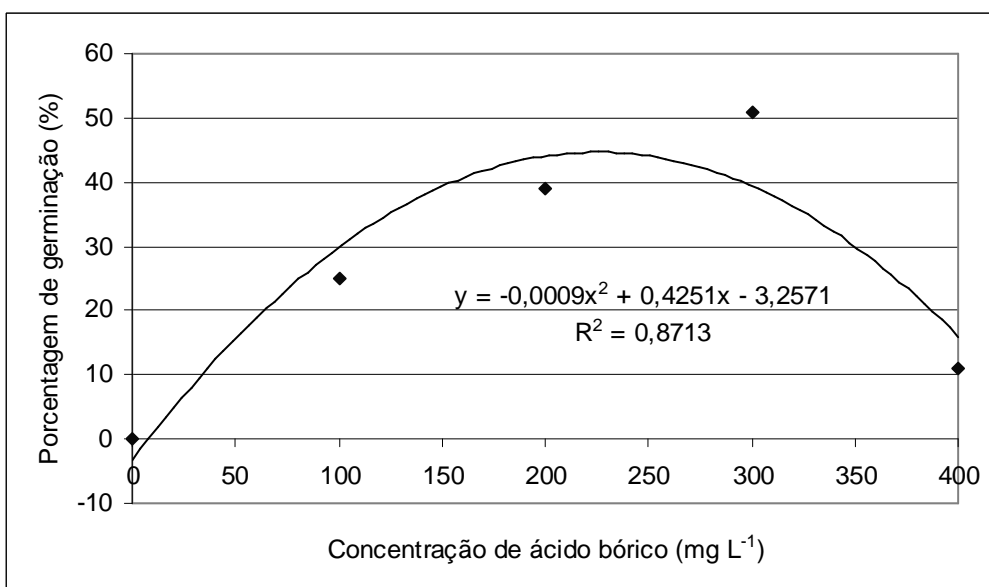
**FIGURA 1** – Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em meio de cultura com diferentes pH, após 12 horas de cultivo. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

No terceiro ensaio, observou-se o efeito de concentrações de ácido bórico na germinação de grãos de pólen, onde se observou que a germinação foi crescente, a partir da ausência de ácido bórico, onde não houve

germinação, até atingir 51% na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup>. Nas concentrações de 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> obteve-se 25 e 39% de germinação. A concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico resultou em apenas 11% de germinação (Figura 3).



**FIGURA 2** – Porcentagens de germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, após 12 horas de cultivo. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.



**FIGURA 3** – Porcentagens de germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em meio de cultura com diferentes concentrações de ácido bórico, após 12 horas de cultivo. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

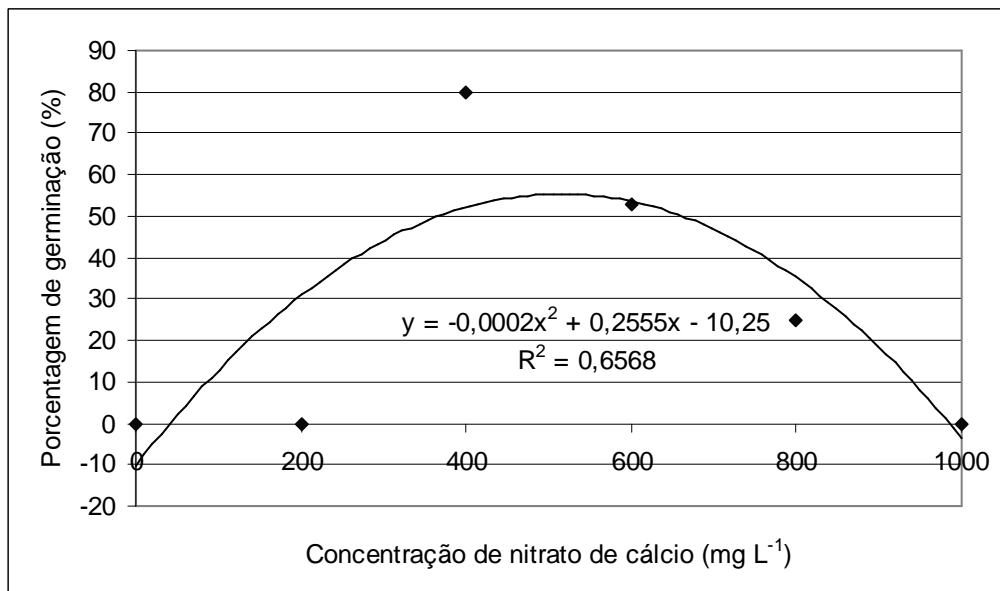
Esses resultados diferem um pouco dos obtidos por Pio et al. (2004), que avaliaram concentrações de ácido bórico de 0 a 800 mg L<sup>-1</sup>, na germinação de pólen de três variedades de citros, obtendo a maior porcentagem com a concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>, para duas variedades. Silva et al. (1999) utilizaram concentrações de 50 a 200 mg.L<sup>-1</sup> de ácido bórico na germinação de pólen de maracujazeiro (*Passiflora* spp.), observando a maior germinação com a concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>. Parton et al. (2002), estudando a germinação de pólen em bromeliáceas concluiu que o meio contendo 10 g.L<sup>-1</sup> de ácido bórico apresentaram os melhores resultados. No trabalho de Dantas et al. (2005), a ausência ou presença de ácido bórico a 40 mg L<sup>-1</sup> no meio não afetou a germinação de grãos de pólen de macieira (*Malus domestica* Borkh.).

Corroborando com o presente trabalho, Nyomora et al. (2000) observaram que a aplicação de boro foliar em amêndoas (*Amygdalus communis* L.) reduziu a ruptura dos tubos polínicos durante a germinação e a adição de 100 mg L<sup>-1</sup> de boro na cultura aumentou a germinação de grãos de pólen *in vitro*. A adição de boro é importante e suas

respostas são variáveis, conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage rapidamente com as membranas celulares (BHOJWANI & BHATNAGAR, 1974). Thompson & Batjer (1950) verificaram que a adição de boro ao meio aumentou marcadamente a porcentagem de germinação e comprimento do tubo polínico de várias frutíferas de clima temperado.

Em relação às concentrações de nitrato de cálcio testadas, observou-se a maior germinação, de 80%, com 400 mg L<sup>-1</sup>. Acima disso, as porcentagens diminuíram gradualmente, com 600, 800 e 1000 mg L<sup>-1</sup>, nas quais obteve-se 53, 25 e 0% de germinação. No tratamento, onde não se utilizou nitrato de cálcio ou, com apenas 200 mg L<sup>-1</sup>, não se observou germinação dos grãos de pólen (Figura 4).

O mesmo resultado foi obtido por Gonçalves et al. (2008) que estudou a germinação de pólen da cultivar de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Packham's 01, que também atingiu máxima germinação com a suplementação de 400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio ao meio de cultura.



**FIGURA 4** – Porcentagens de germinação *in vitro* de grãos de pólen de *M. velutina*, em meio de cultura com diferentes concentrações de nitrato de cálcio, após 12 horas de cultivo. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2008.

Esses resultados diferem dos obtidos por Pio et al. (2004), que avaliaram a suplementação do meio com 400 a 1.400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio para a germinação de pólen de citros e obtiveram maior porcentagem com a utilização de 800 mg L<sup>-1</sup>. Esta concentração também foi identificada por Oliveira Júnior (1996) como a mais adequada para a germinação de pólen de limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo).

Também bastante diferentes são os resultados obtidos por Silva et al. (1999), que avaliaram concentrações de 300 a 2.000 mg L<sup>-1</sup> desse composto na germinação de pólen de maracujazeiro (*Passiflora* spp.), obtendo maior germinação com 1.000 mg L<sup>-1</sup>.

Beyoung (1965) observou que a adição de nitrato de cálcio promoveu a germinação de pólen e o crescimento do tubo polínico em 46 espécies hortícolas. Brewbaker & Bwack (1963), trabalhando com 86 espécies pertencentes a 39 famílias, mostraram que adição de cálcio e boro atua como um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*.

### CONCLUSÃO

Meio adequado para a germinação de grãos de pólen de *M. velutina* é obtido com a suplementação de 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico e 400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, em pH 6,0, resultando em 80% de germinação.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEYOUNG, H. K. The effects of calcium on pollen germination. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 86, p. 818-823, 1965.
- BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S.P. **The embryology of angiosperms**. New Delhi: Skylark, 1974. 264 p.
- BOAVIDA, L. C.; MACCORMICK, S. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Michigan, v. 52, p. 570-582, 2007.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.
- CHAGAS, P. C.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; SAITO, A.; CAVALLARI, L. L.; MENDONÇA, V. Avaliação do pH para germinação *in vitro* de grãos de pólen de nectarina In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006.
- CUCHIARA, C. C. ; JUSTO, P. S. ; SILVA, S. D. A. E.; BOBROWSKI, V. L. Influência da temperatura e do pH sobre germinação *in vitro* de variedades de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA - ENERGIA E RICINOQUÍMICA, 3., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Seagri, 2008.
- DAI, S.; LI, L.; CHEN, T.; CHONG, K.; XUE, Y. WANG, T. Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. **Molecular & Cellular Proteomics**, Rockville, v. 6, n. 8, p. 2504-2529, 2006.
- DANTAS, A. C. D. M.; PEIXOTO, M. L.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus spp.*) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 356-359, 2005.
- GONÇALVES, C. X.; RUFATO, A. R.; DEGENHARDT, J. Diferentes concentrações de ácido bórico e nitrato de cálcio acrescidas ao meio de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de genótipos de pereira. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., e ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPel, 10., 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Editora da UFPel, 2008.
- HACKEL, A.; SCHAUER, N.; CARRARI, F.; FERNIE, A. R.; GRIMM, B.; KÜHN, C. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. **The Plant Journal**, Michigan, v. 45, p. 180-192, 2006.
- KAKANI, V. G.; REDDY, K. R.; KOTI, S.; WALLACE, T. P.; PRASAD, P. V. V.; REDDY, V. R.; ZHAO, D. Differences in *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of Botany**, v. 96, p. 59-67, 2005.
- KASI, R.; CHAGAS, E. A.; PIO, R.; BARBOSA, W.; CHAGAS, P. C.; SCARPARE FILHO, J. A.; TIZATO, L. H. G.; SMARSI, R. C.; OLIVEIRA, G. F. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de pessegueiro: pH, temperatura e tempo de emissão do tubo polínico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Tec Art Editora Ltda, 2008.

- KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of Rutaceae. **HortScience**, Hiroshima, v. 26, n. 2, p. 207, 1991.
- LORENZI, H.; MELO FILHO, L. E. **As plantas tropicais de Burle Marx**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 488 p.
- NYOMORA, A. M. S.; BROWN, P. H.; PINNEY, K.; POLITO, V. S. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Califórnia, v. 125, n. 2, p. 265-270, 2000.
- OLIVEIRA JÚNIOR, A. F.; RAMOS, J. D.; SANÁBIO, D.; RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M. Efeito do Cálcio na germinação de grãos de pólen do limoeiro 'Cravo' e do pessegueiro 'Aurora'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14., 1996, Curitiba. **Abstract...** Curitiba: SBF, 2000. p. 419.
- PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R.; PROFT, M. D. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.
- PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.
- PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 293-296, 2004.
- PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.
- SILVA, M. M.; BRUCKNER, C. H.; PIKANÇO, M.; CRUZ, C. D. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 347-352, 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Flower structure and the angiosperm life cycle. In: \_\_\_\_\_. **Plant Physiology**. 4. ed. on line, 2006. Disponível em: <<http://www.plantphys.net>>. Acesso em: 30 jun. 2010.
- THOMPSON, A. H.; BATJER, L. P. The effect of boron in the germinating medium on pollen germination and pollen tube growth for several deciduous tree fruits. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 56, p. 227-230, 1950.
- TORRES, A. C.; NISHIJIMA, M. L.; CATTONY, M. K. Polinização e fertilização *in vitro*. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v. 1. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998. p. 355-369.