

GERMINAÇÃO *in vitro* DE GRÃOS DE PÓLEN DE PESSEGUIRO: AJUSTE NA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO DE CÁLCIO E ÁCIDO BÓRICO

LEANDRO H.G. TIZATO^{1*}; EDVAN A. CHAGAS²; RAFAEL PIO³; FERNANDO A. CAMPO DALL'ORTO²; WILSON BARBOSA²; POLLYANA C. CHAGAS⁴; ANGELA SAITO^{1**}; JOSÉ E. BETTIOL NETO¹

Nº 0700035 - 1b

RESUMO

O nitrato de cálcio e o ácido bórico são reagentes que exercem grande influência na germinação *in vitro* e *in vivo* de grãos de pólen de diversas espécies. Neste contexto, objetivou-se estudar o efeito da adição de diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação *in vitro* de grãos de pólen de pessegueiros 'Aurora 1' e 'Douradão', visando ajustar a melhor concentração para estabelecer um protocolo para a realização de testes de viabilidade. O meio de cultura utilizado foi constituído de 90 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de agar, acrescido de diferentes concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg.L⁻¹) e ácido bórico (0, 400 e 800 e 1200 mg.L⁻¹) e pH ajustado para 5,8. O políneo foi distribuído uniformemente em placas de Petri contendo 20 mL de meio com auxílio de pincel nº.2. Maiores porcentagens de germinação *in vitro* de grãos de pólen é obtida utilizando-se 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 369 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio no meio de cultura para a variedade Douradão e 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico na ausência de nitrato de cálcio para variedade Aurora 1.

Palavras-chave: *Prunus persica*, Palinologia, Cultura de Tecidos, 'Aurora 1', 'Douradão'

¹ Estagiário do Centro APTA Frutas, *Bolsista I.C. FAPESP, **Bolsista PIBIC/CNPq.

² Pesquisador Científico do Instituto Agrônomo. Autor correspondente: Email: echagas@iac.sp.gov.br.

³ Professor da Universidade do Oeste do Paraná.

⁴ Mestranda em Fitotecnia da Esalq/USP, Bolsista CAPES.

PEACH POLLEN GRAINS *in vitro* GERMINATION: CALCIUM NITRATE AND BORIC ACID CONCENTRATIONS ADJUSTMENT

ABSTRACT

The calcium nitrate and the boric acid are reagents that exercise great influence in the *in vitro* germination and *in vivo* of pollen grains of several species. In this context, it was aimed at to study the effect of the addition of different concentrations of calcium nitrate and boric acid in the *in vitro* germination of pollen grains from the peach 'Aurora 1' and 'Douradão', aiming to adjust the best concentration to establish a protocol for the realization of viability tests. The culture mean used was constituted of 90 g.L⁻¹ of sucrose, 10 g.L⁻¹ of agar, added of different concentration of calcium nitrate (0, 200, 400 and 800 mg.L⁻¹) and boric acid 0, 400 e 800 and 1200 mg.L⁻¹) and the pH adjusted to 5.8. The pollen was distributed was uniformly distributed in Petri plates, containing 20 mL of the medium, with the help of a brush nº. 2. The higher pollen grains germination percentage is obtained using 400 g.L⁻¹ of boric acid and 369 g.L⁻¹ of calcium nitrate in the culture medium for the Douradão variety and 400 g.L⁻¹ of boric acid, in absence of calcium nitrate for the Aurora 1 variety.

Key words: *Prunus persica*, palinology, tissue culture, 'Aurora 1', 'Douradão'

INTRODUÇÃO

Nos programas de melhoramento genético de fruteiras a técnica mais utilizada para obtenção de novas variedades e a hibridação controlada no campo e posterior seleção. Desta forma, para obtermos sucesso nos cruzamentos é importante detectarmos antes de ir para o campo a viabilidade dos grãos de pólen. Para tal, o método mais utilizado consiste em germinar uma pequena amostra num meio de cultura *in vitro* apropriado e observar em microscópio após um determinado período o número de grãos que produzem tubo polínico. Assim, a composição do meio está entre os fatores que mais afetam a sua germinação.

O cálcio adicionado ao meio de cultura durante a observação de grãos de pólen propicia características fisiológicas importantes como: tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento do tubo polínico com forma linear, suave e aparência rígida (Bhojwani e 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

e Lenskens, 1974). Kwack e Brewbaker (1963), trabalhando com 86 espécies de 39 famílias, mostraram que o íon Ca em adição ao B é um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*.

No presente trabalho, objetivou-se estudar o efeito de diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico e ajustar a melhor dose para ser utilizada em testes de viabilidade e germinação de grãos de pólen de pessegueiros 'Aurora 1' e 'Douradão'.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento, Centro Experimental Central, do Instituto Agronômico de Campinas.

Os grãos de pólen utilizados foram obtidos de anteras provenientes de flores em estágio de balão das variedades de pessegueiros 'Aurora 1' e 'Douradão'. Após a separação das anteras, estas foram acondicionadas em placas de Petri forradas com papel de filtro e colocadas em sala de secagem a uma temperatura de 25°C, durante 12 horas, para a completa deiscência e liberação dos grãos de pólen. Em seguida, o políneo de cada variedade foi distribuído uniformemente sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de um pincel nº.2, constituído de 90 g.L⁻¹ de sacarose, 10g.L⁻¹ de agar, acrescido de diferentes concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg.L⁻¹), ácido bórico (0, 400 e 800 e 1200 mg.L⁻¹), em todas as combinações possíveis, as quais constituíram os tratamentos. O pH do meio foi ajustado para 5,8. Após a inoculação, os tratamentos foram incubados em sala de crescimento a 27±1°C, fotoperíodo de 24 horas e intensidade luminosa de 35 µmol.m⁻².s⁻¹.

A avaliação foi constituída da contagem de grãos de pólen germinados realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 10 X. Considerou-se germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico tivesse ultrapassado o diâmetro do próprio grão de pólen, após 12 horas de incubação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4, com quatro repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se através da Figura 1 o efeito da interação entre a adição de nitrato de cálcio e ácido bórico no meio de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de pessegueiro variedades Aurora 1 e Douradão.

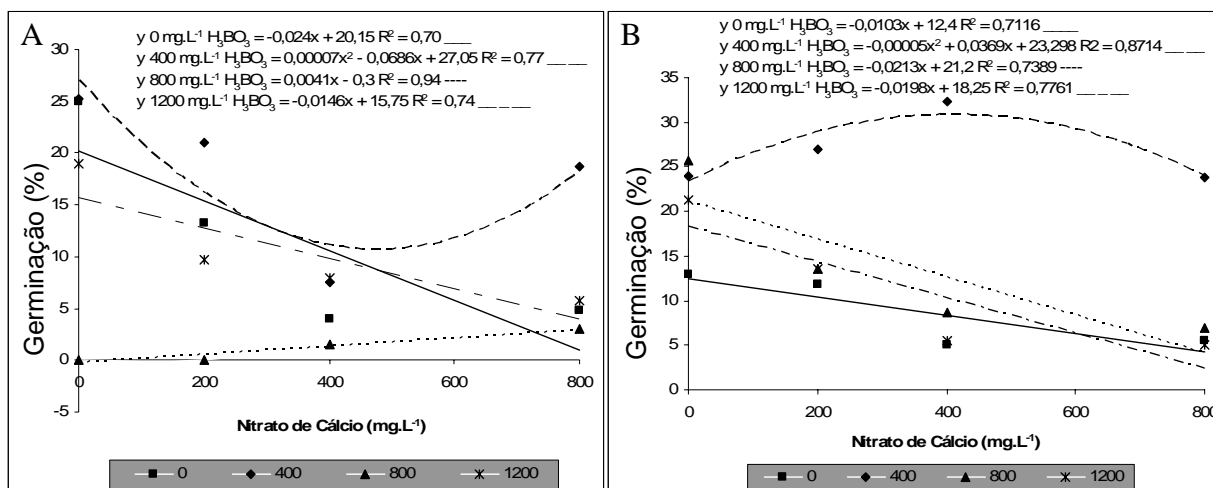


FIGURA 1. Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de pessegueiro variedade Aurora 1 (1A) e Douradão (1B) quando submetidas a diferentes concentrações de nitrato de cálcio e ácido bórico. Centro APTA Frutas/IAC, Jundiaí, SP, 2007.

Verificou-se, de maneira em geral, que a adição de nitrato de cálcio afetou significativamente a germinação *in vitro* de grãos de pólen da variedade Aurora 1, sendo que os melhores resultados foram observados na sua ausência. Para esta variedade, a maior porcentagem de germinação foi constatada quando adicionou-se 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico na ausência de nitrato de cálcio (Figura 1A). Resultado semelhante foi observado para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de pereira onde constataram que não há necessidade da adição desse reagente para a germinação *in vitro* de grãos de pólen dos porta-enxertos 'Taiwan Mamenashi' e 'Taiwan Nashi-C' (Chagas et al., 2007).

Para a variedade Douradão verificou-se efeito semelhante. Exceto para a concentração de 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico que, quando combinado com 369 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio, proporcionou o melhor resultado na germinação *in vitro* de grãos de pólen (Figura 1B). Para todas as demais concentrações de ácido bórico testadas, houve um decréscimo na porcentagem de germinação a medida em que se elevava a concentração de nitrato de cálcio no meio de cultura (Figura 1B).

Resultados semelhantes aos citados para a variedade Douradão foram observados na germinação *in vitro* de nectarineira 'Centenária'. Chagas et al. (2006) verificaram que quando utilizaram-se 400 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio houve um aumento da porcentagem de germinação até a concentração de 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico, diminuindo na presença de valores mais elevados.

CONCLUSÕES

Para variedade Aurora 1, maior porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen é obtida adicionando-se 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico no meio de cultura e na ausência de nitrato de cálcio.

Para a variedade Douradão, maior porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen é obtida adicionando-se 400 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 369 mg.L⁻¹ de nitrato de cálcio no meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi, Skylark Printers, 1974. 264p.
- CHAGAS, E.A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; SAITO, A.; CHAGAS, P.C. In vitro germination of *Pyrus calleryana* Decne. pollen: adjusting a protocol. In: Internacional Pear Symposium, 10., 2007. Peniche. **Anais...** Peniche: ISHS, 2007. p.48.
- CHAGAS, E. A., PIO, R., BARBOSA, W., SAITO, A., CHAGAS, P.C., FRACAROLLI, B.B.C., MENDONCA, V., ONO, T.K. Efeito da adição de nitrato de cálcio e ácido bórico na germinação in vitro de polens de nectarineira In: XV congresso de Pós-Graduandos da Universidade Federal de Lavras, 2006. Lavras: UFLA, 2006. 6p. CD Rom.
- 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.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer – Verlag, 1974, 172p.