

GERMINAÇÃO DO PÓLEN DE AMENDOIM (*Arachis
hypogaea* L.) IN VITRO

ANTÔNIO DA SILVA SOUZA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
EM FITOTECNIA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1986

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

ANTÔNIO DA SILVA SOUZA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 / 09 / 86.

Prof. Francisco Célio Guedes Almeida, Ph.D.
- Orientador -

Prof. Francisco José A. F. Távora, Ph.D.
- Conselheiro -

Prof. José Ferreira Alves, M.S.
- Conselheiro -

Prof. Fanuel Pereira da Silva, Ph. D.
- Coordenador do Curso -

Às memórias de

GIOVANNI DE SOUZA ALFANO,
JORGE LUIS DA CUNHA TOSTA e
MARIA DO CARMO MERCÊS BRITO,
pela grande amizade que cultivamos.

À minha esposa NELMA;
Aos meus filhos MARCELO e MILENA
Aos meus pais FRANCISCO e MARIA
Aos meus irmãos LUIZ FRANCISCO, LÚCILA,
LUCIANO, NEUZA, JOSÉ e LÚCIA

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, e ao Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura - CNPMF, pela assistência financeira e a oportunidade a mim conferida para a realização deste curso.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, pelo atendimento dispensado no decorrer do curso.

Ao Professor FRANCISCO CÉLIO GUEDES ALMEIDA, pela segura orientação e empenho durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos Professores FRANCISCO JOSÉ ALVES FERNANDES TÁVORA e JOSÉ FERREIRA ALVES, pelas valiosas críticas, sugestões e revisão dos originais.

Aos Professores MARCOS VINÍCIUS ASSUNÇÃO e FERNANDO FELIPE FERREYRA HERNANDEZ pela atenção dispensada durante a condução dos experimentos.

As funcionárias do Setor de Informação e Documentação do CNPMF, pela recuperação das referências bibliográficas utilizadas na revisão de literatura deste trabalho.

Aos colegas de curso, pela amizade e consideração durante o período de convivência.

Finalmente, aos funcionários do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias e a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE TABELAS</u>	vi
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>RESUMO</u>	ix
<u>ABSTRACT</u>	x
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	3
2.1 - <u>Sacarose</u>	5
2.2 - <u>Substâncias Nutritivas à Base de Macronutrientes</u>	7
2.3 - <u>Boro</u>	9
2.4 - <u>Agar</u>	11
2.5 - <u>pH</u>	13
3 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	15
3.1 - <u>Parâmetros Estudados</u>	16
3.2 - <u>Procedimento Estatístico</u>	17
4 - <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	19
4.1 - <u>Sacarose</u>	19
4.2 - <u>Ácido Bórico</u>	22
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	37
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	38

LISTA DE TABELAS

TABELA

Página

- 1 - Germinação (%) e comprimento (μm) do tubo polínico de amendoim, em função de oito concentrações de sacarose. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986. ... 20
- 2 - Análises de variância relativas à percentagem de germinação e comprimento do tubo polínico de amendoim, em oito concentrações de sacarose. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986. 24
- 3 - Germinação (%) de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986. 25
- 4 - Início de germinação (%) de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986. 27
- 5 - Eclosão (%) de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986. 28
- 6 - Comprimento (μm) de tubo polínico de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986. 30
- 7 - Análises de variância relativas às percentagens de germinação e eclosão de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto

TABELA

Página

	de amônio, fosfato monoamônico e nitrato do potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986.	35
8 -	Análises de variância relativas à percentagem de início de germinação e comprimento do tubo polínico de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986.	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	- Germinação do pólen (4,54%) e comprimento do tubo polínico (85,85 μ m) de amendoim num meio de cultura com 15% de sacarose. 20X.	23
2	- Germinação do pólen (21,27%) e comprimento do tubo polínico (290,89 μ m) de amendoim num meio de cultura com 0,03% de cloreto de amônio e 0,016% de ácido bórico. 20X.	32
3	- Germinação do pólen (30,20%) e comprimento do tubo polínico (801,41 μ m) de amendoim num meio de cultura com 0,02% de nitrato de potássio e 0,016% de ácido bórico. 20X.	33

RESUMO

Estudou-se a germinação do pólen de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) in vitro, desde que se admite tratar-se de uma técnica similar ao processo germinativo in vivo. A viabilidade in vitro tem sido utilizada para representar a capacidade do potencial do pólen em completar o processo de fertilização.

Neste trabalho, dois ensaios foram conduzidos objetivando selecionar um meio de cultura para a germinação, início de germinação, eclosão e comprimento do tubo polínico de amendoim. Os experimentos foram executados em condições de laboratório, com temperatura oscilando de 26 a 28°C e umidade relativa de 65 a 80%. No primeiro experimento foram estudadas as concentrações de 0,5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35% de sacarose. No segundo ensaio, observou-se o efeito do ácido bórico, nas concentrações de 0,004, 0,008, 0,012, 0,016 e 0,020%, em combinação com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio, estudados nas concentrações de 0,03, 0,01 e 0,02% respectivamente.

A melhor taxa de germinação (30,20%) foi obtida num meio de cultura contendo 0,02% de nitrato de potássio e 0,016% de ácido bórico, adicionados a 15% de sacarose, 0,01% de nitrato de cálcio e 1% de agar, com o pH ajustado para 7,0. Este meio de cultura foi também responsável pelo maior comprimento do tubo polínico conseguido (801,41 μ m).

ABSTRACT

The germination of peanut (*Arachis hypogaea* L.) pollen was studied in vitro as a technique that seems to be similar to the process in vivo. The viability in vitro was been used to represent the pollen's potential ability in completing the fertilization process.

In this study, two experiments were carried out in order to select a culture medium the germination, initial germination, bursting and lenght of the peanut pollen tube. The experiments were done in laboratory conditions where the temperature ranged from 26 to 28°C and the relative humidity from 65 to 80%. The sucrose concentrations of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35% were studied in the first experiments and effect of boric acid 0.004, 0.008, 0.012, 0.016 and 0.020% concentrations in association to ammonium chloride, monoammonium phosphate and potassium nitrate in 0.03, 0.01 and 0.02% concentrations, respectively, was observed in the second one.

The highest germination rate (30.20%) was obtained under the conditions of potassium nitrate 0.02% and 0.016% boric acid in addition to sucrose 15%, calcium nitrate 0.001% and agar 1%, at pH 7.0. These conditions also allowed the pollen tube to elongate the most (801.41 μm).

1 - INTRODUÇÃO

Estudos sobre a fisiologia e bioquímica do pólen oferecem grandes possibilidades para superar barreiras na capacidade de cruzamentos, conhecer os efeitos da polinização sobre o crescimento dos frutos, induzir partenogênese, obter frutos partenocárpicos, aumentar a formação de frutos e um melhor conhecimento do processo alérgico provocado nos seres humanos.

Interações entre o pólen e os tecidos maternos do estigma, estilete e ovário tornam difícil estudar o processo de germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico in vivo. Como a germinação in vitro e o crescimento do tubo polínico podem se apresentar de maneira similar que in vivo, tem-se utilizado a germinação artificial do pólen como um processo para estudar a influência dos fatores ambientais e estimar as diferenças genéticas para crescimento do tubo polínico e percentagem de pólen viável. Portanto, o estudo do pólen in vitro pode estimar a percentagem de germinação e alongamento do tubo polínico in vivo, o que é de fundamental interesse, devido a seu papel na biologia reprodutiva. Sob condições controladas, o pólen é facilmente manuseado e as respostas ao seu comportamento germinativo podem ser influenciadas por diferentes fatores cuidadosamente estudados. A baixa percentagem de germinação do pólen e o lento crescimento do tubo polínico podem afetar consideravelmente o próprio estabelecimento de sementes nas plantas.

O maior valor do teste de germinação do pólen é avaliar a viabilidade de grãos de pólen, inclusive daqueles que foram utilizados uma vez em polinização e estão sendo preservados para uma reutilização. Portanto, o interesse do melhorista é verificar se o pólen está ou não viável para uso em polinização e também quanto da viabilidade foi perdida desde que foi

coletado. A manutenção da viabilidade do pólen é de grande importância no melhoramento vegetal, facilitando o cruzamento de plantas que florescem em períodos e locais diferentes do mundo.

O comportamento do pólen de amendoim em meio da cultura artificial foi estudado objetivando selecionar um meio adequado para a sua germinação.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

O grão de pólen é uma reserva de diversas substâncias químicas, tais como carboidratos, nas formas de açúcares e amido, proteínas e aminoácidos, vitaminas e minerais, e pigmentos, principalmente flavonóides e carotenóides (SINGH, 1980). Existem enzimas e iso-enzimas que desempenham um legítimo papel na fisiologia da germinação do pólen, cujo processo não depende somente das substâncias químicas contidas nos grãos, mas também da disponibilidade de um adequado meio contendo, entre outros, açúcares, boro, cálcio, vitaminas e substâncias promotoras de crescimento.

A primeira mudança que ocorre no grão de pólen é seu aumento devido a embebição de água, cuja taxa depende da temperatura, concentração do meio de cultura e em alguns casos da luz solar; num meio mais concentrado a embebição é mais lenta e, conseqüentemente, a germinação é menos rápida (SANDSTEN, 1909). Para VISSER (1955), a água constitui-se na primeira necessidade que o grão de pólen requer para sua germinação e formação do tubo polínico. Como conseqüência, a principal função de qualquer meio é o suprimento de água. Entretanto, o aumento da germinação depende de outras substâncias; como por exemplo, os nutrientes.

Segundo RESNIK (1958), o substrato germinativo pode ter suas funções resumidas em quatro: a) provisão de água; b) suprimento de substâncias nutritivas; c) influência estimulante (ou inibitória) e; d) propiciar propriedades físicas favoráveis para o aumento do tubo polínico. Para GARCIA GARCIA & EGÉA IBÁÑEZ (1979), os ensaios de germinação in vitro de pólen têm uma dupla finalidade: 1. avaliar sua capacidade germinativa e; 2. determinar a influência das condições externas sobre a germinação do pólen e posterior crescimento do tubo polínico.

Basicamente, segundo MOORE & JUNG (1974), existem três tipos de testes para verificar a viabilidade do pólen. O método mais direto é o teste in vivo, no qual os grãos de pólen são colocados no estigma e sua capacidade para causar o estabelecimento de sementes é computada. Outro teste para a viabilidade do pólen se baseia no uso de substâncias marcadoras, tais como brometo ou cloreto de tetrazólio, utilizadas para comprovar a atividade de enzimas. O terceiro teste para a viabilidade do pólen é a observação da germinação in vitro. De acordo com GOSS (1968), citado por aqueles autores, este teste é intermediário entre os dois outros, em relação a facilidade de execução e tempo requerido, sendo considerado satisfatório nos ensaios de capacidade para fertilização e, conseqüentemente, o estabelecimento de sementes.

Dois tipos morfológicos de pólen podem ser reconhecidos entre as plantas angiospermas (LEOPOLD & KRIEDEMANN, 1975). O pólen binucleado é característico de muitas ordens relativamente primitivas, tais como *Magnoliales*, *Ranales* e *Liliales*, e de famílias de árvores, como *Jugandaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae* e *Urticaceae*. Há, porém, um número relativamente alto de famílias avançadas com este tipo de pólen, entre as quais se encontra a *Leguminosae*. Este pólen apresenta uma mitose após o estágio de microsporo, tendo um núcleo vegetativo livre, que degenera gradualmente, e um núcleo generativo envolvido por um citoplasma. Esta célula generativa avança para a ponta do tubo polínico quando a germinação e o crescimento acontecem e, horas após o processo germinativo, uma segunda divisão ocorre, quando o núcleo está pronto para fertilizar o saco embrionário. Já o pólen trinucleado é característico de muitas das mais avançadas ordens e famílias, incluindo a *Compositae*, *Rubiales*, *Caryophyllales* e *Polygonales*, e *Gramineae* e *Juncaceae*. Neste pólen ocorrem duas mitoses após o estágio de microsporo; quando ele é desprendido possui um núcleo vegetativo e dois espermáticos. Desde que o pólen trinucleado é raramente capaz de germinar num meio artificial, seu estudo, tornou-se difícil. Aparentemente ele tem algum requerimento especial para germinação e

crescimento, e pouco é conhecido de sua fisiologia.

2.1 - Sacarose

A germinação do pólen depende, entre outros fatores, da taxa de água que é liberado pelo meio e absorvida pelo grão (VISSER, 1955), sendo que a concentração de sacarose necessária para uma boa germinação varia amplamente de espécie para espécie. VISSER & TILLEKERATNE (1958) observaram que o pólen de erva-mate (*Thea sinensis* L.) germinou tão bem em água como em soluções de açúcar, pois, ao testarem as concentrações de sacarose de 0, 5, 10, 15, 20 e 25%, obtiveram percentuais de germinação de 83, 87, 87, 88, 83 e 75%, respectivamente. Em trevo (*Lotus corniculatus* L.), a concentração de 40% de sacarose apresentou uma germinação inferior a 2%, o que foi atribuído por SPISS & HITTLE (1979), à dificuldade do pólen em absorver água.

Segundo CRANE et alii (1974), o primeiro passo para estudar a viabilidade do pólen in vitro é determinar a concentração ótima de sacarose do substrato, para as diferentes espécies vegetais (SHARMA et alii, 1981). Testando 13 açúcares, como fontes de carbono, COOK & WALDEN (1965) verificaram que a sacarose, no nível de 12%, propiciou a germinação mais elevada do pólen de milho (*Zea mays* L.), seguida pela rafinose. Por outro lado, dos 16 açúcares utilizados por CHIANG (1974) em ensaios com pólen de repolho (*Brassica oleracea* L.), a sacarose também foi responsável pela maior percentagem de germinação (39%). Realmente, a sacarose desempenha um papel essencial no processo germinativo do grão de pólen, seja como fonte nutricional (VASIL, 1960; SINGH et alii, 1961; ALMEIDA, 1984), como regulador da pressão osmótica (VISSER, 1955; SINHA, 1972; AHLUWALIA, 1973; BARROW, 1981; SILVA, 1985) ou desempenhando ambas as funções (RESNIK, 1958; JOHRI & VASIL, 1961; LEOPOLD & KRIEDEMANN, 1975; DHAWAN & MALIK, 1981; SHARMA et alii 1981).

2. Altas concentrações de açúcar têm sido utilizadas no meio de germinação para prevenir a eclosão dos grãos de pólen trinucleado. Ao contrário, grãos de pólen binucleado germinam rapidamente e produzem tubos polínicos em meios contendo baixas quantidades de açúcar (HOEKSTRA & BRUINSMA, 1975), necessitando, portanto, de requerimentos simples para tal (BRINK, 1924, citado por LEOPOLD & KRIEDEMANN, 1975). Para ALMEIDA (1984), a sacarose é o suplemento nutricional mais comum para pólen tipo binucleado, sendo que um nível adequado daquele açúcar num meio artificial já é suficiente para determinar a viabilidade do pólen (VASIL, 1960 e SINGH et alii, 1961).

Estudando a germinação do pólen de diversas gramíneas, VASIL (1960) obteve os melhores resultados com a espécie *Pennisetum typhoideum*, cujas variedades apresentaram diferenças marcantes quanto à necessidade de sacarose. Em aspargo (*Asparagus officinalis* L.), SNOPE & ELLISON (1963) conseguiram um incremento na percentagem de germinação do pólen de 15 para 85% ao aumentaram o nível de sacarose de 4 para 22%; nas concentrações acima de 30% de sacarose não ocorreu eclosão. Uma significativa redução na taxa de germinação do pólen de cinco cultivares de uva (*Vitis vinifera* L.) foi constatada por BAMZAI & RANDHAWA (1967) em concentrações de sacarose acima de 20%. Ainda com uva, MOTI (1972) encontrou que a melhor taxa de germinação do pólen e o máximo comprimento do tubo polínico ocorreram também no tratamento com 20% de sacarose. Já KWAN et alii (1969) chegaram a conclusão que a concentração de sacarose de 20% foi a que apresentou as melhores respostas tanto no percentual de germinação como no comprimento do tubo polínico de cebola (*Allium cepa* L.). Esses resultados, entretanto, discordaram dos de MANN & WOODBURY (1969), que obtiveram um melhor desempenho do processo germinativo do pólen daquela espécie nas concentrações de 10 e 15% de sacarose. Por outro lado, MISRA (1972) conseguiu tanto o máximo em germinação (18%) como no comprimento do tubo polínico (343 μ m) no nível de 20% de sacarose, para ameixa (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Exigências em sacarose foram mais específicas para o crescimento do tubo po

línico do que para a germinação do pólen de alfafa (*Medicago sativa* L.), conforme BARNES & CLEVELAND (1972), principalmente sob altas temperaturas. A concentração de 10% de sacarose foi significativamente superior às demais testadas por SINHA (1972) em experimento com pólen de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), quando produziu uma germinação de 40% e um comprimento do tubo polínico de 123 μ m.

Estudos desenvolvidos por MOORE & JUNG (1974) mostraram que, com o aumento da sacarose, os pólenes de diversas variedades e clones de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) diminuíram a taxa de eclosão e aumentaram o número de grãos iniciados. Com cacau (*Theobroma cacao* L.), RAVINDRAN (1977) conseguiu um percentual de germinação do pólen de 60%, após quatro horas de incubação, num meio contendo 20% de sacarose. Todavia, concentrações acima desse nível inibiram completamente a germinação do pólen de mamona (*Ricinus communis* L.), conforme SAOJI & HASTAK (1979). SHARMA (1980) estudando a germinação dos pólenes de duas espécies de plantas ornamentais encontrou, no nível de 10% de sacarose, os valores de 41 e 85% de germinação para *Antirrhinum majus* L. e *Amaryllis vittata* Ait. Estudos efetuados por KUMAR et alii (1982), mostraram que os grãos de pólen de *Anacardium occidentale* L., *Bauhinia purpurea* L. e *Millingtonia hortensis* L. F. diferiram nas concentrações de sacarose, respectivamente, 40, 20 e 15%, para os máximos de germinação e crescimento do tubo polínico.

2.2 - Substâncias Nutritivas à Base de Macronutrientes

Não foi localizado, na literatura especializada, nenhum trabalho relacionado com as funções do nitrogênio e fósforo no processo de germinação de grãos de pólen.

Já o potássio tem o papel de auxiliar na absorção e fixação do cálcio (BREWBAKER & KWACK, 1963). Juntamente com sulfato de magnésio, o nitrato de potássio aumenta a eficiência

do ion Ca na prevenção da eclosão de grãos de pólen em meio artificial (GOVILA & RAO, 1970). COOK & WALDEN (1965) comprovaram que o nitrato de potássio, independente ou combinado com ácido bórico, apresentou efeito depressivo na germinação in vitro do pólen de milho (*Zea mays* L.). A concentração de 0,01% KNO_3 foi a empregada por PERIASAMY & SAMPOORNAM (1983) na germinação in vitro do pólen de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), com resultados satisfatórios.

Para LINSKENS (1964), o ion Ca parece ser um dos reguladores primários da germinação do pólen. O crescimento do tubo polínico é marcadamente estimulado pelo cálcio (MASCARENHAS & MACHLIS, 1962, citados por LEOPOLD & KRIEDEMANN, 1975), o que pode ser devido à formação de um gradiente no teor de Ca do estigma para o óvulo.

De acordo com BREWBAKER & KWACK (1964), citados por PFAHLER (1967), a ação do Ca no grão de pólen está aparentemente associada com a membrana do tubo polínico. Estudos têm indicado que o cálcio ocupa as regiões de pectina da parede do tubo polínico, aumentando sua rigidez e estabilidade, reduzindo, conseqüentemente, a ruptura (GOVILA & RAO, 1970). Para FARLOW et alii (1979), o crescimento do tubo polínico e uma redução na taxa de eclosão de grãos de pólen estão relacionados com o aumento do conteúdo de Ca do meio. Os tubos polínicos de duas cultivares de *Cicer arietinum* L. também foram bastante sensíveis à adição de cálcio ao meio de cultura, alcançando comprimento de 1.350 μm (SINGH, 1980).

Testando diversos sais na germinação do pólen de duas espécies de algodão (*Gossypium barbadense* L. e *G. hirsutum* L.), BARROW (1981) encontrou que a concentração de 0,14 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ / 100 ml H_2O , associada com essa mesma dosagem de MnSO_4 , foi a que apresentou melhores resultados tanto na germinação como no comprimento do tubo polínico. Já ALMEIDA (1984) trabalhando com *G. hirsutum* L., encontrou que a concentração de 0,06% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ propiciou uma germinação do pólen de 55,7%, enquanto o tubo polínico atingiu um comprimento de 990,0 μm . Ainda com *Gossypium hirsutum* L., SILVA (1985) observou que o nitrato de cálcio não

exerceu influência sobre o crescimento do tubo polínico; concentrações acima de 0,065% reduziram significativamente a germinação e aumentaram a taxa de eclosão do pólen.

2.3 - Boro

Para VISSER (1955), o ácido bórico desempenha um importante papel no processo germinativo do pólen, embora seu efeito estimulatório nem sempre seja claro. Esse autor entende que se a planta-mãe tiver um elevado nível de boro ou se o valor osmótico do meio-for relativamente alto e a temperatura baixa, boa germinação do pólen pode ser obtida em meio sem boro.

Evidências demonstram que o boro promove a absorção, metabolismo e transporte de açúcares (DEVLIN, 1975; MALAVOLTA, 1979), facilitando seu ingresso no protoplasma do pólen e favorecendo o alongamento do tubo polínico, através da formação de um complexo açúcar-boro (GAUCH & DUGGER, Jr., 1953; JOHRI & VASIL, 1961; LINSKENS, 1964; MOORE & JUNG, 1974; SHARMA, 1980). Deste modo, ocorre um movimento mais rápido desse complexo através da membrana celular, sendo que a sua deficiência ocasiona um retardamento nesse processo ou mesmo sua paralização (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DIFUSÃO DE ADUBOS, 1975). Para NOGGLE & FRITZ (1976) o íon B forma complexos com certos carboidratos, apesar de que complexos naturais desses produtos não tenham ainda sido identificados nas plantas.

O boro também está envolvido na síntese de pectina, requerida pelas paredes dos tubos polínicos em processo de alongamento (JOHRI & VASIL, 1961; LINSKENS, 1964; KWAN et alii, 1969; MISRA, 1972; SHARMA et alii, 1981).

Realmente o efeito do boro na germinação e crescimento do tubo polínico é muito mais marcante que o efeito de qualquer hormônio, vitamina ou substância química conhecidos. Ele ainda promove aumento na absorção de O_2 , metabolismo de ácido nucléico, interação com reguladores de crescimento, biossinte-

se do ácido fenólico e mediação de certas reações enzimáticas (RESNIK, 1958; JOHRI & VASIL, 1961; MISRA, 1972; SHARMA et alii, 1981). De acordo com DEVLIN (1975), o boro tem sido relacionado com o desenvolvimento e diferenciação celular, metabolismo de hormônios, relações hídricas, síntese de lipídios, metabolismo do fósforo e fotossíntese. Entretanto, é questionável se todos os processos acima são afetados apenas indiretamente pelo boro, através de sua participação na translocação de açúcares.

Para a germinação do pólen de centeio (*Secale cereale* L.), a adição do ácido bórico teve um papel essencial, desde que nenhum caso de germinação foi observado quando o mesmo não era incluído no meio de cultura (PFAHLER, 1965). Já a germinação do pólen de avelã (*Corylus spp.*) foi completamente inibida com a adição de boro ao meio (ZIELINSKI, 1968). Em cebola (*Allium cepa* L.), MANN & WOODBURY (1969) encontraram que na faixa de 50-100 ppm H_3BO_3 houve a maior taxa de germinação do pólen, que ficou entre 70 e 80%. O nível de 20 ppm de ácido bórico proporcionou uma germinação de 80% no pólen de jacá (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), conforme SINHA (1972), com o tubo polínico alcançando um comprimento de 389 μm . SEETHARAM & KUMARI (1974) comprovaram que o boro proporcionou um aumento substancial na germinação do pólen de girassol (*Helianthus annuus* L.), passando de 8 (sem B) para 37% (no nível de 0,02% H_3BO_3). A concentração de 100 ppm H_3BO_3 apresentou-se como a melhor, tanto em termos de percentagem de germinação (88%) como no comprimento do tubo polínico (251 μm) de cacau (*Theobroma cacao* L.), segundo RAVINDRAN (1977).

Uma taxa de germinação de 80% foi conseguida por DICKINSON (1978) em grãos de pólen de *Lilium longiflorum* Thumb., no nível de 10 μg H_3BO_3 . Entretanto, resultados conseguidos por SAOJI & HASTAK (1979) com pólen de mamona (*Ricinus communis* L.) não foram satisfatórios. SINGH (1980), observou que o boro acelerou a taxa de germinação dos grãos de pólen de *Cicer arietinum* L. em comparação com o meio constituído por sacarose. A marcante influência do boro tem sido relatada por YADAV

(1980), já que sua adição ao meio nutritivo, nas formas de ácido bórico ou de borax, aumenta a percentagem de germinação do pólen e o alongamento do tubo polínico. Em pinho (*Pinus roxburghii* Sarg.), DHAWAN & MALIK (1981) alcançaram um máximo de 70% na germinação dos grãos de pólen ao combinar ácido bórico com sacarose. Contudo, ao associar o ácido bórico com água não conseguiram nenhum caso de germinação. Sem a presença do ácido bórico no meio de cultura, ASIF et alii (1983) conseguiram 11,2% e 8,0 μm , respectivamente para taxa de germinação e comprimento do tubo polínico de tâmara (*Phoenix dactylifera* L.); com o maior nível de H_3BO_3 do experimento (100 ppm), esses valores foram elevados para 61,6% e 36,4 μm . Também na ausência de boro a percentagem de germinação do pólen de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) caiu de 100 para 70-80% (PERIASAMY & SAMPOORNAM, 1983). ALMEIDA (1984) concluiu que o boro afetou significativamente a germinação e o comprimento do tubo polínico de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), alcançando, na concentração de 0,03% H_3BO_3 , os valores de 50,7% e 832,5 μm para aqueles parâmetros, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por SILVA (1985) que, para aquela mesma espécie e naquela concentração de ácido bórico, conseguiu uma germinação de 51,5% e comprimento do tubo polínico de 887,5 μm .

2.4 - Agar

Para BAIR & LOOMIS (1941), citados por PFAHLER (1965), o agar, alterando as características físicas do meio, permite a presença do pólen na superfície do meio de cultura e, deste modo, regula a absorção de oxigênio e nutrientes. Quando baixas concentrações de agar são utilizadas, o pólen tende a afundar no meio de cultura e pode não germinar (ALMEIDA, 1984). Segundo FERNHOLZ & HINES (1942), na concentração de 1% de agar os grãos de pólen de tungue (*Aleurites fordii* Hemsl.) eclodiram, devido a baixa pressão osmótica do meio. VISSER (1955) afirma que o

agar, embora não tendo propriedades osmóticas, impede o movimento da água, devido a sua característica coloidal.

SNOPE & ELLISON (1963) observaram que não houve nenhuma diferença entre as concentrações de 1 e 2% de agar na germinação do pólen de aspargo (*Asparagus officinalis* L.). Com milho (*Zea mays* L.), COOK & WALDEN (1965) concluíram que houve um aumento nas taxas de germinação do pólen com a adição de agar ao meio de cultura, passando de 45 e 70%, em meios líquidos, para 85 e 95%, respectivamente, com a adição de 0,7% de agar. Também em milho, numa concentração de agar muito próxima (0,6%), PFAHLER (1967) obteve tanto a maior percentagem de germinação como o maior comprimento do tubo polínico. Ao adicionar agar (nos níveis de 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%) numa solução de sacarose, MOTI (1972) observou tanto uma promoção na germinação como no comprimento do tubo polínico de cinco variedades de uva (*Vitis vinífera* L.). Na concentração de 0,5% ele alcançou 96% na taxa de germinação e 1.606 μ m no comprimento do tubo polínico.

Na concentração de 1% de agar ocorre um melhor desempenho do processo germinativo do pólen de diversas espécies, tais como, cebola (*Allium cepa* L.), ameixa (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), mamona (*Ricinus communis* L.), trevo (*Lotus corniculatus* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), conforme KWAN et alii (1969), MISRA (1972), SINHA (1972), SAOJI & HASTAK (1979), SPISS & HITTLE (1979) e ALMEIDA (1984) e SILVA (1985), respectivamente. Por outro lado, a eclosão dos grãos de pólen de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi reduzida com a incorporação de 2% de agar ao meio (FARLOW et alii, 1979), o que resultou em aumento no percentual de germinação.

Em 1965, COOK & WALDEN levantaram a hipótese de que ocorria a adição de algum íon junto ao agar, favorecendo a germinação e o comprimento do tubo polínico. MOORE & JUNG (1974), mostraram que estudos precisos sobre os papéis do Ca e B na germinação e crescimento do tubo polínico são dificultados em meios de cultura contendo agar, devido a presença daqueles

ções neste produto; ao analisarem o agar, encontraram teores de 0,17 e 0,0005% para cálcio e boro, respectivamente.

2.5 - pH

Ao estudarem uma faixa de pH de 4,0 a 9,0, WARNOCK & HAGEDORN (1956) encontraram que o ótimo para a germinação do pólen de quatro variedades de ervilha (*Pisum sativum* L.) foi 7,0. Dentro dessa faixa, os tubos polínicos também cresceram com muito mais vigor. Em pólen de milho (*Zea mays* L.), COOK & WALDEN (1965) observaram que a germinação foi influenciada pelas mudanças no pH, que se apresentou como ótimo também em 7,0. Já ALMEIDA (1984) comprovou que a germinação e o crescimento do tubo polínico em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) foram satisfatórios apenas quando o pH do meio ficou entre 5,4 e 8,0, com os melhores resultados sendo conseguidos no pH 7,0.

Segundo JOHRI & VASIL (1961), os grãos de pólen germinam numa ampla faixa de pH, porém os melhores resultados são obtidos num pH de 5,5 a 6,5. A interrupção do crescimento do tubo polínico in vitro e a perda da viabilidade em pólen armazenado parecem estar relacionados com a redução do pH e seu provável efeito sobre as propriedades de ligação do cálcio com a parede do grão (LINSKENS, 1964).

Muitos estudos já foram realizados com relação ao pH do meio de cultura mais adequado a germinação dos grãos de pólen de várias espécies ornamentais. Segundo HENNY (1977), os grãos de pólen de *Spathiphyllum floribundum* (Linden & Andre) N. E. Br. Mauna Loa e *Vriesea malzinei* E. Morr. germinaram satisfatoriamente apenas quando o pH do meio ficou entre 4,0 e 8,0. Para *Lilium longiflorum* Thumb., o melhor pH para germinação do pólen foi 5,2 (DICKINSON, 1978). Aumentando para 8,0 ou diminuindo para 6,0, o pH causou um declínio na taxa de absorção de O_2 por parte do pólen de *Amaryllis vittata* Ait., influenciando na germinação e crescimento do tubo polínico (SHARMA et alii

1981). O pH não exerceu nenhuma influência sobre a germinação do pólen de groselha espinhosa (*Actinidia chinensis* Planch.), conforme HOPPING & SIMPSON (1982), apesar do crescimento do tubo polínico ter sido inibido quando o mesmo caiu abaixo de 5,0. Para ROBERTS et alii (1983), o mais interessante é o fato de que o pH ótimo in vitro não parece corresponder ao pH que é provavelmente encontrado na superfície do estigma.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, durante o período de 23 de novembro de 1985 a 21 de fevereiro de 1986.

O primeiro experimento foi executado para determinar o nível de sacarose correspondente a maior taxa de germinação do pólen. A sacarose foi dissolvida em água destilada, nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35%, sendo as soluções solidificadas com 1% de agar. No experimento seguinte estudou-se o efeito do ácido bórico nas concentrações de 0,004, 0,008, 0,012, 0,016 e 0,020%, em associação com as seguintes substâncias nutritivas: 0,03% de cloreto de amônio, 0,01% de fosfato monoamônico e 0,02% de nitrato de potássio, definidas em ensaios preliminares. Foi utilizado como meio básico, para todas as combinações acima, 15% de sacarose, 0,01% de nitrato de cálcio e 1% de agar. A adição da sacarose justifica-se devido a seu papel como regulador da pressão osmótica entre o meio de cultura e o pólen e como fonte nutricional. Já o cálcio (através do nitrato de cálcio), sua adição foi devido este macroelemento participar da formação da parede celular do grão de pólen, aumentando sua rigidez e estabilidade durante o processo germinativo in vitro. E o agar que, solidificando o meio de cultura favorece a presença do pólen na sua superfície e, deste modo, regula a absorção de oxigênio e nutrientes.

No preparo dos meios de cultura, a sacarose e os demais componentes químicos nutritivos, após serem pesados, foram dissolvidos em água destilada. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,0, através de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, ambos com 0,1N. Após esta operação adicionava-se o agar e, para haver uma completa homogeneização, a mistura foi aquecida

em banho-maria, à temperatura de 100°C. Lâminas de vidro foram colocadas em placas de Petri, sendo em seguida esterilizadas num forno elétrico regulado para a temperatura de 60°C, durante 10 minutos. Após o esfriamento das lâminas colocavam-se quatro gotas do meio de cultura em cada campo, com o auxílio de uma micropipeta com bulbo. A distribuição do grão de pólen na lâmina foi efetuada somente quando o meio adquiria a temperatura ambiente.

Foi utilizada a cultivar 55-4-37, que por pertencer ao grupo "Spanish", possui de acordo com GREGORY et alii (1951), porte ereto e ciclo curto. As flores foram coletadas logo cedo, entre 7:00 e 7:30 horas, e transportadas para o laboratório em recipiente de isopor. Em cada um dos experimentos foram utilizadas aproximadamente 30 flores. Os grãos de pólen foram retirados das anteras, para uma placa de Petri, sacudindo-se as flores, após serem eliminadas todas as peças florais que envolviam as anteras. Devido o pólen apresentar uma certa aglomeração, usou-se um pincel nº 4 na sua separação. A transferência do pólen para o meio de cultura foi efetuada com pincéis desse mesmo tipo, sendo que as lâminas contendo os grãos de pólen permaneciam incubadas em condições de laboratório, por um período de 24 horas. Durante o período de duração do trabalho a temperatura e a umidade relativa oscilaram entre 26 - 28°C e 65 a 80%, respectivamente.

Após as 24 horas de incubação, as contagens dos grãos de pólen foram efetuadas com o auxílio de um microscópio, a um aumento de 20X, sendo o pólen agrupado nas seguintes classes: germinado, iniciado e eclodido. O comprimento do tubo polínico foi obtido com o auxílio de uma ocular micrométrica.

3.1 - Parâmetros Estudados

Os tratamentos foram avaliados através dos seguintes parâmetros:

(1) Percentagem de germinação do pólen;

O pólen foi considerado germinado quando mostrava um tubo polínico igual ou superior ao seu diâmetro, que é de aproximadamente 35 μm .

(2) Percentagem de grãos de pólen de germinação iniciada;

O grão de pólen que apresentasse comprimento do tubo polínico menor que o diâmetro foi considerado em início de germinação.

(3) Taxa de eclosão do pólen;

O grão de pólen não-germinado que apresentasse exudação de líquido protoplasmático foi classificado como eclodido.

As percentagens de germinação, início de germinação e eclosão foram calculadas sobre populações que oscilaram de 80 a 150 grãos de pólen, tomadas ao acaso na objetiva do microscópio.

(4) Comprimento do tubo polínico;

Na determinação do comprimento do tubo polínico foram utilizadas quatro repetições de dez tubos polínicos, por tratamento, selecionados ao acaso, totalizando 40 mediações. Essa medição foi efetuada através de uma ocular micrométrica, sendo os valores registrados em micrômetros (μm).

3.2 - Procedimento Estatístico

Os dados do primeiro experimento (níveis de sacarose) foram analisados estatisticamente com base no delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e quatro repetições. No segundo ensaio (ácido bórico em combinação com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio), foi utilizado um esquema fatorial 5 x 3, no delineamento inteiramente casualizado, com aquele mesmo número de repetições.

A análise de variância foi feita com base em PIMENTEL GOMES (1976), sendo as médias comparadas através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Sacarose

Os resultados obtidos em diferentes concentrações de sacarose, estudadas na germinação de pólen de amendoim in vitro, são apresentados na TABELA 1.

Nos níveis de sacarose estudados não observou-se início de germinação nem eclosão de pólen, demonstrando que uma vez iniciado, o pólen deu curso ao processo de formação do tubo polínico. A não eclosão do pólen pode ser atribuída a uma provável resistência de sua parede cecular. Por outro lado, é possível que, naquelas concentrações, a sacarose proporcione um certo potencial osmótico, controlando a taxa de difusão de água do meio de cultura para o grão de pólen (VISSER, 1955). Por ser a primeira necessidade ao processo germinativo, pouca ou nenhuma embebição de água por parte do pólen pode também ter favorecido para que os grãos permanecessem, em grande parte, inalterados. Tais resultados não estão de acordo com os obtidos por MOORE & JUNG (1974), em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), que, em níveis baixos de sacarose, constataram uma percentagem elevada de grãos de pólen eclodidos e baixa percentagem de grãos iniciados. Com o aumento da sacarose, a taxa de eclosão diminuiu, enquanto que o número de grãos iniciados aumentou.

Além do tratamento com 0% de sacarose, a taxa de germinação do pólen também foi nula no nível de 35%. Tal aspecto pode estar, possivelmente, relacionado com os fatos descritos acima, pois, segundo SANDSTEN (1909), em meios mais concentrados, a embebição de água pelo pólen é mais lenta, o que desfavorece a germinação. Em altas concentrações de sacarose o citoplasma do grão de pólen de coco (*Cocos nucifera* L.) foi plasmo

TABELA 1 - Germinação (%) e comprimento (μm) do tubo polínico de amendoim, em função de oito concentrações de sacarose. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986 ^{1/}.

Sacarose (%)	Germinação (%)	Comprimento do Tubo Polínico (μm)
0	0,00 b	0,00 c
5	1,13ab	60,43ab
10	3,98ab	85,44a
15	4,54a	85,85a
20	2,53ab	65,02ab
25	1,73ab	57,10ab
30	0,43ab	37,51 bc
35	0,00 b	0,00 c

^{1/} - Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem, significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

lisado e a germinação foi nula (LIYANAGE, 1949). A melhor percentagem de germinação (4,54%) foi conseguida na concentração de 15% de sacarose, a qual diferiu significativamente dos níveis com 0 e 35%. Este baixo percentual de germinação pode ser explicado pela ausência de nutrientes no meio utilizado, notadamente cálcio e boro, que desempenham importante papel no processo germinativo do pólen. O uso apenas da sacarose foi com o objetivo de promover o equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o grão de pólen, conforme VISSER (1955), SINHA (1972), AHLÖWALIA (1973), BARROW (1981) e SILVA (1985). Contrariando os resultados obtidos neste trabalho, PERIASAMY & SAMPOORNAM (1983) conseguiram taxas de germinação do pólen de amendoim de 95 - 100%, naquela concentração de sacarose e na presença de sulfato de cálcio, nitrato de potássio, sulfato de magnésio e ácido bórico. Já FERNHOLZ & HINES (1942) observaram que nas concentrações de 1 ou 2% de sacarose houve alguma germinação do pólen de tungue (*Aleurites fordii* Hemsl.), embora a maioria dos grãos tenha eclodido. Com pólen de girassol (*Helianthus annuus* L.), SEETHARAM & KUMARI (1974), na concentração de 15% de sacarose, conseguiram apenas 7 a 8% de germinação.

O comprimento do tubo polínico apresentou comportamento semelhante ao do parâmetro germinação. O nível de 15% de sacarose apenas diferiu significativamente das concentrações de 0% e superiores a 25%, alcançando comprimento da ordem de 85,85 μm . Houve um aumento no comprimento do tubo polínico da concentração de 5 para a de 15% de sacarose, diminuindo em seguida. Em tungue, FERNHOLZ & HINES (1942) observaram que os tubos polínicos dos poucos grãos de pólen que germinaram com 1 ou 2% de sacarose, eclodiram antes de atingir um crescimento apreciável. Quando o teor de sacarose foi aumentado para 10%, a percentagem de germinação e o crescimento do tubo polínico foram elevados. Com amendoim, PERIASAMY & SAMPOORNAM (1983) conseguiram um comprimento máximo do tubo polínico de 800 μm , em 10% de sacarose, enquanto que na concentração de sacarose de 15% atingiu 640 μm . ALMEIDA (1984) observou que não são a percentagem de germinação, bem

como o comprimento do tubo polínico de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) foram reduzidos com a elevação do nível de sacarose a partir de 15%; nesta concentração ele obteve um comprimento de 582,5 μ m.

A FIGURA 1 mostra grãos de pólen não germinados, germinados e o comprimento do tubo polínico de amendoim num meio de cultura com 15% de sacarose.

Na TABELA 2, as análises de variância para percentagem de germinação do pólen e crescimento do tubo polínico apresentaram efeito quadrático, ao nível de 1% de probabilidade.

4.2 - Ácido Bórico

Nesse experimento estudou-se a influência de cinco concentrações de ácido bórico (0,004, 0,008, 0,012, 0,016 e 0,020 %), associadas com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio, na germinação, início de germinação, eclosão e comprimento de tubo polínico de amendoim.

Pelo exame dos dados da TABELA 3, observa-se que os maiores valores de germinação foram conseguidos quando se combinou 0,016% de ácido bórico com cloreto de amônio e com nitrato de potássio. Tais combinações apresentaram, pela ordem, valores de germinação 21,27 e 30,20%, os quais diferiram quando comparados pelo teste de Tukey. PARIASAMY & SAMPOORNAM (1983) obtiveram percentuais de germinação bem mais elevados para pólen de amendoim, sendo que na ausência do boro a taxa de germinação caiu de 100 para 70 - 80%.

As cinco concentrações de ácido bórico quando combinadas com fosfato monoamônico determinaram pequenas diferenças nos percentuais de germinação, os quais quando comparados pelo teste de Tukey não diferiram significativamente.

De um modo geral, pode-se notar que houve aumento crescente na taxa de germinação do pólen de amendoim com a elevação da concentração de ácido bórico até o nível de 0,016%. Es

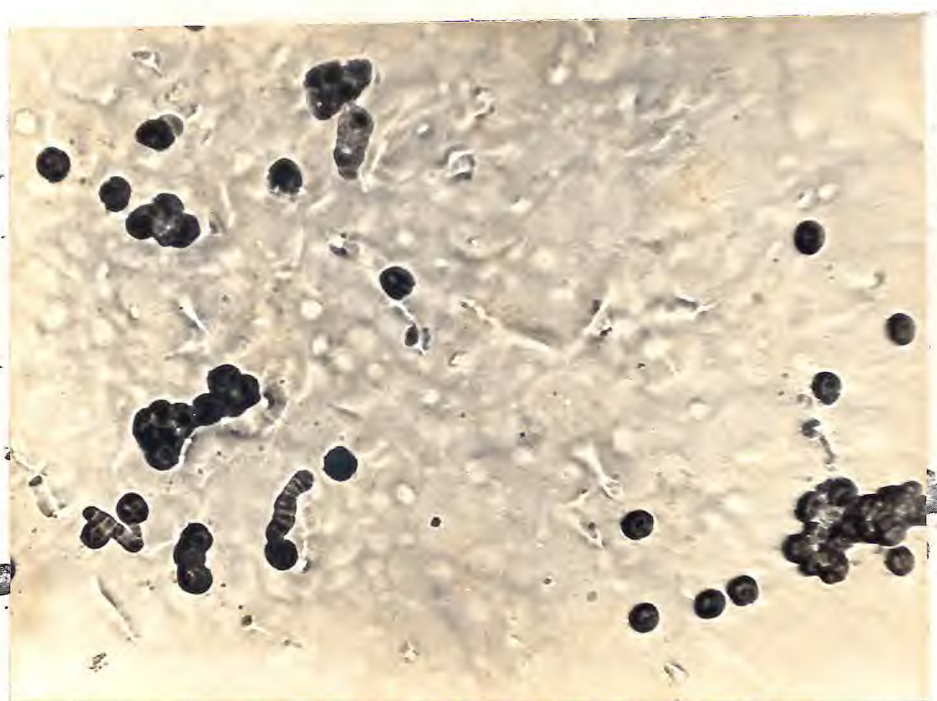


FIGURA 1 - Germinação do pólen (4,54%) e comprimento do tubo polínico (85,85 μm) de amendoim num meio de cultura com 15% de sacarose. 20X.

TABELA 2 - Análises de variância relativas à percentagem de germinação e comprimento do tubo polínico de amendoim, em oito concentrações de sacarose. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Germinação	Comprimento do Tubo Polínico
Regressão linear	1	0,00030n.s.	1.157,31002n.s.
Regressão quadrática	1	0,00613**	27.977,00762**
Regressão cúbica	1	0,00089n.s.	2.136.42432*
Desvio da regressão	4	0,00031	254,60692
(Tratamentos)	(7)	0,00122*	4.612,73852**
Resíduo	24	0,00037	326,80072

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo.

TABELA 3 - Germinação (%) de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986 ^{1/}.

Ácido Bórico (%)	NH ₄ Cl (0,03%)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,01%)	KNO ₃ (0,02%)	$\bar{X}$
0,004	12,91 b A	10,68 A	13,49 b A	12,36 b
0,008	14,50ab AB	8,70 B	17,02 b A	13,41 b
0,012	17,95ab A	11,90 A	18,40 b A	16,08ab
0,016	21,27a B	9,69 C	30,20a A	20,39a
0,020	17,17ab A	7,35 B	14,55 b A	13,02 b
$\bar{X}$	16,76 A	9,66 B	18,73 A	

^{1/} - Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, ou maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

se aumento pode ser devido, principalmente, à sua associação com açúcares para formar o complexo açúcar-borado (ionizável), o qual é transportado com maior facilidade através da membrana celular que as moléculas de açúcar não-boradas (não ionizadas) (GAUCH & DUGGER, Jr., 1953; JOHRI & VASIL, 1961; PFAHLER, 1967; NOGGLE & FRITZ, 1976).

Por outro lado, observando-se o comportamento das demais substâncias nutritivas dentro dos níveis de ácido bórico, verifica-se que, na presença do nitrato de potássio ocorreram os maiores percentuais de germinação. O melhor desempenho do nitrato de potássio pode estar relacionado com as afirmações de BREWBAKER & KWACK (1963), segundo os quais, o íon K tem o papel de auxiliar na absorção e fixação do cálcio, um dos reguladores primários da germinação do pólen (LINSKENS, 1964), o qual se encontrava presente em todos os tratamentos, através do nitrato de cálcio.

Pelos resultados da TABELA 4, nota-se que os grãos de pólen de germinação iniciada não apresentaram diferenças significativas entre as diversas combinações de tratamentos. Entretanto, no geral, houve um crescimento na taxa de início de germinação até o nível de 0,016% de ácido bórico. Comportamento idêntico foi observado nos resultados da TABELA 3. Esta evidência parece indicar que o ácido bórico, na concentração de 0,020%, exerceu certa toxicidade aos grãos de pólen, prejudicando o processo germinativo.

Comparando-se as médias da última linha da TABELA 4, verifica-se que, apesar de não diferirem entre si, o nitrato de potássio e o cloreto de amônio foram superiores ao fosfato monoamônico. A semelhança do observado no percentual de germinação do pólen (TABELA 3), o KNO_3 foi responsável pelos maiores valores de germinação.

Nas condições em que este experimento foi realizado constata-se que as taxas de eclosão do pólen foram bastante reduzidas (TABELA 5). Este aspecto pode estar relacionado com alguma característica genética da espécie estudada, como por exemplo, uma certa resistência da parede do grão, devido à

TABELA 4 - Início de germinação (%) de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986 ^{1/}.

Ácido Bórico (%)	NH ₄ Cl (0,03%)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (0,01%)	KNO ₃ (0,02%)	$\bar{X}$
0,004	0,52	0,00	1,07	0,53
0,008	1,18	0,21	1,05	0,81
0,012	0,74	0,25	1,47	0,82
0,016	1,58	0,55	1,59	1,24
0,020	0,82	0,32	1,52	0,89
$\bar{X}$	0,97 A	0,27 B	1,34 A	

^{1/} - Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 5 - Eclosão (%) de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986.

Ácido Bórico (%)	NH_4Cl (0,03%)	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,01%)	KNO_3 (0,02%)	$\bar{X}$
0,004	0,53	0,21	0,39	0,38
0,008	0,71	0,41	0,76	0,63
0,012	0,94	0,66	1,13	0,91
0,016	0,59	0,58	0,93	0,70
0,020	0,41	0,42	0,35	0,39
$\bar{X}$	0,64	0,46	0,71	

presença do cálcio. Segundo GOVILA & RAO (1970), o cálcio atua como fator primário para prevenir a eclosão do pólen; no estado difusível forma uma impregnação sobre as camadas de pectina da parede do grão de pólen, aumentando sua rigidez e estabilidade, reduzindo, como consequência, o rompimento do mesmo. Também para FARLOW et alii (1979), a taxa de eclosão do pólen está associada com o teor de Ca do meio.

Comparando-se os dados dentro de cada substância à base de macronutrientes observa-se que a taxa de eclosão aumentou com a elevação da concentração de ácido bórico até o nível de 0,012%; a partir desta concentração a percentagem de eclosão diminuiu. Outra hipótese a ser considerada em decorrência dessa baixa taxa de eclosão do pólen de amendoim está relacionada com o equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o grão de pólen. Segundo AHLÖWALIA (1973) a pressão osmótica entre a solução e o pólen afetou a extensão da eclosão do pólen de plantas de *Lilium multiflorum* Lam. SILVA (1985) entende que o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de cultura deve ser a primeira etapa de qualquer estudo de germinação de pólen, visto que, na ausência desse equilíbrio, ocorre aumento no percentual de eclosão e redução na taxa de germinação. Já DICKINSON (1978), afirma que a deficiência do cálcio causa elevada eclosão dos grãos de pólen, pois ocorre uma completa liberação dos açúcares contidos naqueles para o meio de cultura. Uma diminuição na percentagem de germinação dos pólenes de maçã (*Malus domestica* Borkh.) e pera (*Pyrus communis* L.) foi associada com um aumento na percentagem de eclosão dos grãos, conforme VISSER & OOST (1981).

Entre o cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio nota-se um ligeiro acréscimo da taxa de eclosão na presença deste último, o que contraria as afirmações de GOVILA & RAO (1970), segundo as quais o KNO_3 aumenta a eficiência do íon Ca na prevenção da eclosão de grão de pólen em meio artificial.

Na TABELA 6 são apresentados os valores médios do comprimento do tubo polínico. Examinando a referida tabela observa-se que não houve diferença significativa entre as concentra

TABELA 6 - Comprimento (μm) de tubo polínico de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986 ^{1/}.

Ácido Bórico (%)	NH_4Cl (0,03%)	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,01%)	KNO_3 (0,02%)	$\bar{X}$
0,004	240,88 B	449,67 A	426,34 bA	372,30 b
0,008	265,89 B	444,67 A	503,02 bA	404,53 b
0,012	273,39 B	512,19 A	513,85 bA	433,14 b
0,016	290,89 C	595,12 B	801,41a A	562,47a
0,020	315,48 A	466,34 A	461,34 bA	414,39 b
$\bar{X}$	277,31 B	493,60 A	541,19 A	

^{1/} - Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, ou maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

ções de ácido bórico testadas, em relação ao NH_4Cl e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Vale a pena salientar que no cloreto de amônio apesar de apresentar os menores valores de comprimento do tubo polínico, houve uma relação direta entre nível de ácido bórico e aquele parâmetro. Na presença do nitrato de potássio a concentração de 0,016% de ácido bórico foi a que proporcionou o maior comprimento do tubo polínico (801,41 μm), inclusive diferindo estatisticamente das demais. Com uma concentração de 0,015% H_3BO_3 , VASIL (1960) encontrou resultados bem superiores àqueles obtidos em um meio de cultura apenas com sacarose, para o comprimento do tubo polínico da gramínea *Pennisetum typhoideum*; concentrações de ácido bórico de 0,02% em diante inibiram o crescimento do tubo polínico. Entretanto, ALMEIDA (1984) e SILVA (1985) obtiveram, respectivamente, numa concentração de 0,03% de H_3BO_3 , comprimentos dos tubos polínicos de 832,5 μm e 887,5 μm , para pólen de algodão (*Gossypium hirsutum* L.).

Nota-se que entre as substâncias de macronutrientes, o KNO_3 e o $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ foram superiores estatisticamente ao NH_4Cl , apesar de não diferenciarem entre si, nas concentrações de 0,004, 0,008 e 0,012% H_3BO_3 . No nível de 0,016% H_3BO_3 o KNO_3 foi significativamente superior ao $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, enquanto que na concentração de 0,020% H_3BO_3 as três substâncias não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Confrontando-se as FIGURAS 2 e 3, pode-se observar a germinação e, especificamente, a diferença de comprimento do tubo polínico entre cloreto de amônio e nitrato de potássio, ambos com a mesma concentração de ácido bórico (0,016%).

Observa-se que houve uma enorme diferença no comprimento do tubo polínico de amendoim entre os dois experimentos conduzidos. Isto pode ser explicado pela presença de nutrientes ao meio de cultura no segundo ensaio. Além do ácido bórico, o nitrato de cálcio deve ter tido uma participação essencial no crescimento do tubo polínico. Segundo BREWBAKER & KWACK (1963), a alta exigência em cálcio e seu baixo teor na maioria dos grãos de pólen podem dar a este elemento um papel decisivo no crescimento do tubo polínico in vitro e in vivo. De acordo com

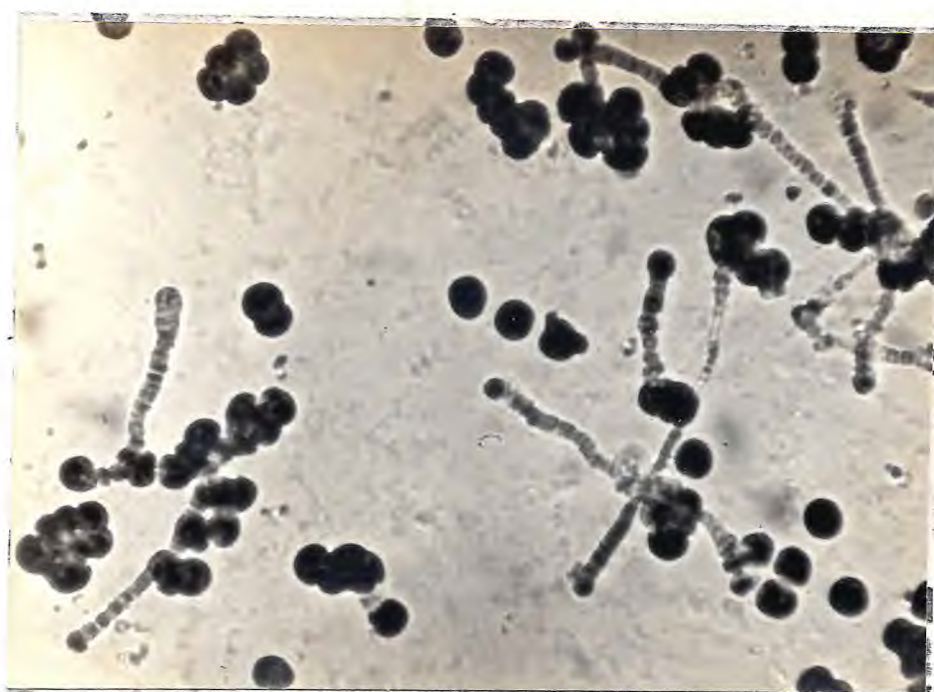


FIGURA 2 - Germinação do pólen (21,27%) e comprimento do tubo polínico (290,89 μm) de amendoim num meio de cultura com 0,03% de cloreto de amônio e 0,016% de ácido bórico. 20X.

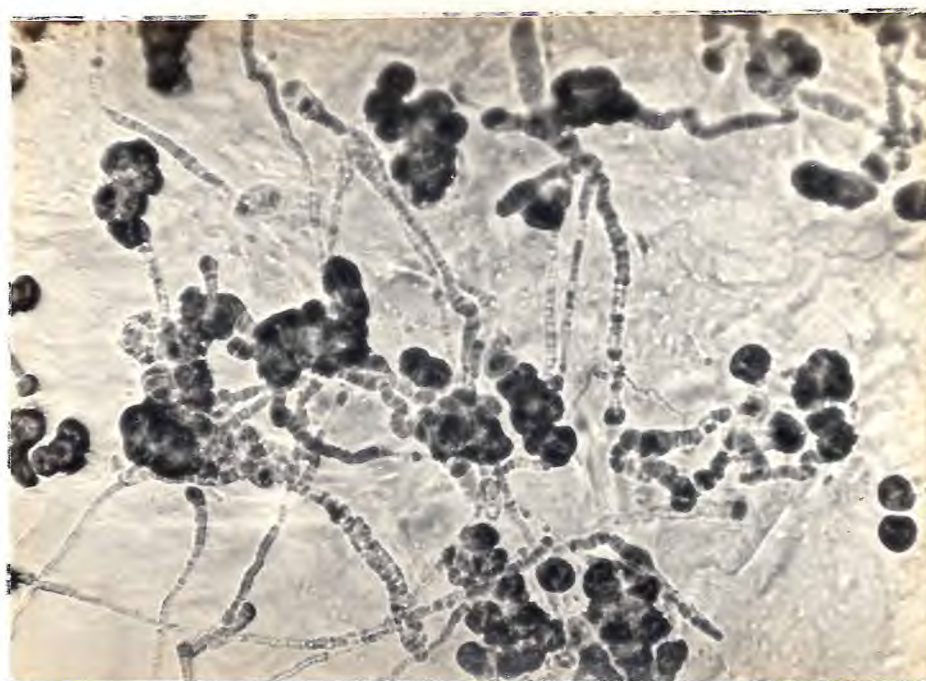


FIGURA 3 - Germinação do pólen (30,20%) e comprimento do tubo polínico (801,41 μ m) de amendoim num meio de cultura com 0,02% de nitrato de potássio e 0,016% de ácido bórico. 20X.

MOORE & JUNG (1974), o cálcio é mais fundamental para o crescimento do tubo polínico que para o início do processo germinativo do grão de pólen. Também para MASCARENHAS & MACHLIS (1962), citados por LEOPOLD & KRIEDEMANN (1975), e FARLOW et alii (1979), o teor de cálcio está positivamente relacionado com o crescimento do tubo polínico no meio, crescimento este que pode estar associado com a presença de alguma enzima envolvida na síntese de auxina (DEVLIN, 1975).

A análise de variância, TABELA 7, mostra dentro do parâmetro germinação que apenas a combinação substâncias nutritivas x 0,004% H_3BO_3 não foi significativa. Com relação a taxa de eclosão, apesar de haver efeito significativo para a interação ácido bórico x substâncias nutritivas, tal fato não ocorreu nas diversas combinações fornecidas pelo desdobramento da mesma. Tanto para início de germinação como para comprimento do tubo polínico (TABELA 8) e interação acima não apresentou significância.

TABELA 7 - Análises de variância relativas às percentagens de germinação e eclosão de pólen de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Germinação	Eclosão
Ácido Bórico (B)	4	0,01313**	0,00004n.s.
Subs. Nutritivas (SN)	2	0,04591**	0,00003n.s.
Interação B x SN	8	0,00509**	0,00001*
Substâncias Nutritivas			
Ácido Bórico/ NH_4Cl	4	0,00399n.s.	0,00001n.s.
Ácido Bórico/ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	4	0,00122n.s.	0,00002n.s.
Ácido Bórico/ KNO_3	4	0,01810**	0,00003n.s.
Ácido Bórico			
SN/0,004% H_3BO_3	2	0,00086n.s.	0,00003n.s.
SN/0,008% H_3BO_3	2	0,00727*	0,00001n.s.
SN/0,012% H_3BO_3	2	0,00566*	0,00001n.s.
SN/0,016% H_3BO_3	2	0,04223**	0,00001n.s.
SN/0,020% H_3BO_3	2	0,01026**	0,00000n.s.
(Tratamentos)	(14)	0,01322**	0,00002n.s.
Resíduos	45	0,00162	0,00005

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo.

TABELA 8 - Análises de variância relativas à percentagem de início de germinação e comprimento do tubo polínico de amendoim, em função da combinação de ácido bórico com cloreto de amônio, fosfato monoamônico e nitrato de potássio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1986.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Início de Germinação	Comprimento do Tubo Polínico
Ácido Bórico (B)	4	0,00007n.s.	64.531,84613**
Subs. Nutritivas (SN)	2	0,00067**	395.614,56050**
Interação B x SN	8	0,00002n.s.	21.894,38256n.s.
(Tratamentos)	(14)	0,00013n.s.	87.465,11186**
Resíduo	45	0,00007	10.586,41991

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

n.s. = não significativo.

5 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados conseguidos e nas condições em que os estudos foram realizados pode-se concluir que:

- 1 - a concentração de 15% de sacarose proporciona tanto o maior percentual (4,54) de germinação do pólen como o maior comprimento do tubo polínico (85,85 μm);
- 2 - nos níveis de sacarose (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35%) estudados, a ausência de outros nutrientes, especialmente cálcio e boro, é o fator responsável pelo baixo percentual de germinação e pouco desenvolvimento do tubo polínico;
- 3 - no estudo das concentrações de ácido bórico (0,004, 0,008, 0,012, 0,016 e 0,02%) adição de 0,01% de fosfato monoamônico resulta na menor percentagem (9,66) de germinação do pólen, enquanto que para o comprimento do tubo polínico o maior desempenho (541,19 μm) é obtido com a adição de 0,02% de nitrato de potássio;
- 4 - o meio básico, constituído de 1% de agar, 15% de sacarose e 0,01% de nitrato de cálcio, na presença de 0,02% de nitrato de potássio e 0,016% de ácido bórico determina o maior percentual (30,20) de germinação e o maior comprimento do tubo polínico (801,41 μm).

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLOOWALIA, B. S. Germination in vitro of ryegrass pollen grains. Euphytica, 22: 575 - 81, 1973.
- ALMEIDA, F. C. G. Effects of short-term storage on viability of pollen from cotton, *Gossypium hirsutum* L. The University of Arkansas, Fayetteville, 1984. 95p. PhD Dissertation.
- ASIF, M. I.; AL-TAHIR, O. A.; FARAH, A. F. The effects of some chemicals and growth substances on pollen germination and tube growth of date palm. HortScience, 18: (3): 479-80, 1983.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DIFUSÃO DE ADUBOS. Manual de adubação. 2. ed. São Paulo, Ave Maria, 1975. 346p.
- BAIR, R. A. & LOOMIS, W. E. The germination of maize pollen. Science, 94: 168 - 9, 1941. Citados por PFAHLER (1965).
- BAMZAI, R. D. & RANDHAWA, G. S. Effects of certain growth substances and boric acid on germination, tube growth and storage of grape pollen (*Vitis spp.*). Vitis, 6 (3): 269-77, 1967.
- BARNES, D. K. & CLEVELAND, R. W. Interrelationship of temperature, sugar concentration, and pollen parent on alfafa pollen germination and tube growth in vitro. Crop Science, 12: 796 - 9, 1972.
- BARROW, J. R. A new concept in assessing cotton pollen germinability. Crop Science, 21: 441 - 3, 1981.

- BREWBAKER, J. L. & KWACK, B. H. The calcium ion and substances influencing pollen growth. In: LINSKENS, H. F. Pollen physiology and fertilization. Amsterdam, North-Holland Publ., 1964. p. 143 - 51. Citados por PFAHLER (1967).
- _____. & _____. The essencial role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot., 50: 859 - 65, 1963.
- BRINK, R. A. The physiology of pollen. Amer. J. Bot., 11: 417 - 63, 1924. Citado por LEOPOLD & KRIEDEMANN (1975).
- CHIANG, M. S. Cabbage pollen germination and longevity. Euphytica, 23 (3): 579 - 84, 1974.
- COOK, F. S. & WALDEN, D. B. The male gametophyte of *Zea mays* L. II. In vitro germination. Can. J. Bot., 43 (7): 779-86, 1965.
- CRANE, J. C.; FORDE, H. I.; DANIEL, C. Pollen longevity in *Pistacia*. California Agriculture, 28 (11): 8 - 9, 1974.
- DEVLIN, R. M. Plant physiology. 3. ed. New York, D. Van Nostrand Company, 1975. 600p.
- DHAWAN, A. K. & MALIK, C. P. Effect of growth regulators and light on pollen germination and pollen tube growth in *Pinus roxburghii* Sarg. Annals of Botany, 47 (2): 239-48, 1981.
- DICKINSON, D. B. Influência of borate and pentaerythritol concentrations on germination and tube growth of *Lilium longiflorum* pollen. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 103 (3): 413-6, 1978.
- FARLOW, P. J.; BYTH, D. E.; KRUGER; N. S. Effect of temperature on seed set and in vitro pollen germination in French

- beans (*Phaseolus vulgaris*). Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb., 19 (101): 725 - 31, 1979.
- FERNHOLZ, D. L. & HINES, L. Preliminary storage experiments with pollen of tung (*Aleurites fordii* Hemsl.). Amer. Soc. Hort. Sci. Proc., 40: 251 - 4, 1942.
- GARCIA GARCIA, J. E. & EGÉA IBÁÑEZ, L. Influencia de la temperatura en la germinación del polen de var. de almendro. Anales Edafol. Agrobiol., 38 (11/12): 2181 - 93, 1979.
- GAUCH, H. G. & DUGGER, Jr., W. M. The role of boron in the translocation of sucrose. Plant Physiology, 28: 457-66, 1953.
- GOSS, J. A. Development, physiology and biochemistry of corn and wheat pollen. Bot. Rev., 34: 333 - 54, 1968. Citado por MOORE & JUNG (1974).
- GOVILA, O. P. & RAO, C. H. Standardization of culture media for in vitro germination of pollen of some crop plants. Indian Plant Breeding, 30 (3): 665 - 7, 1970.
- GREGORY, W. C.; SMITH, B. W.; YARBROUGH, J. A. Morphology, genetics and breeding. In: The peanut. The unpredictable legume. Washington DC, The National Fertilizer Association, 1951. p. 28 - 88.
- HENNY, R. J. Effect of sucrose level, medium composition and pH on the in vitro germination of pollen from *Spathiphyllum floribundum* (Linden & Andre) N. E. Br. Mauna Loa and *Vriesea malzinei* E. Morr. Proc. Fla. State Hort. Soc., 90: 304-6, 1977.
- HOEKSTRA, F. A. & BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. Physiol. Plant., 34: 221 - 5, 1975.

- HOPPING, M. E. & SIMPSON, L. M. Supplementary pollination of tree fruits. III. Suspension media for kiwifruit pollen. N. Z. J. Agric. Res., 25 (2): 245 - 50, 1982.
- JOHRI, B. M. & VASIL, I. K. Physiology of pollen. Bot. Rev., 27 (3): 325 - 81, 1961.
- KUMAR, A. V.; PRASAD, S. V.; RAJESWARA RAO, G. Influence of growth regulators on germination of pollen of three tree species. Indian J. Plant Physiol., 25 (2): 158 - 66, 1982.
- KWAN, S. C.; HAMSON, A. R.; CAMPBELL, W. F. The effects of different chemicals on pollen germination and tube growth in *Allium cepa* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 91: 561 - 2, 1969.
- LEOPOLD, A. C. & KRIEDEMANN, P. E. Plant growth and development. 2. ed. New York, McGraw-Hill Book Company, 1975. 545p.
- LINSKENS, H. F. Pollen physiology. Ann. Rev. Plant Physiol., 14: 255 - 70, 1964.
- LIYANAGE, D. V. Preliminary studies on the floral biology of the coconut palm. Tropical Agriculturist, 105: 171-5, 1949.
- MALAVOLTA, E. Nutrição mineral. In: FERRI, M. G. Fisiologia vegetal. 3. ed. São Paulo, Pedagógica e Universitária, 1979. V. 1, Cap. 2, p. 97 - 113.
- MANN, L. P. & WOODBURY, G. W. The effect of flower age, time of day and variety on pollen germination of onion, *Allium cepa* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 94: 102 - 4, 1969.
- MASCARENHAS, J. P. & MACHLIS, L. The pollen tube chemotropic factor from *Antirrhinum*. Amer. J. Bot., 49: 482 - 9, 1962, Citados por LEOPOLD & KRIEDEMANN (1975).

- MISRA, R. S. Effect of sugar, boron and growth regulators in germinating medium on pollen germination of Java plum (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Indian J. Agric. Sci., 42 (1): 16 - 20, 1972.
- MOORE, P. H. & JUNG, W. L. Studies in sugarcane pollen. I. In vitro germination of pollen. Phyton, 32 (2): 147-57, 1974.
- MOTI. Studies on the morphology and viability of the grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. Punjab Horticultural Journal, 12 (2/3): 101 - 10, 1972.
- NOGGLE, G. R. & FRITZ, G. J. Introductory plant physiology. New Jersey, Prentice-Hall, 1976. 687p.-
- PERIASAMY, K. & SAMPOORNAM, C. Studies on the hypanthial tube, androecium and pollination in *Arachis hypogaea* L. Beitr. Biol. Pflanzen, 58 (3): 403 - 11, 1983.
- PFAHLER, P. L. In vitro germination and tube pollen growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. I. Calcium and boron effects. Can. J. Bot., 45: 839 - 45, 1967.
- _____. P. L. In vitro germination of rye (*Secale cereale* L.) pollen. Crop Science, 5: 597 - 8, 1965.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental. 6. ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1976. 430p.
- RAVINDRAN, P. N. In vitro germination and growth of cacao pollen. Journal of Plantation Crops, 5 (2): 109 - 11, 1977.
- RESNIK, M. E. Fisiología y longevidad del polen en los citrus. Revista de Investigaciones Agrícolas, 12 (3): 311 - 43, 1958.

- ROBERTS, I. N.; GAUDE, T. C.; HARROD, C.; DICKINSON, H. D.
Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea*; a new
pollen germination medium and its use in elucidating the
mechanism of self incompatibility. Theor. Appl. Genet., 65
(3): 231 - 8, 1983.
- SANDSTEN, E. P. Some conditions which influence the
germination and fertility of pollen. Univ. Wisc. Agric. Stn.
Res. Bull., 1 (6): 149 - 72, 1909.
- SAOJI, A. A. & HASTAK, K. S. Effect of different growth media
on germination and preliminary cytochemical analysis of
the germinated pollen in *Ricinus communis* L. Botanique, 10
(1/4): 109 - 18, 1979.
- SEETHARAM, A. & KUMARI, P. K. Studies on in vitro germination
and viability of sunflower (*Helianthus annuus* L.) pollen. J.
Palynol., 10 (2): 149 - 51, 1974.
- SHARMA, D. In vitro pollen germination in *Antirrhinum majus*
L. and *Amaryllis vittata* Ait. New Bot., 7: 203-11, 1980.
- SHARMA, S.; MALIK, C. P.; SINGH, M. B. Optimum cultural requirements
for in vitro germination of *Amaryllis vittata* Ait. (*Amaryl-*
lidaceae) pollen. Proc. Plant. Sci. Indian Acad. Sci., 90
(4): 363 - 9, 1981.
- SILVA, J. F. da. Germinação de pólen de algodão (*Gossypium*
hirsutum L.) in vitro. Fortaleza, Universidade Federal do
Ceará, 1985. 51p. Tese de Mestrado.
- SINGH, R. N.; RANDHAWA, G. S.; SHARMA, D. K. Pollen storage
and pollen germination in fruit crops - a review. Indian J.
Hort., 18: 85 - 96, 1961.
- SINGH, V. B. Effect of different chemicals substances on

pollen germination in pulses. I. *Cicer arietinum* L. New Bot., 7: 187 - 91, 1980.

SINHA, M. M. Pollen viability and pollen storage studies in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Progressive Horticultural, 4 (3/4): 45 - 52, 1972.

SNOPE, A. J. & ELLISON, J. H. Storage of asparagus pollen under various conditions of temperature, humidity and pressure. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 83: 447-52, 1963.

SPISS, L. & HITTLE, C. N. Pollen germination and storage in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). Acta Agrar. Silv. Serv. Agrar., 18 (2): 267 - 77, 1979.

VASIL, I. K. Pollen germination in some Gramineae: *Pennisetum typhoideum*. Nature, 187 (4743): 1134 - 5, 1960.

VISSER, T. Germination and storage of pollen. Medelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen, 55 (1): 1-68, 1955.

_____. & OOST, E. H. Pollen and pollination experiments. III. The viability of apple and pear pollen as affected by irradiation and storage. Euphytica, 30 (1): 65-70, 1981.

_____. & TILLEKERATNE, L. M. de W. Observations on the germination and storage of tea pollen and seed. Tea Quart., 29: 30 - 5, 1958.

WARNOCK, S. J. & HAGEDORN, D. J. Germination and storage of pea (*Pisum sativum* L.) pollen. Agron. J., 48 (8): 347 - 52, 1956.

YADAV, V. B. Effect of some growth regulators on pollen germination and pollen tube growth in *Cassia tora* L. and *Cassia obtusifolia* L. Comp. Physiol. Ecol., 5 (3): 165-8, 1980.

ZIELINSKI, Q. B. Techniques for collecting, handling, germinating, and storing of pollen of the filbert (*Corylus* spp.). Euphytica, 17 (1): 121 - 5, 1968.