

## ESTUDO DA GERMINAÇÃO DO PÓLEN DO ALGODÃO, *GOSSYPIMUM HIRsutum* L., *IN VITRO*: I – EFEITOS DO AGAR, DA SACAROSE E DO CÁLCIO

FRANCISCO CÉLIO G. ALMEIDA \*  
JOSÉ FORTUNATO DA SILVA \*\*  
JOSÉ FERREIRA ALVES \*  
FANUEL PEREIRA DA SILVA \*  
FRANCISCO AÉCIO G. ALMEIDA \*\*

### RESUMO

Estudos em germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L., *in vitro* foram conduzidos visando melhor adequar os níveis de agar, sacarose e nitrato de cálcio. Os níveis de agar (0,8; 1,0; 1,2; 1,5%), sacarose (10; 15; 20; 25%) e nitrato de cálcio (0,055; 0,060; 0,065; 0,070%) foram testados, partindo-se de um meio básico contendo em solução aquosa 1% de agar, 15% de sacarose, 0,090% de sulfato de manganês, 0,030% de ácido bórico, 0,060% de nitrato de cálcio e pH ajustado para 7. Nos níveis estudados, para o agar, o aumento da concentração resultou em melhor desempenho do processo germinativo do pólen. Vinte e cinco por cento de sacarose determinou uma taxa de germinação e um tubo polínico mais longo. O nitrato de cálcio não exerceu influência sobre o crescimento do tubo polínico, entretanto, com concentrações acima de 0,065%, a germinação de pólen é reduzida.

**PALAVRAS-CHAVE:** Germinação de pólen *in vitro*, algodão, solução nutritiva

### SUMMARY

### STUDIES IN COTTON POLLEN GERMINATION *IN VITRO*: I – AGAR, SUCROSE AND CALCIUM EFFECTS

\* Professor do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará e Pesquisador do CNPq. Cx. Postal 3038, 60.000 – Fortaleza, Ceará, Brasil

\*\* Estudante de Mestrado em Fitotecnia do CCA/ UFC

\*\*\* Professor do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e Pesquisador do CNPq.

The effects of agar, sucrose, and calcium nitrate upon pollen germination and tube growth of cotton, *Gossypium hirsutum* L., were studied. The levels of agar (0.8; 1.0; 1.2; 1.5%), sucrose (10; 15; 20; 25%) and calcium nitrate (0.05; 0.060; 0.065; 0.070%) were started from a basal medium containing, in aqueous solution, 1% agar, 15% sucrose, 0.090% manganous sulfate, 0.030% boric acid, 0.060% calcium resulted a better performance of the pollen germination process. Twenty five percent sucrose was found to induce a higher percentage of pollen germinated and the longest pollen tube. The data presentes for calcium nitrate indicated no effect in pollen tube growth, whereas concentrations higher than 0.065% reduced the rate of germination and significantly increased the pollen eclosion.

### INTRODUÇÃO

A viabilidade do pólen pode ser medida através da polinização direta no estigma da flor (*in vivo*) e por germinação em meio artificial específico (*in vitro*). Segundo alguns autores (JANSEN & HERMSEN 8 VISSER et alii<sup>17</sup> e BAR-NABAS & RAJKI<sup>2</sup>) existe uma correlação positiva entre a habilidade do pólen

germinado em meio artificial e a formação de semente *in vivo*.

Agar, sacarose e nitrato de cálcio são algumas das substâncias comumente utilizadas no processo de germinação do pólen *in vitro* (SHARMA et alii<sup>13</sup>; BARROW<sup>3</sup>; PFAHLER et alii<sup>11</sup> e ALMEIDA<sup>1</sup>). A presença do agar, no meio de cultura, para a germinação do pólen, reduz a ocorrência da eclosão e aumenta conseqüentemente a taxa de germinação. BREWBAKER & MAJUNDER<sup>4</sup> constataram que o agar também concorre para um acentuado aumento de vigor de tubo polínico.

Estudos têm demonstrado a existência de uma correlação positiva entre a concentração de sacarose e a porcentagem de germinação de pólen, bem como um positivo efeito nutricional do açúcar para o crescimento do tubo polínico (VASIL<sup>15</sup>). Além do mais a sacarose estabelece o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de cultura (REMY<sup>12</sup>, citado por GARCIA & IBANEZ<sup>6</sup>). NYGAARD<sup>10</sup> conclui que, durante a germinação do pólen, o açúcar é utilizado como substrato respiratório e material para a formação do tubo polínico.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do agar, da sacarose e do cálcio na germinação e desenvolvimento do tubo polínico do algodão.

## MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento deste estudo foi realizado nos Laboratórios de Citogenética e Tecnologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, onde a temperatura do ar variou de 26 a 28°C e a umidade relativa de 65-80%. A coleta das flores do algodão (cv. IAC-13) foi feita diariamente, de 7:30 às 8:30 h da manhã, e transportadas imediatamente para o laboratório.

Três experimentos foram realizados no período de fevereiro a maio de 1985, nos quais níveis de agar (0,8; 1,0; 1,2; 1,5%), sacarose (10; 15; 25%) e nitra-

to de cálcio (0,055; 0,060; 0,065; 0,070%) foram testados partindo-se de um meio básico proposto por ALMEIDA<sup>1</sup>, contendo 1% de agar, 15% de sacarose, 0,090% de sulfato de manganês, 0,030% de ácido bórico, 0,060% de nitrato de cálcio e pH ajustado para 7.

O meio nutritivo de germinação, após preparado, foi adicionado às lâminas com o auxílio de uma micropipeta (para cada tratamento 3 gotas) e, então, armazenadas por um período de aproximadamente 12 horas, em condições de laboratório. Doze a 15 flores foram coletadas e uma massa homogênea de pólen foi formada em uma placa de petri. A polinização das lâminas foi feita com um pincel artístico N.º 4 e, em condições de laboratório, estas ficavam encubadas por 24h. Após esse período, o percentual de germinação e eclosão do pólen, bem como o comprimento do tubo polínico, foram obtidos utilizando-se um microscópio de fabricação "Nikon", equipado com uma ocular micrométrica.

O grão de pólen foi considerado como germinado se o comprimento do seu tubo polínico fosse pelo menos igual ao seu diâmetro. A porcentagem de germinação foi calculada sobre uma população tomada ao acaso, na objetiva do microscópio. Para medir o comprimento do tubo polínico, 20 grãos de pólen, também selecionados ao acaso, por cada tratamento, sendo 4 repetições de 5 pólenes, foram medidos e seus valores registrados em milimicrômetros. O grão de pólen que expeliu líquido protoplasmático e não conseguiu formar o tubo polínico foi considerado eclodido e o percentual de eclosão foi determinado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Agar

Pelos resultados contidos na TABELA 1, observa-se que as concentrações de agar estudadas (0,8; 1,0; 1,2 e 1,5%) mostravam diferenças significativas no comportamento germinativo do grão de

pólen. O aumento da concentração de agar resultou em acréscimo da percentagem de germinação e do comprimento do tubo polínico. A melhor taxa de germinação foi obtida com 1,2% de agar (FIG. 1) e o maior comprimento do tubo polínico com 1,5% (FIG. 2). Estes resultados estão em consonância com os encontrados por BREWBAKER & MAJUMDER<sup>4</sup>. O agar na concentração de 0,8% apresentou a menor percentagem de germinação e o menor comprimento do tubo polínico. ALMEIDA<sup>1</sup> observou que uma elevação acima de 1,0% da percentagem de agar proporcionava um decréscimo tanto na taxa de germinação como no comprimento do tubo polínico. Provavelmente, a ausência de cálcio e manganês, no meio pesquisado pelo autor, deve ter alterado o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio.

As análises de variância (TABELAS 2 e 3) mostram que houve predominância do efeito linear para germinação e o crescimento do tubo polínico, o qual foi significativo ao nível de 1,0% de probabilidade.

Na concentração 0,08% de agar foi observada a maior taxa de eclosão do pólen (TABELA 1), que por sua vez, apresentou a menor percentagem de germinação, enquanto que a menor taxa de eclosão foi obtida na concentração 1,2% que apresentou a maior percentagem de germinação.

A análise de variância (TABELA 2) mostra que houve efeito linear para taxa de eclosão do pólen, ao nível de 1,0% de probabilidade.

Os resultados deste estudo mostram uma tendência de redução da eclosão com a adição de agar até o nível de 1,2%, ao meio de cultura, o que concorda com as conclusões de MOLISCH<sup>9</sup> e ESSER<sup>5</sup>, citados por VISSER<sup>16</sup>.

#### Sacarose

Os resultados apresentados na TABELA 4 mostram que a taxa de germinação e eclosão do pólen, bem como o comprimento do tubo polínico do algo-

dão, foram afetados pelas concentrações de sacarose. Quando a sacarose foi adicionada na concentração de 25,0%, o pólen apresentou maior taxa de germinação e um tubo polínico mais longo (FIG. 3 e 4). Em semelhantes condições experimentais, TAYLOR<sup>14</sup> obteve os mesmos resultados, demonstrando que a sacarose tanto influenciou o equilíbrio osmótico como serviu de substrato nutritivo para o crescimento do tubo polínico. Nas concentrações com 15,0 e 20,0% de sacarose, a diferença não foi estatisticamente significativa para germinação e eclosão do pólen. Com relação ao desenvolvimento do tubo polínico, as concentrações 15,0; 20,0 e 25,0% não diferiram estatisticamente entre si. BARROW<sup>3</sup> observou que a sacarose, até o máximo de 58,1% (1,7 M), não afetava o processo germinativo do pólen do algodão.

Na TABELA 4, pode-se observar, ainda, que a eclosão do pólen decresceu com o aumento da concentração de sacarose. Possivelmente, o desequilíbrio osmótico em nível abaixo de 25,0% provocou a maior taxa de eclosão de pólen.

As análises de variância mostram que, a exemplo do que ocorreu com o meio de cultura com agar, o efeito linear para germinação e eclosão do pólen (TABELA 5) e crescimento do tubo polínico (TABELA 6) foi o mais importante.

#### Nitrato de cálcio

Nas condições em que foi realizado este experimento, as concentrações de nitrato de cálcio superiores a 0,065% reduziram a germinação e aumentaram significativamente a eclosão do pólen do algodão (TABELA 7). Nessa TABELA, observa-se, ainda, que as diferentes concentrações de nitrato de cálcio não afetaram de maneira significativa o comprimento do tubo polínico, embora o seu melhor desenvolvimento tenha sido alcançado com 0,060% (FIG. 5).

As análises de variância revelaram efeitos significativos do nitrato de cálcio

para germinação e eclosão do pólen (TABELA 8) e não significativo para o crescimento do tubo polínico (TABELA 9). A subdivisão dos graus de liberdade para as diferentes concentrações de nitrato de cálcio, em relação à percentagem de germinação e eclosão do pólen, revelou, ao nível de 1,0% de probabilidade, significância estatística para o componente linear.

A comparação das médias da percentagem de germinação e eclosão do pólen, mostrou que não houve diferença significativa entre as concentrações 0,055, 0,060 e 0,065% de nitrato de cálcio (TABELA 7). A concentração 0,070% apresentou a mais baixa taxa de germinação (21,4%) e a mais alta em eclosão (56,3%). Estas concentrações diferiram significativamente das demais, ao nível de 5,0% de probabilidade.

Sendo esperado aumento mais significativo para a percentagem de germinação e menor taxa de eclosão, com a adição de nitrato de cálcio ao meio de cultura, os resultados obtidos neste estudo podem estar relacionados com a ausência de sulfato de magnésio e de nitrato de potássio no meio de cultura, como verificaram GOVILA & RAO7.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, F.C.G. *Effect of short-term storage on viability of pollen from cotton (Gossypium hirsutum L.)*. University of Arkansas, 1984. 95p. PhD Dissertation.
2. BARNABAS, B. and E. RAJKI. Fertility of deepfrozen maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.*, 48: 861-864, 1981.
3. BARROW, J.R. A new concept in assessing cotton pollen germinability. *Crop. Sci.*, 21: 441-443, 1981.
4. BREWBAKER, J.L. and S.K. MAJUMDER. Cultural studies of the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. *Amer. Jour. Bot.*, 48(6): 457-464. 1961.
5. ESSER, K. Genoverdampung and pollens chlauschstum, *Ind. Abst. U. Vererb. Lehre.*, 85: 28-51, 1953.
6. GARCIA, J.E. y.L.E. IBANEZ. Influencia de la temperatura en la germination del polen de var. de almendro. *Anales Edafol. Agrobiol.*, 38(11-12), 1979.
7. GOVILA, O.P. and C.H. RAO. Standardization of culture media for *in vitro* germination of pollen of some crop plants. *Ind. Jour. Genet. Plant. Breed.*, 30: 655-667, 1970.
8. JANSSEN, A.W.B. and J.G. HERMSEN. Estimating pollen fertility in *Solanum* species and naploides. *Euphytica*, 25: 577-586, 1976.
9. MOLISCH, H. Zur physiologies des pollens besonderer rücksicht auf die chamo-tropischer bewgugen der pollen schlauch. *Sitzber. K. Akad Wiss (Wian) Math. Naturw. K.L.*, 102: 423-448, 1893.
10. NYGAARD, P. Utilization of exogenous carbohydrates for tube growth and starch synthesis in pine pollen suspension cultures. *Physiol. Plant.*, 39: 206-210, 1977.
11. PFHALER, P.L., M. WILBOX, D.L. MULCAHY and D.A. KNAUFT. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen X, pollen source genotype and giberellin A<sub>3</sub> interactions. *Acta. Bot. Neerl.*, 31: 105-111, 1982.
12. REMY, P. Contribution a l'étude du pollen des arbres fruitiers a neyau, genre *Prunus*. *Ann. Amelier. Plant.*, 3: 351-388, 1953.
13. SHARMA, S., C.P. MALIK and M.B. SINGH. Optimum cultural requirements for *in vitro* germination of *Amaryllis vitata* Ait (Amaryllidaceae) pollen. *Proc. Ind. Acad. Sci.* 90: 363-365, 1981.
14. TAYLOR, R.M. Germination of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen on an artificial medium. *Crop. Sci.*, 12: 243-244, 1972.
15. VASIL, I.K. Studies on pollen germination of certain cucurbitaceae. *Amer. Jour. Bot.*, 47: 239-247, 1960.
16. VISSER, T. Germination and storage pollen. *Mededelingen van de Landbouwhogeschool te Wageningen/Nederland*, 55(1): 1-68, 1955.
17. VISSER, T., D.P. de VRIES, G.W.H. WELLES and J.A.M. SCHEURINK. Hybrid tea-rose pollen I. Germination and storage. *Euphytica*, 26: 721-728, 1977.

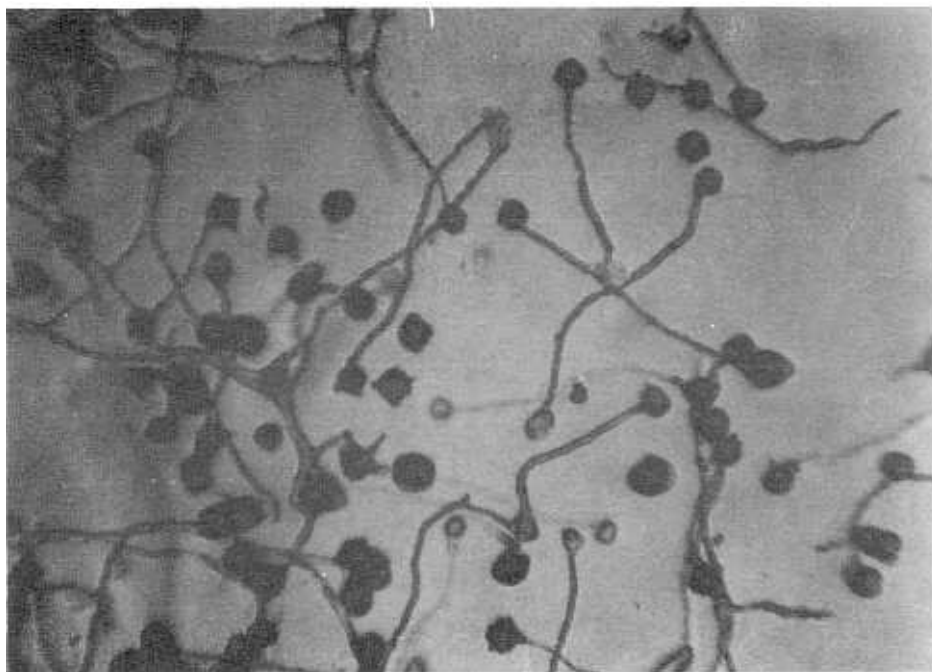


Figura 1 — Germinação do pólen (43,3%) do algodão num meio artificial com 1,2% de agar. 32X.

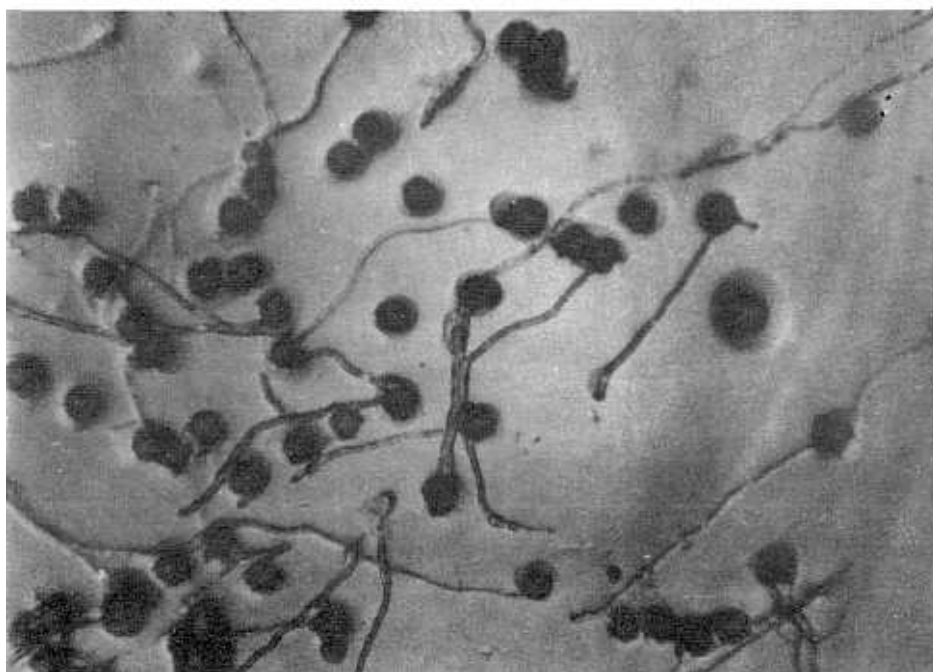


Figura 2 — Comprimento do tubo polínico (1.148,7  $\mu\text{m}$ ) do algodão num meio artificial com 1,5% de agar. 32X.

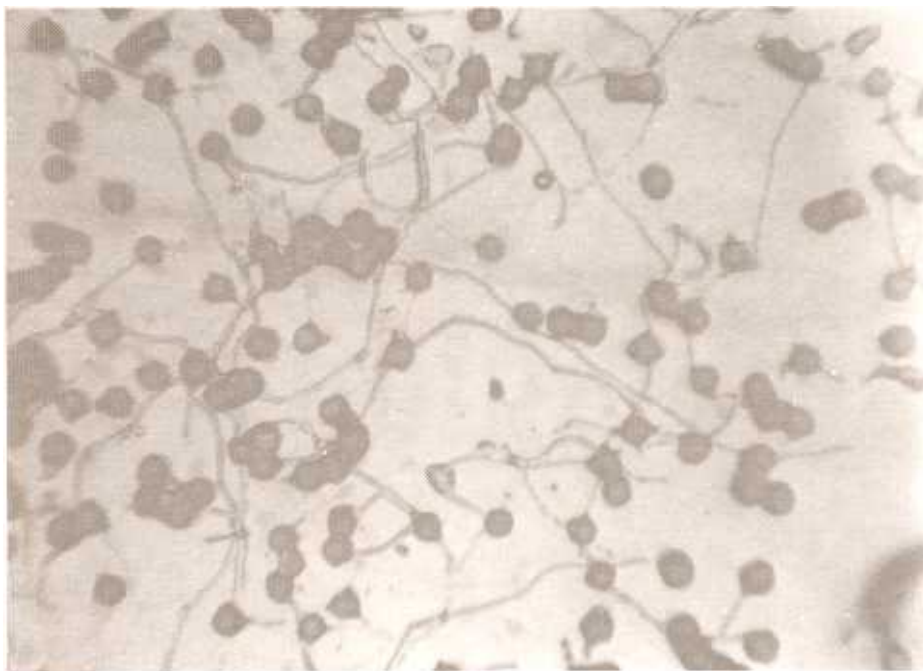


Figura 3 – Germinação do pólen (67,4%) do algodão num meio artificial com 25,0% da sacarose. 32X.

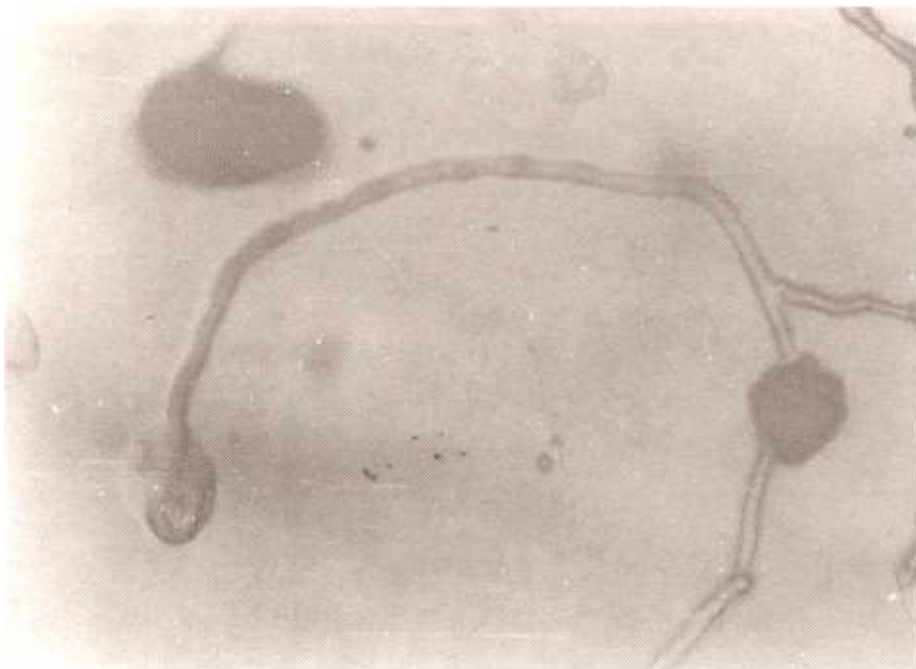


Figura 4 – Comprimento do tubo polínico (1.380,0  $\mu$  m) do algodão num meio artificial com 25,0% de sacarose. 100 X.

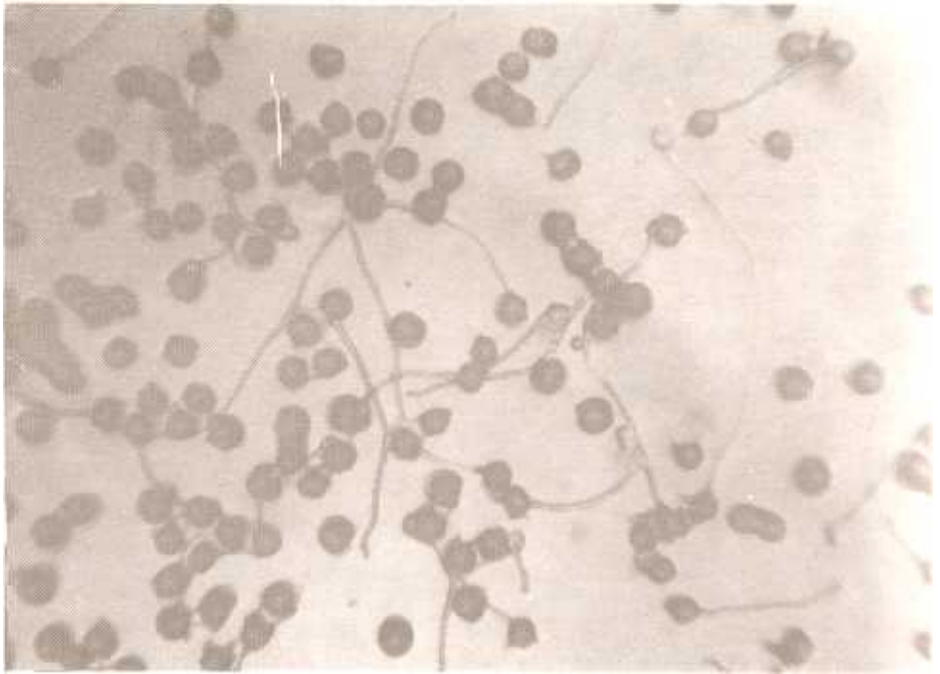


Figura 5 – Germinação do pólen (36,7%) e comprimento do tubo polínico (992,5  $\mu\text{m}$ ) de algodão num meio artificial com 0,060% de nitrato de cálcio. 32X.

TABELA 1

Germinação, Eclosão e Comprimento do Tubo Polínico do Algodão em Função de Quatro Concentrações de Agar. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Agar (%)	Germinação de pólen (%)	Eclosão do pólen (%)	Comprimento do Tubo polínico ( $\mu\text{m}$ )
0,8	20,4 c	57,8 a	696,2 b
1,0	31,9 b	51,2 ab	887,5 b
1,2	43,3 a	35,2 b	881,2 b
1,5	35,9 b	39,8 ab	1.148,7 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 2

Análise de Variância Relativa à Percentagem de Germinação e Eclosão de Pólen em Quatro Concentrações de Agar. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Germinação	Eclosão
Tratamento	3	548,09 **	640,25 **
Regressão linear	1	1.004,22 **	1.467,20 **
Regressão quadrática	1	537,52 **	185,04 n.s
Regressão cúbica	1	102,52 **	268,50 n.s
Resíduo	20	13,33	138,89

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

n.s = não significativo.

TABELA 3

Análise da Variância Relativa ao Crescimento do Tubo Polínico de Algodão em Quatro Concentrações de Agar Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Causa da Variação	G. L.	Quadrado Médio
Tratamento	3	138.468,27 *
Regressão linear	1	365.175,31 **
Regressão quadrática	1	5.814,06 n.s.
Regressão cúbica	1	44.415,31 n.s.
Resíduo	12	23.369,26

\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

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

n.s. = não significativo

TABELA 4

Germinação, Eclosão e Comprimento do Tubo Polínico de Algodão em Função de Quatro Concentrações de Sacarose, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Sacarose (%)	Germinação do pólen (%)	Eclosão do pólen (%)	Comprimento do tubo polínico ( $\mu$ m)
10,0	19,1 c	66,7 a	840,0 b
15,0	34,6 b	42,5 b	1.160,0 ab
20,0	34,1 b	49,7 b	1.193,7 ab
25,0	67,4 a	20,3 c	1.380,0 a

— Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 5

Análise da Variância Relativa à Percentagem de Germinação e de Eclosão de Pólen do Algodão em Quatro Concentrações de Sacarose. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Germinação	Eclosão
Tratamento	3	908,51 **	820,69 **
Regressão linear	1	2.312,04 **	1.937,72 **
Regressão quadrática	1	135,61 **	23,98 n.s.
Regressão cúbica	1	277,98 **	500,08 **
Resíduo	20	9,04	20,37

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

n.s. = não significativo



TABELA 6

Análise da Variância Relativa ao Crescimento do Tubo Polínico de Algodão em Quatro Concentrações de Sacarose. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio
Tratamento	3	211.184,83 *
Regressão linear	1	571.558,05 **
Regressão quadrática	1	21.316,00 n.s.
Regressão cúbica	1	40.680,20 n.s.
Resíduo	12	59.278,27

\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade

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

n.s. = não significativo

TABELA 7

Germinação, Eclosão e Comprimento do Tubo Polínico do Algodão em Função de Quatro Concentrações de Nitrato de Cálcio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Nitrato de Cálcio (%)	Germinação do Pólen (%)	Eclosão do Pólen (%)	Comprimento do Tubo Polínico ( $\mu$ m)
0,055	36,0 a	39,9 b	967,5
0,060	36,7 a	38,0 b	992,5
0,065	37,7 a	40,8 b	811,2
0,070	21,4 b	56,3 a	797,5

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 8

Análise da Variância Relativa à Percentagem de Germinação e de Eclosão de Pólen de Algodão em Quatro Concentrações de Nitrato de Cálcio, Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Germinação	Eclosão
Tratamento	3	358,49 **	427,94 **
Regressão linear	1	547,04 **	808,13 **
Regressão quadrática	1	434,35 **	457,54 **
Regressão cúbica	1	94,06 n.s.	18,15 n.s.
Resíduo	20	39,08	39,28

\*\* = Significativo ao nível de 1% de probabilidade

n.s. = Não significativo

TABELA 9

Análise da Variância Relativa ao Crescimento do Tubo Polínico do Algodão em Quatro Concentrações de Nitrato de Cálcio. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1985.

Causa da Variação	G.L.	Quadrado Médio
Tratamento	3	41.668,10 n.s.
Resíduo	12	17.549,51

n.s. = Não significativo