

Germinação *in vitro* do pólen de *Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann *

Isaac Cohen Antonio **

* Trabalho realizado com recursos da Embrapa.

** Embrapa-CPAA. Manaus (AM). Caixa Postal 319. CEP 69011-970, Manaus (AM), Brasil. E-mail: ica@cpaa.embrapa.br

Resumo

Foram caracterizados cinco estádios da antese da flor de cupuaçuzeiro, com o objetivo de desenvolver uma técnica para teste de germinação *in vitro* do pólen, determinar sua longevidade e qual o melhor estágio para a coleta de pólen fresco para ser usado em polinizações controladas. Verificou-se que o tamanho da amostra para a contagem dos grãos de pólen não precisa ser maior que 300 grãos. Observou-se que grãos de pólen provenientes de estames de uma mesma flor não apresentam germinação uniforme. O estágio da antese que apresenta maior quantidade de pólen viável é o E (cerca de duas horas depois do início da antese, quando a flor se encontra completamente aberta). O pólen conservado no botão floral sob condições ambientes permanece com maior viabilidade até 3 horas após ser retirado da planta (LSD 5%) e pode germinar até 72 horas depois, quando, então, sua viabilidade é baixa, em torno de 5%. Vários meios líquidos e sólidos foram testados contendo soluções de glicose, sacarose, galactose e lactose em várias concentrações com e sem ácido bórico, sendo o melhor meio, para a germinação de pólen de cupuaçuzeiro, o que contém 5% de lactose mais ácido bórico a 0,01% e ágar a 1%, com pH 6,1, onde o pólen desenvolveu bem o tubo polínico. A contagem deve ser feita em até cerca de duas horas, em temperatura ambiente entre 29 e 30 °C; após esse tempo, o tubo se desenvolve muito, dificultando a contagem.

Palavras-chave adicionais: cupuaçuzeiro; polinização artificial; viabilidade do pólen.

Abstract

ANTONIO, I. C. *In vitro* germination of cupuassu [*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann] pollen grain. *Científica*, Jaboticabal, v.32, n.2, p.101-106, 2004.

Five stages of the cupuassu flower anthesis were characterized viewing the development of a technique to test the *in vitro* germination of the pollen grain as well as to determine its longevity and which the best stage to collect fresh pollen grain to be used in controlled pollination. It was verified that the sample size in order to count pollen grains does not need to be larger than 300 grains. Pollen grains originated from stamens in the same flower did not show uniform germination. The anthesis stage E (which took place around two hours after anthesis onset, when the flower was completely open) was that in which the largest number of viable pollen grains was found. The conservation of the pollen grain in the flower, under environmental conditions, allows the highest germination for 3 hours after the flower is separated from the plant. Under this condition, germination is maintained for 72 hours, although total germination after this period drops to very low values, around 5%. Several liquid and solid germination substrata containing glucose, sucrose, galactose, and lactose in different concentrations, with or without boric acid, were tested and the best one was found to be that containing 5% of lactose, boric acid at 0.01%, agar at 1% at a pH of 6.1, under temperatures between 29 and 30 °C, this combination being the one in which the pollen tube showed the best development. The counting of the germinated pollen grains must take place within two hours after germination initiation. Under the temperatures of 29 – 30 °C the pollen tube grows too rapidly making difficult the counting. Additional keywords: artificial pollination; pollen viability.

Introdução

Na aplicação de técnicas de polinização artificial, o conhecimento do tempo de viabilidade do pólen e de receptividade do estigma é de fundamental importância para se obter com sucesso a fecundação da flor.

A germinação do grão de pólen depende de vários fatores, como a pressão osmótica, a concentração e o

tipo de açúcar, a consistência, a temperatura, a umidade, a presença de enzimas e fitormônios no meio. Muitos métodos têm sido usados para verificar a viabilidade do pólen das plantas.

BROWN (1960) e DARLINGTON & LA COUR (1965) recomendaram a técnica da coloração do citoplasma com azul de algodão e lactofenol para verificar a fertilidade

do pólen. LEE (1967) utilizou a técnica do tetrazólio para verificar a respiração do grão de pólen, determinando, assim, sua fertilidade.

GONÇALVES et al. (1982) utilizaram várias concentrações de sacarose, glicose, galactose, lactose e manitol, com e sem ácido bórico, para germinar pólen de *Hevea camargoana*. PAIVA et al. (1983) avaliaram a viabilidade do pólen de cinco clones de seringueira, usando diferentes concentrações de sacarose, galactose, glicose e lactose, e concluíram que o melhor meio para quatro clones foi o que continha sacarose a 10 e 15%, e para o outro, o que continha glicose a 10%, demonstrando haver variação do efeito do meio de acordo com o genótipo.

HONG-QI & CROES (1983) observaram que altas concentrações de prolina (850 mol m^{-3}) conferiram maior germinação do pólen de *Lilium longiflorum* cv. Arai 5, submetido a temperaturas desfavoráveis (0 a 4 °C por 50 horas e 45 °C por 10 minutos). PÁLFI & KÖVES (1984) avaliaram a viabilidade do pólen de milho e centeio pelo conteúdo de prolina, afirmando que a vitalidade e fertilidade do pólen são proporcionais ao seu conteúdo.

SOUSA (1988) testou a viabilidade do pólen de quatro espécies de *Eucalyptus*, em meio contendo 30% de sacarose e 0,8% de ágar, e considerou o período de 24 horas como o mais indicado para a avaliação da germinação. MIRANDA & CLEMENT (1990) testaram meios com glicose, com e sem ácido bórico, sacarose, lactose e galactose, para germinação de pólen de *Bactris gasipaes* H.B.K., obtendo o melhor resultado com sacarose a 2,5%. BARBOSA et al. (1991) pesquisaram vários meios para germinação de pólen de pessegueiro e nectarineira, contendo diferentes concentrações de sacarose, glicose e ácido bórico, com ágar a 0,7% e pH 6,5, encontrando o melhor resultado em meio com solução salina de Murashige & Skoog mais sacarose a 5% e ágar a 0,7%. LACERDA et al. (1995) testaram sete concentrações de sacarose em meio líquido e oito meios sólidos para germinar pólen de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada) e concluíram que o pólen germinou melhor quando incubado em estufa a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em meio de cultura com 10% de sacarose, 0,55 de ágar e 50 mg.dm^{-3} de ácido bórico.

NEVES et al. (1996) testaram quatro concentrações de galactose, glicose, lactose e sacarose, com e sem ácido bórico, para a germinação do pólen de cubiuzeiro (*Solanum tojiro* Humb. & Bonpl.) e cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schummann], alcançando maior germinação em 10, 15 e 20 % de sacarose após 25 horas, sem nenhum efeito do ácido bórico, para as duas espécies.

Neste trabalho, foram testados vários meios de cultura para a germinação do pólen de *Theobroma grandiflorum*, determinado o tamanho da amostra para a contagem dos grãos germinados e não-germinados, observado o tempo de viabilidade do pólen depois de

retirado da planta e identificados os estádios de desenvolvimento do botão floral em que o pólen se encontra com maior viabilidade, com o objetivo de desenvolver uma técnica para teste de germinação *in vitro* do pólen de cupuaçuzeiro, determinar a longevidade do pólen e qual o melhor estágio para a coleta de pólen fresco para ser usado em polinizações controladas.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e no Campo Experimental da Embrapa-CPAA, situado no km 30 da rodovia AM-010, Município de Manaus (AM), entre as latitudes sul de $2^\circ 51' 07''$ e $2^\circ 54' 10''$ e longitudes oeste de $59^\circ 57' 20''$ e $60^\circ 01' 03''$.

Em dias claros, caracterizaram-se cinco estádios da antese da flor de cupuaçuzeiro e o que a precede; em todos eles, havia pólen liberado nas anteras. A descrição que caracteriza cada um dos cinco estádios da antese observados em dia limpo é a seguinte (Figura 1): A – botão totalmente fechado, intumescido; B – botão apresentando pequenas rachaduras na união das sépalas; C – botão com desprendimento de, pelo menos, duas uniões de sépalas, com expansão das pétalas sobrepostas, formando uma barreira por cima do estilete-estigma; D – mais de duas uniões de sépalas desprendidas, com expansão das pétalas começando a distender-se, formando um pequeno orifício em cima do estilete-estigma; E – todas as sépalas desprendidas, pétalas com a extensão distendida, estilete-estigma exposto, cerca de duas horas após o início da antese.

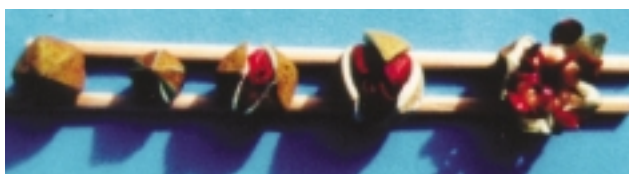


Figura 1 – Cinco estádios da antese de flores de cupuaçuzeiro. *Figure 1 – Five anthesis stages of cupuassu flowers.*

No laboratório, foram feitos, inicialmente, testes preliminares sem contagem dos grãos de pólen germinados, com os açúcares glicose, lactose, galactose e sacarose nas concentrações de 5 e 10%, com e sem ácido bórico a 0,01%. Posteriormente, foram testadas 16 soluções (Tabela 1) e várias combinações delas, das quais as que apresentaram grande número de grãos com formação de calo e/ou tubo polínico foram testadas, com contagem dos grãos germinados. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e desionizada.

As amostras de pólen foram preparadas e contadas em duplicatas em placas de Kline, com o meio de cultura nas escavações; o material foi colocado sobre papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri de vidro, com tampas, para germinar nas condições ambientes do

Tabela 1 – Soluções usadas no teste preliminar de germinação do grão de pólen de flores de cupuaçuzeiro. *Table 1 – Substrata used in the preliminary test for the germination of cupuassu flower pollen grain.*

Soluções/ Substrata	Composição/ Composition
S ₁	100 mg dm ⁻³ H ₃ BO ₃ + 300 mg dm ⁻³ CaCl ₂ + 100
S ₂	mg dm ⁻³ K ₂ NO ₃ + 200 mg dm ⁻³ MgSO ₄
S ₃	Lactose 5%
S ₄	Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01%
S ₅	Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,25%
S ₆	CaCl ₂ 0,03%
S ₇	K ₂ NO ₃ 0,01%
S ₈	MgSO ₄ 0,02%
S ₉	H ₃ BO ₃ 0,01%
S ₁₀	Lactose 4%
S ₁₁	Lactose 3%
S ₁₂	K ₂ NO ₃ 0,02%
S ₁₃	Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,01 % + ágar 1%
S ₁₄	Lactose 2,5%
S ₁₅	Lactose 2,5% + H ₃ BO ₃ 0,01 %
S ₁₆	Lactose 2,5 % + H ₃ BO ₃ 0,01% + ágar 0,1% Lactose 5% + H ₃ BO ₃ 0,03%

laboratório. Determinou-se o tempo de germinação, em torno de 2 horas, para efetuar-se a contagem dos grãos de pólen. Esse tempo é considerado suficiente para que o tubo polínico se desenvolva; com o passar do tempo, o tubo pode desenvolver-se muito, dificultando a contagem. Um detalhe importante não pode ser esquecido quando forem usados os meios com lactose + H₃BO₃ + ágar (Tabela1), tanto em lâminas planas como em lâminas escavadas: o meio deve ser colocado sobre a lâmina, e o pólen, sobre o meio, sem contato das anteras com o meio. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, segura-se o filete do estame sobre o meio e, com um bastão de metal ou outra pinça, dá-se uma ligeira batida na pinça com o estame, repetida várias vezes, para que o pólen se desprenda da antera sobre o meio; esse procedimento evita a formação de uma camada sobre o pólen, que dificultaria as trocas gasosas

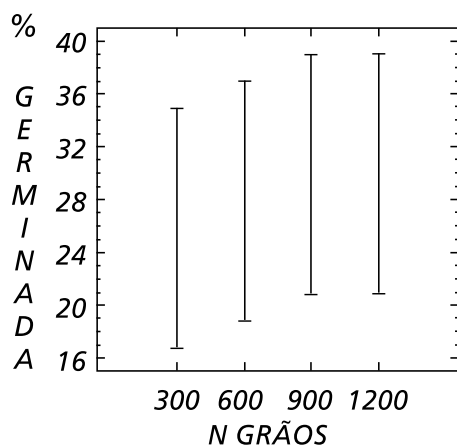


Figura 2 – Intervalos de confiança das médias do pólen de cupuaçuzeiro germinado em quatro amostras de tamanhos diferentes (Tukey 5%). *Figure 2 – Confidence intervals of the mean cupuassu pollen grain germination values when four sample sizes were used (Tukey 5%).*

Tabela 2 – Germinação de grãos de pólen em quatro tamanhos de amostras de seis flores no estádio E (cerca de 2 horas depois do início da antese, quando a flor se encontra completamente aberta), de uma mesma planta de cupuaçu. Os números entre parênteses representam a porcentagem de germinação. *Table 2 – Germination of pollen grains from four sample sizes taken from six flowers at stage E (around two hours after anthesis onset, when the flower is completely open) on the same cupuassu plant. Numbers in parenthesis are percent germination.*

Grãos contados/ Counted grains	Flor 1/ Flower 1	Flor 2/ Flower 2	Flor 3/ Flower 3	Flor 4/ Flower 4	Flor 5/ Flower 5	Flor 6/ Flower 6
300	61 (20,33)	113 (37,67)	47 (15,33)	46 (15,33)	117 (39,00)	81 (27,00)
600	140 (23,33)	228 (38,17)	118 (19,67)	91 (15,17)	170 (45,00)	156 (26,00)
900	259 (28,78)	354 (39,33)	177 (19,67)	157 (17,44)	433 (48,11)	235 (26,11)
1.200	379 (31,58)	470 (39,17)	217 (18,08)	209 (17,42)	543 (45,25)	337 (28,08)
CV (%)	16,99	1,78	8,95	6,68	7,48	3,12

e o desenvolvimento do tubo polínico.

Um ensaio, para determinar o número de grãos a serem contados, foi realizado com seis botões de uma mesma planta, no estádio E (Tabela 2). Procedeu-se à contagem em faixas alternadas, segundo o método de ANTONIO (1985), em microscópio óptico, com objetiva 10/0.30 e ocular P16 ´ 12.25. Como não houve variação alta entre as contagens dos grãos de pólen, adotou-se a contagem de 300 grãos.

Durante os testes preliminares, observou-se que a germinação do pólen não era uniforme nos cinco estames de uma mesma flor. Então, procedeu-se a um teste com contagem de grãos de pólen, para verificar essa

Tabela 3 – Germinação de grãos de pólen, de flores de cupuaçu de uma mesma planta, no estádio E (cerca de 2 horas depois do início da antese, quando a flor se encontra completamente aberta). *Table 3 – Germination of pollen grains from flowers at stage E (around two hours after anthesis onset, when the flower is completely open) on the same cupuassu plant.*

Flor/ Flower	Estame 1/ Stamen 1	Estame 2/ Stamen 2	Estame 3/ Stamen 3	Estame 4/ Stamen 4	Estame 5/ Stamen 5	CV (%)
1	278	294	214	206	277	16,01
2	270	66	149	170	49	63,16
3	271	188	244	101	188	32,91
4	170	68	170	93	241	46,49
5	85	83	100	224	2	80,79

variação, usando-se cinco botões no estádio E, coletados em uma mesma planta, retirando-se cuidadosamente cada estame junto com a cogula, com auxílio de uma

pinça de ponta fina, colocando o pólen de cada estame para germinar em lâminas separadas, em meio com a solução S_4 (Tabela 1), tendo-se o cuidado de flambar a pinça após o preparo de cada lâmina. Os resultados, com alto coeficiente de variação (Tabela 3), fizeram com que fosse adotado o procedimento de usar todos os estames de um mesmo botão no preparo de uma mesma amostra.

Um teste para constatar qual dos estádios da antese apresenta maior porcentagem de pólen viável, a fim de testar o melhor meio para germinação, foi realizado com botões nos estádios A (fechado), B (no início da antese) e E (flor completamente aberta, isolada antes da antese, para evitar contaminações). Procedeu-se à análise de variância e ao teste Tukey, com 5% de probabilidade.

A viabilidade do pólen foi testada de hora em hora, até 6 horas, para verificar qual o período de maior viabilidade, depois de ter sido retirado da planta e conservado no botão. Para isso, foram utilizados dois botões no estádio E, de três plantas com fenótipos diferentes, que foram isolados antes da antese. Outro teste foi realizado para verificar a longevidade do pólen, usando dois botões de cinco plantas com diferentes fenótipos, que, depois de terem sido retirados das plantas, foram conservados em ambiente com temperatura de 27 °C e 75% de umidade relativa do ar.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos com os testes preliminares mostraram que os grãos germinaram em lactose a 5% sem ácido bórico, em glicose e em galactose a 5% com ácido bórico, sendo que, em glicose a 5% com ácido bórico, rompeu-se a exina de muitos grãos e, em glicose a 5% com ácido bórico, rompeu-se o tubo polínico dos grãos germinados. Todas as concentrações de 10% de açúcar, após duas horas, causaram plasmólise nos grãos de pólen, demonstrando que o meio estava mais concentrado que o citoplasma do pólen.

O ensaio para determinar o número dos grãos de pólen a serem contados mostrou não haver diferença significativa ($P < 0,05$) nas porcentagens de grãos

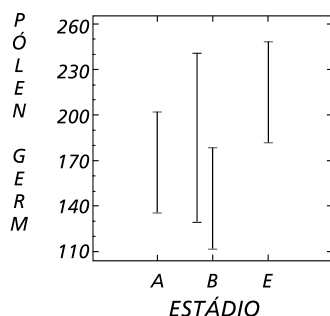


Figura 3 – Intervalo de confiança das médias da germinação do pólen de cupuaçuzeiro em três estádios (Tukey a 5%). *Figure 3 – Confidence intervals of the mean values of cupuassu pollen germination when harvests were made in three developmental stages (Tukey 5%).*

germinados, entre amostras de 300, 600, 900 e 1.200 grãos contados (Tabela 2), não havendo razão para se fazer contagem com mais de 300 grãos, como já havia sido constatado por SOUSA (1988), trabalhando com eucalipto.

O teste para constatação do estádio que apresenta maior quantidade de pólen viável mostrou não haver diferença significativa ($P > 0,05$) entre a quantidade de pólen viável nos estádios A e E (Figura 3). Como a identificação do botão no estádio A requer certa prática, e o estádio B é de curta duração (menos de dez minutos em dias limpos), recomenda-se isolar o botão no estádio A, com material citado por ANTONIO et al. (2004) e, após cerca de 2 horas, quando o botão atingir o estádio E, proceder à sua coleta para a utilização do pólen na polinização controlada.

O pólen de cupuaçuzeiro germinou bem nos meios 1 e 6 (Tabela 4), não havendo diferença significativa ($P > 0,05$) entre esses meios (Figura 4). O tubo polínico apresentou-se bastante desenvolvido após duas horas (Figura 5). Testes mostraram que o meio 6 pode ser conservado em geladeira por 83 dias, apresentando bons resultados.

Tabela 4 – Teste de contagem dos grãos de pólen germinados de flores de cupuaçuzeiro no estádio E (cerca de 2 horas depois do início da antese, quando a flor se encontra completamente aberta). *Table 4 – Germination of pollen grains from cupuassu flowers harvested at stage E (around two hours after anthesis onset, when the flower is completely open).*

Meio/ Mediã	Soluções (proporções)/ Substrata (proportions)	R ₁	R ₂	R ₃	X(%)	pH
1	S_4	296	242	195	244 (81)	4,8
2	$S_2+S_7+S_8$ (1:1:1)	69	20	20	36 (12)	5,0
3	S_2+S_6 (1:1)	0	0	0	0 (0)	4,8
4	$S_{10}+S_8$ (1:1)	0	0	0	0 (0)	4,9
5	$S_2+S_5+S_6+S_7+S_8$ (3:1:1:1:1)	0	0	0	0 (0)	5,4
6	S_{12}	299	300	300	300 (100)	6,1
7	$S_{13}+S_8$ (1:1)	7	3	9	6 (2)	5,0
8	S_{14}	4	7	0	4 (1)	4,8
9	S_{15}	0	0	59	20 (7)	5,1
10	S_2+S_8 (1:1)	1	46	8	18 (6)	4,9

O teste para verificar quanto tempo o pólen permanece viável, após ter sido retirado da planta, mostrou que não existe diferença significativa na viabilidade do pólen, pelo teste LSD a 5%, até 3 horas depois de retirado da planta e conservado no botão floral em condições ambientes. Para assegurar o uso de pólen com alta viabilidade, recomenda-se que, após ser retirado da planta, seu uso não ultrapasse 2 horas (Tabela 5 e Figura 6).

O teste para verificar a longevidade do pólen em condições ambientes mostrou que o pólen permanece viável até 72 horas depois de retirado da planta e

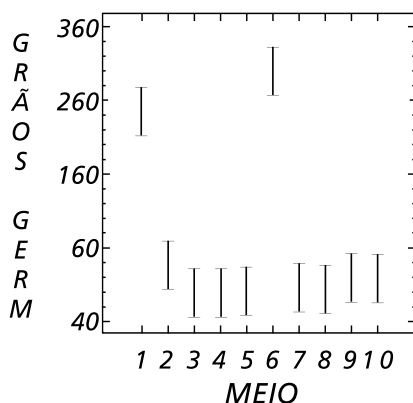


Figura 4 – Intervalo de confiança das médias de pólen de cupuaçuzeiro germinado em dez diferentes meios (Tukey 5%). *Figure 4 – Confidence intervals of the mean values of cupuassu pollen germination when the germination test was conducted in ten different substrata (Tukey 5%).*

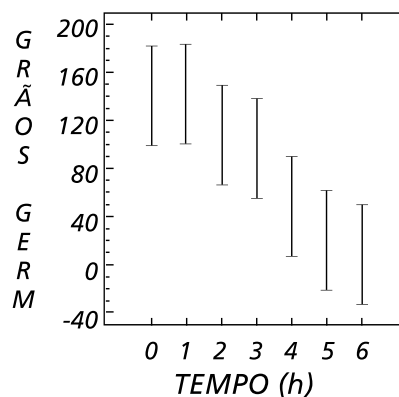


Figura 6 – Intervalo de confiança das médias do pólen de cupuaçuzeiro germinado depois de retirado da planta e conservado no botão floral (LSD 5%). *Figure 6 – Confidence intervals of the mean values of cupuassu pollen grain germination when the pollen was harvested and stored in the flower bud (LSD 5%).*

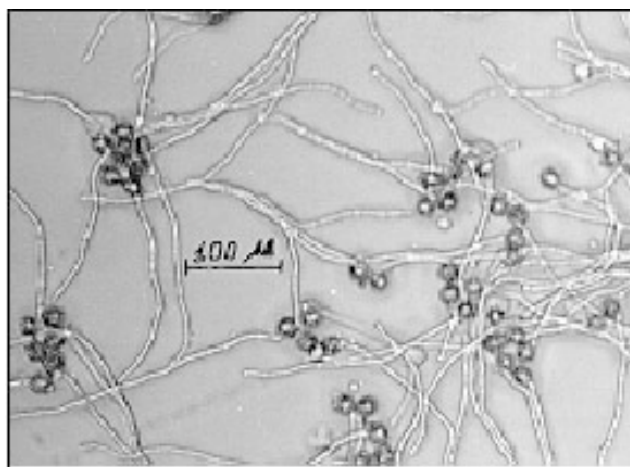


Figura 5 – Tubo polínico de cupuaçuzeiro após 2 horas no meio 6 (5% de lactose + 0,01 de H_3BO_3 + 1% de ágar). *Figure 5 – A cupuassu pollen tube 2 hours after its staying in medium 6 (5% lactose + 0.01 H_3BO_3 + 1% agar).*

Tabela 5 – Viabilidade dos grãos de pólen após serem retirados da planta de cupuaçuzeiro, no estágio E (cerca de 2 horas depois do início da antese, quando a flor se encontra completamente aberta). Média de dois botões por planta. *Table 5 – Cupuassu pollen grain viability when the flowers were harvested at stage E (around two hours after anthesis onset, when the flower is completely open). Mean of two flowers per plant.*

Tempo (h)/ Time (h)	Planta 1/ Plant 1	Planta 2/ Plant 2	Planta 3/ Plant 3	\bar{X}	%
0	255,5	56,5	139,5	150,50	46,83
1	229,0	32,0	164,0	141,67	47,22
2	167,0	30,5	125,0	107,50	35,83
3	207,0	0,0	81,5	96,17	32,06
4	83,5	0,0	60,5	48,00	16,00
5	37,5	0,0	22,0	19,83	6,61
6	2,5	0,0	21,5	8,00	2,67

conservado no botão floral; no entanto, sua viabilidade decresce e, no final desse período, é de cerca de 5% (Tabela 6).

Tabela 6 – Viabilidade dos grãos de pólen de cupuaçu depois de retirados da planta e conservados em ambiente com temperatura de 27 °C e 75% de umidade relativa do ar. Média de dois botões nos estádios A (fechado) e B (no início da antese), de cinco plantas. *Table 6 – Cupuassu pollen grain viability when the flowers were harvested at stages A (closed) and B (at the beginning of anthesis) and the grains stored under a temperature of 27 °C and relative humidity of 75%. Mean of two flowers taken from five plants.*

Tempo (h)/ Time (h)	Germinados/ Germinated	%
0	200	66,67
24	39	13,00
48	31	10,33
72	17	5,67

Conclusões

Os resultados permitem concluir que a germinação do pólen dos estames de uma mesma flor não é uniforme. Por isso, recomenda-se usar todos os estames de uma flor para preparar uma amostra.

Não é necessário contar mais do que 300 grãos de pólen por amostra.

O estágio em que deve ser coletado o botão para fins de polinização artificial, ou testes de germinação, é o E (todas as sépalas desprendidas, pétalas com a extensão distendida, estilete-estigma exposto, cerca de duas horas após o início da antese).

O pólen coletado deve ser usado, preferencialmente, até duas horas depois de coletado, quando se encontra com maior viabilidade.

Um ótimo meio para a germinação do pólen de cupuaçuzeiro é 5% de lactose + 0,01 de H₃BO₃ + 1% de ágar, com pH 6,1.

O pólen de cupuaçuzeiro coletado de botões no estágio E pode permanecer viável até 72 horas depois de coletado da planta e conservado no botão em condições ambientes, porém, no final desse período, sua viabilidade é baixa (cerca de 5%).

Referências

- ANTONIO, I. C. Preferência das abelhas *Melipona seminigra merrillae* Cockerell instaladas em plantio de guaraná (*Paullinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis*) na coleta de pólen. Manaus: Fundação Universidade do Amazonas, 1985. 62 p.
- ANTONIO, I. C.; SOUSA, N. R.; NUNES, C. D. M. Testes de campo para a polinização controlada da flor do cupuaçuzeiro (nota científica). *Científica*, Jaboticabal, v.32, n.1, p.82-84, 2004.
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; MARTINS, F. P.; BOAVENTURA, Y. M. S. Conservação e germinação do pólen, polinização e frutificação efetiva em pessegueiros e nectarineiras subtropicais. *Bragantia*, Campinas, v.50, n.1, p.17-28, 1991.
- BROWN, C. A. *Palynological techniques*. Baton Rouge: C. A. Brown, 1960. 188 p.
- DARLINGTON, C. D.; LA COUR, L. F. *The handling of the chromosomes*. 4th. ed. London: George Allen & Unwin, 1966. 263 p.
- GONÇALVES, P. de S.; PAIVA, J. R. de; REBELLO, A. P. "In vitro" pollen germination of *Hevea camargoana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.17, n.2, p.287-291, 1982.
- HONGI-QI, Z.; CROES, A. F. Protection of pollen germination from adverse temperatures: a possible role for proline. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v.6, p.471-476, 1983.
- LACERDA, C. A. de; OLIVEIRA, L. M. de; ALMEIDA, E. C. de; LIMA, J. O. G. de. Meio de cultura e condições ideais para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada. *Revista Ceres*, Viçosa, v.42, p.308-318, 1995.
- LEE, A. E. *Crescimento e desenvolvimento das plantas*. São Paulo: Edart, 1967. 96 p.
- MIRANDA, I. P. de A.; CLEMENT, C. R. Germinación y almacenamiento del polen de pejibaye (*Bactris gasipaes* H. B. K., Palmae). *Revista de Biología Tropical*, San José, v.38, n.1, p.29-33, 1990.
- NEVES, T. S.; MACHADO, G. M. E.; OLIVEIRA, R. P. Efeito do tipo e concentração de carboidratos e ácido bórico na germinação de grãos de pólen de cubiuzeiro e cupuaçuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14.; REUNIÃO INTERAMERICANA DE HORTICULTURA TROPICAL, 42.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MIRTÁCEAS, 1., 1996, Curitiba. *Resumos...* Curitiba: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1996. p.213.
- PAIVA, J. R. de; GONÇALVES, P. de S.; REBELLO, A. P. Germinação de pólen in vitro de alguns clones de seringueira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. v.18, n.9, p.1021-1029, 1983.
- PÁLFI, G.; KÖVES, E. Determination of vitality of pollen on the basis of its amino acid content. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, Jena, v.179, p. 237-240, 1984.
- SOUSA, V. A. de. *Manejo e viabilidade de pólen de Eucalyptus spp.* 1988. 155f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.