

CONSERVAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE GRÃO DE PÓLEN DE MILHO

CLARISSA ALVES FERREIRA¹, ÉDILA VILELA DE REZENDE VON PINHO², PATRÍCIA DE OLIVEIRA ALVIM³, VINÍCIUS DE ANDRADE⁴, TANISMARE TATIANA DE ALMEIDA SILVA⁵ e DEISY LÚCIA CARDOSO⁶

¹Eng. Agrônoma, M.Sc., aluna do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UFLA. Rua Afonso Pena, 250, Ignacio Valentini, CEP 37200-000, Lavras, MG. Fone: (35) 3821-5933 e (35)9821-9642. E-mail: clarissaaf04@yahoo.com.br (autora para correspondência)

²Eng. Agrônoma, Dra., Professora adjunta do Departamento de Agricultura da UFLA, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG. E-mail: edila@ufla.br

³ Eng. Agrônoma, M.Sc., aluna do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UFLA. Caixa postal 3037, CEP 37200-00, Lavras, MG. E-mail: patriciadeoliveiraalvim@yahoo.com.br

⁴ Eng. Agrônomo, R. Eduardo Gomes, 84, Bairro Vila Nova, CEP 37260000, Perdoes, MG. Email: vinicius@shsnet.com.br

⁵ Eng. Agrônoma, MSc., aluna do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UFLA, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG. Email: mareagro@bol.com.br

⁶ Eng. Agrônoma, MSc., aluna do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UENF "Darcy Ribeiro", Av. Alberto Lamego, 637, Bl 06, apto 002, B. Horto, CEP 28016 – 81, Campos dos Goytacazes, RJ. Email: deisycardoso@hotmail.com

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.6, n.2, p.159-173, 2007

RESUMO - Em programas de melhoramento de milho, fatores relacionados à duração do tempo de receptividade do estigma, longevidade do grão de pólen na planta, diferenças no período de florescimento entre plantas e conservação dos recursos genéticos são alguns aspectos que reforçam a importância do armazenamento de grãos de pólen. Na presente pesquisa, foi avaliada a influência do teor de água, do tempo e dos ambientes de armazenamento sobre a viabilidade e a germinação de grãos de pólen de milho. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Análise de Sementes e de Biologia Molecular do setor de sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da UFLA. Nos pré-testes, foram verificados diferentes meios de cultura para avaliação da germinação *in vitro*, assim como o melhor horário de coleta dos grãos de pólen. Foi avaliada, ainda, a germinação dos grãos de pólen sob diferentes teores de água: 51,7%, 29,4%, 21,7%, 17,7% e 17,6%. Em um segundo experimento, os grãos de pólen, com teores de água de 51,7%, 29,4% e 21,7% foram armazenados em deep freezer (-86°C), geladeira (4°C) e em nitrogênio líquido (-193°C) por quatorze e trinta dias. Após o armazenamento, a germinação e a viabilidade dos grãos de pólen foram avaliadas *in vitro*, em meio de cultura, e por meio do teste de tetrazólio, respectivamente. A viabilidade dos grãos de pólen armazenados, por 14 dias, com diferentes teores de água e ambientes de armazenamento, também foi testada *in vivo*, por meio de autofecundações, em plantas da linhagem Le-57 e do híbrido GNZ 2004, quando ambos apresentavam estilos-estigmas receptivos. Para a avaliação da germinação e da viabilidade dos grãos de pólen, foi seguido o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 (tempo de armazenamento) x 3 (teor de água de grãos de pólen) x 3 (ambientes de armazenamento), com quatro repetições. Nos pré-testes, maiores valores de germinação dos grãos de pólen foram observados em meio de cultura contendo 10% de sacarose, 0,03% de ácido

bórico e 0,15% de cloreto de cálcio (M2) e quando a coleta foi realizada às 9 horas. A viabilidade dos grãos de pólen foi reduzida substancialmente abaixo de 21,7% de teor de água, indicando que os mesmos não toleram a dessecação. Para melhor conservação, durante o armazenamento, os grãos de pólen deverão ser secados até 21,7% de teor de água e armazenados em nitrogênio líquido.

Palavras-chave: *Zea mays*, armazenamento, germinação, tubo polínico.

CONSERVATION AND DETERMINATION OF THE VIABILITY OF MAIZE POLLEN GRAIN

ABSTRACT – In maize breeding programs, factors related to receptivity length of stigma, longevity of pollen grain in the plant, differences in the period of blossoming among plants and conservations of the genetics resources are some aspects that reinforce the importance of pollen grains storage. In this research the influence of water tenor, period and storage environment were evaluated in regard to the viability and germination of maize pollen grains. The assays took place in laboratories of Analyses of Seed Molecular Biology of the seeds sector and in the experimental area of Agricultural Department of UFLA. In the pre-tests, different culture methods were verified to evaluate the *in vitro* germination as well the best time to collect the pollen grains. The germination pollen grains in different water tenors was also evaluated: 51,7%; 29,4%, 21,7%; 17,7%; 17%. In a second experiment the pollen grains with water tenors of 51,7%; 29,4%; 21,7% were stored in deep freezer (-86°C), fridge (4°C), and liquid nitrogen (-193°C) for 14 and 30 days. After the storage, the germination and viability of pollen grains were evaluated *in vitro* in culture medium and through the tetrazoilium test, respectively. The viability of stored pollen grain for 14 days in different water tenors and storage places/environment was also tested *in vivo* through auto fecundation in plants of Le-57 inbred lines and GNZ 2004 hybrid, when both showed receptive style-stigmas. For the evaluation of germination and viability of pollen grains, a completely randomized design was used, in factorial scheme 2 (period of storage) x 3 (water tenors of pollen grains) x 3 (places storage), with four repetitions. In the pre-tests higher values of germination of pollen grains were observed in culture medium containing 10% sucrose; 0,03% boric acid; 0,15% calcium chloride (M2), and when the collection took place at 9 a.m. the viability of pollen grains was reduced substantially below 21,7% of water tenor indicating they don't tolerate the desiccation. For a better conservation during the storage, the pollen grains should be dried until 21,7% of water tenor and storage in liquid nitrogen.

Key words: *Zea mays*, storage, pollen grains, germination, pollen tubes.

Nos programas de desenvolvimento de híbridos, há necessidade de cruzamento entre diferentes genótipos, para se testar a capacidade combinatória dos mesmos. No entanto, é comum a necessidade de cruzamento entre materiais de ciclos distintos, não havendo, dessa maneira, o

sincronismo no florescimento, o que inviabiliza a produção de sementes. Uma ferramenta de grande aplicabilidade nessa situação é o armazenamento do grão de pólen, visando preservar a viabilidade dos gametas masculinos por diferentes períodos, sob condições artificiais.

O armazenamento do grão de pólen, além de possibilitar o cruzamento entre cultivares de ciclos diferentes, permite a perpetuação de populações de plantas macho-estéreis, utilizadas na formação de híbridos, sem a necessidade de cultivo alternado, no campo, de linhagens mantenedoras. Fatores como a duração do tempo de receptividade do estigma, longevidade do grão de pólen na planta, diferenças no período de florescimento entre plantas macho-férteis e macho-estéreis e conservação dos recursos genéticos são alguns aspectos que reforçam a importância da preservação da viabilidade de grãos de pólen durante o armazenamento, sob condições artificiais (Ganeshan, 1986). Deve ser ressaltado, ainda, que a longevidade do grão durante o armazenamento deve ser conhecida, para o planejamento das hibridações artificiais em programas voltados para o desenvolvimento de híbridos.

A viabilidade do grão de pólen pode ser influenciada por fatores genéticos, fisiológicos e físicos do próprio grão de pólen e pelas condições ambientais de armazenamento, como a umidade relativa do ar, temperatura e presença de O_2 . Há tendência de redução dessa viabilidade ao longo do armazenamento (Stanley & Linskens, 1974). Tem-se observado, ainda, em alguns estudos, que o desenvolvimento e a viabilidade do grão de pólen podem ser afetados negativamente por deficiências de micronutrientes como cobre, zinco (Sharma et al., 1979, 1987, 1990), boro, molibdênio (Agarwala et al., 1979) e manganês (Sharma et al., 1991).

Além dos fatores fisiológicos, os físicos também podem interferir na conservação do grão de pólen. O teor de água do pólen é um dos fatores que influenciam na conservação do mesmo durante o armazenamento e normalmente encontra-se negativamente relacionado à longevidade. Há necessidade de redução do teor de água, já

que, nesse procedimento, reduzem-se a atividade metabólica e a ação de microorganismos como fungos e bactérias (Stanley & Linskens, 1974; Matthews & Kraus, 1981 e Martins et al, 1981). Apesar de serem recomendados teores de água entre 8 e 10% para um bom armazenamento do grão de pólen, sabe-se que essa recomendação pode variar entre diferentes espécies.

Barnabás (1988) verificou que, em grãos de pólen de milho com teor de água entre 15 e 20%, armazenados a baixa temperatura, a viabilidade na germinação *in vitro* foi de 50% e a fertilidade *in vivo* foi de 30%, após três anos de conservação. Heslop-Harrison et al. (1990) e Barnabás et al. (1988) relataram que, com 13% de teor de água no grão de pólen, pode haver perdas na viabilidade e que essas perdas parecem estar relacionadas à transição da fase de gel para a fase cristalina da membrana plasmática.

O teor de água do grão de pólen pode ser manipulado por meio de sais saturados: LiCl, $MgCl_2$, $Mg(NO_3)_2$, NH_4NO_3 , KCl, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, P_2O_5 , $ZnCl_2$, $Ca(NO_3)_2$, $NaNO_2$ (Connor & Towil, 1993; Hong et al., 1999), sílica gel, dessecação a vácuo e vapor de nitrogênio líquido.

Além do teor de água do grão de pólen, a temperatura e a umidade relativa do ar também são fatores a serem considerados para garantir o sucesso no processo de conservação do pólen.

Para a preservação da viabilidade de grãos de pólen, faz-se referência à manutenção de baixos teores de água dos grãos de pólen e temperatura durante o armazenamento e, em alguns casos, a exclusão do oxigênio do interior dos recipientes de armazenamento (Sprague & Johnson, 1977).

O emprego de baixas temperaturas geralmente está relacionado com redução no metabolismo celular, propiciando maior longevidade dos mesmos. Roy et al. (1995), trabalhando com con-

trole de polinização em relação ao rendimento de sementes e efeito da temperatura na viabilidade dos grãos de pólen em milho, verificaram que a viabilidade do grão de pólen diminuiu significativamente com o aumento da temperatura de armazenamento.

Durante o armazenamento do grão de pólen, ocorrem alterações fisiológicas que podem provocar a redução da viabilidade do mesmo. Mudanças como a alteração na velocidade de respiração e conversão dos açúcares em ácidos orgânicos, acúmulo de produtos metabólicos secundários, como os ácidos orgânicos e alterações dos lipídeos da exina do pólen foram relatadas por Stanley & Linskens (1974). Harrington (1970) e King (1965) acrescentaram a esses fatores a auto-oxidação dos lipídeos, a possível inativação das enzimas, hormônios de crescimento e ácido pantotênico e, ainda, danos causados por dessecação.

O estado nutricional da planta fornecedora de pólen é também um fator a ser considerado. Stanley & Linskens (1974) evidenciaram que a nutrição mineral da planta durante o desenvolvimento do pólen pode afetar a longevidade do mesmo. Destacam a sensibilidade que as anteras apresentam ao boro. Enfatizam que a ausência desse elemento pode levar alguns tecidos ao colapso, de forma a induzir uma concentração nuclear anormal causada pela inibição da divisão nuclear. A formação da parede pode ser impedida e, em muitos casos, ocorrer a desintegração da célula. Salientou, ainda, que pode ocorrer a produção de pólen anormal mesmo quando a parede da antera continuou crescendo e o saco embrionário permaneceu intacto.

Existem várias técnicas para estimar a viabilidade do grão de pólen, como coloração com corantes químicos, germinação *in vitro* e *in vivo*.

A determinação da viabilidade de grãos de pólen por meio de corantes é uma prática comum em citogenética. Georgieva & Kruleva (1994) testaram a aplicação de reações baseadas na presença de enzimas funcionais. A reação de tetrazólio é um exemplo dessas reações. O teste baseia-se na alteração da coloração dos tecidos, em presença de solução salina de 2,3,5 - trifênil cloreto de tetrazólio, o qual é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando num composto chamado formazan, de coloração vermelha carmim. Tecidos mortos apresentam-se descolorados. O padrão de coloração dos tecidos pode ser utilizado para classificar os grãos de pólen corados como viáveis e os incolores, como inviáveis (Vieira *et al.*, 1998).

A germinação de pólen *in vitro* e *in vivo* permite a análise da capacidade de emissão do tubo polínico e uma correlação dessa taxa com a viabilidade do grão de pólen.

A germinação *in vitro*, em meio de cultura, é uma técnica que simula as condições do estilo-estigma, induzindo a germinação do tubo polínico. Cada espécie requer um protocolo específico de meio de cultura para a obtenção de boa germinação do grão de pólen, sendo que a sacarose é considerada indispensável, enquanto o boro, na forma de ácido bórico, e o cálcio, na forma de cálcio di-hidratado, parecem maximizar a eficiência do meio. O ágar geralmente é utilizado para dar consistência ao meio e evitar danos ao tubo polínico, durante a avaliação. Lacerda *et al.* (1995) observaram que os níveis de sacarose isoladamente e associados aos meios e aos tempos de incubação influenciaram na germinação de grãos de pólen.

A germinação *in vitro* de pólen apresenta alta correlação com a fertilização no campo (Almeida *et al.*, 2002). Porém, a fertilização tende a ser menor que a germinação *in vitro*, devido

à influência de vários fatores, como receptividade do estigma, barreiras genéticas e influências ambientais como temperatura e umidade relativa (Barnabás et al., 1988). Stanley & Linskens (1974) observaram alta correlação entre a germinação *in vitro* e a fertilização, no campo. Porém, abordaram que até mesmo na polinização *in vivo* não se estima a viabilidade com segurança, já que fertilização e números de sementes na espiga não dependem só da viabilidade e da fertilidade do pólen, mas também do estado nutricional da planta-mãe, receptividade do estilo-estigma e das condições ambientais nas quais a polinização foi realizada (Walden & Evert, 1961; Kerhoas & Dumas, 1988; Barnabás et al., 1988). A avaliação da germinação *in vivo* pode ser realizada por meio da capacidade em produzir sementes.

O período de incubação é outro fator importante na germinação *in vitro* de grão de pólen. Na maioria das espécies, o tempo de incubação varia de uma a três horas e longos períodos de incubação podem provocar a ruptura na parede do gameta, desprendendo, assim, o tubo polínico e dificultando a avaliação (Almeida et al., 2002).

Outros fatores que também influenciam na germinação *in vitro* do grão de pólen são as condições ambientais durante a coleta e a fase de amadurecimento do pendão, pois gametas recém-formados são mais viáveis do que grãos de pólen amadurecidos (Almeida et al., 2002).

Condições ambientais são importantes na germinação *in vitro*, em que temperaturas elevadas ou muito baixas diminuem drasticamente a germinação do pólen. Em milho, a temperatura de 24°C relaciona-se com alta germinação, enquanto a 0°C há uma inibição da germinação (Broglia & Brunori, 1994).

Diante do exposto no presente trabalho, foram avaliados diferentes meios de cultura para

avaliação da germinação *in vitro*, assim como o melhor horário de coleta dos grãos de pólen. Foi avaliada, ainda, influência do teor de água, do período e do ambiente de armazenamento sobre a germinação e a viabilidade de grãos de pólen de milho.

Material e Métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e de Biologia Molecular do setor de sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Foram realizados pré-testes para a determinação do meio de cultura adequado para a germinação do grão de pólen. Foram utilizados cinco protocolos, caracterizados por M1, M2, M3, M4, M5 (Tabela 1).

Os componentes do meio de cultura foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em forno microondas, com potência 10, por um minuto até a dissolução completa. Cerca de 20mL de meio ainda quente foram colocados em cada placa de Petri. Placas contendo os meios de cultura foram colocadas em estufa tipo BOD, até atingirem a temperatura constante de 27°C. Os grãos de pólen, coletados às 9 horas, foram colocados sobre o meio de cultura, sendo as placas mantidas por duas horas, em estufa tipo BOD, à temperatura de 27°C, para a germinação do grão de pólen.

A contagem de grãos de pólen viáveis foi feita com o auxílio de microscópio ótico, com objetiva de aumento de 10x, avaliando-se quatro campos de visão, correspondendo a quatro repetições. Em cada campo de visão, havia em média 50 grãos de pólen. Foram considerados germinados os grãos que apresentavam tubos polínicos que ultrapassavam o comprimento do diâmetro do próprio grão de pólen.

TABELA 1. Composição dos meios de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de milho.

Meio (nº)	Sacarose (%)	Ácido Bórico(%)	Cloreto de Cálcio (%)	Agar (%)
M1	20	-	0,15	-
M2	10	0,03	0,15	-
M3	17	0,01	0,03	0,7
M4	15	0,03	-	1,0
M5	15	0,02	0,03	1,0

Para a definição do horário que propiciasse maior viabilidade dos grãos de pólen, foram realizadas coletas às 9, 14 e 16 horas. Em seguida, os grãos de pólen foram incubados no meio (M2), de acordo com os resultados obtidos no primeiro pré-teste. Após duas horas a 27°C em BOD, avaliou-se o número de grãos germinados conforme descrito acima.

Para a definição do teor de água dos grãos de pólen, durante o armazenamento, foram realizadas secagens desses, por meio do controle artificial da umidade relativa do ar no interior de caixas de acrílico tipo gerbox, sendo estas mantidas à temperatura de 27°C.

No fundo de cada caixa, foi colocada uma solução salina higroscópica de cloreto de sódio (NaCl), dissolvido em água destilada, até a formação de uma pasta, que propiciou uma umidade relativa do ar no interior da caixa de 73%. Os grãos de pólen foram colocados sobre o fundo telado, dentro das caixas tipo gerbox (a 27°C e 73% de UR), sobre papel germitest, para evitar o contato dos grãos de pólen com a solução salina por períodos correspondentes a zero, quatro, seis, oito e dez horas, correspondendo a 51,7%, 29,4%, 21,7%, 17,7% e 17,6% de teor de água, respectivamente.

Em um segundo experimento, foi instalado um campo com as cultivares da linhagem

Le-57 e do híbrido simples GNZ 2004, para a coleta dos grãos de pólen. No florescimento, foi realizada a coleta dos grãos de pólen, às 9 horas, com temperatura do ar de 24,1°C e umidade relativa de 73%. Parte dos grãos de pólen foi mantida no teor de água inicial (51,7%) e as outras duas partes foram secadas por meio do controle artificial de umidade, usando caixas tipo 'gerbox', contendo solução salina higroscópica de cloreto de sódio dissolvido em água destilada, até a formação de uma pasta, propiciando uma umidade dentro da caixa de 73%, acondicionadas em BOD, à temperatura de 27° C. Uma parte dos grãos foi secada durante quatro horas, até atingir 29,4% de teor de água e a outra, durante seis horas, até o teor de água de 21,7%. Em seguida, esses grãos de pólen foram acondicionados em tubos tipo eppendorf, de 5 ml, e armazenados em deep freezer (-86°C), geladeira (4°C) e em nitrogênio líquido (-193°C) por quatorze e trinta dias. Após o armazenamento, a germinação e a viabilidade dos grãos de pólen foram avaliadas *in vitro*, em meio de cultura, e por meio do teste de tetrazólio, respectivamente. Para a avaliação da viabilidade, os grãos de pólen foram colocados em solução de tetrazólio a 0,5%, por duas horas, em temperatura de 30°C. A germinação do grão de pólen foi realizada em meio contendo 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de cálcio.

cio (M2), o qual foi selecionado em experimento anterior.

A contagem dos grãos de pólen viáveis e germinados foi realizada com o auxílio de microscópio ótico, com objetiva de aumento de 10x, avaliando-se quatro campos de visão, que foram equivalentes a quatro repetições. Em cada campo de visão, foram observados, em média, 50 grãos de pólen.

Para a avaliação da viabilidade *in vivo*, foi instalado um campo com as cultivares da linhagem Le-57 e do híbrido simples GNZ 2004, 15 dias após a da instalação do campo utilizado para a coleta, secagem e armazenamento dos grãos de pólen. Esses campos foram compostos por dez parcelas de quatro linhas de cinco metros cada, para cada cultivar, em quatro blocos. Antes da semeadura, as sementes foram umedecidas com água, na quantidade de 1% do peso, e tratadas com fungicida Tegrán®, na dose de 200g/ 100 kg de sementes.

Grãos de pólen armazenados nas diferentes condições, por 14 dias, foram utilizados no teste *in vivo*. Trinta plantas de cada parcela foram autofecundadas com esses grãos de pólen, quando as mesmas apresentavam estilos-estigmas receptivos.

O delineamento experimental utilizado para o experimento *in vitro* foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (períodos de armazenamento) x 3 (ambientes de armazenamento) x 3 (teores de água). Para o experimento *in vivo*, o delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 (ambientes de armazenamento) x 3 (teores de água) + testemunha (plantas polinizadas com grãos de pólen não submetidos à secagem e ao armazenamento).

Resultados e Discussão

Observou-se diferença significativa nos valores de germinação dos grãos de pólen submetidos aos diferentes meios de cultura. Os maiores valores de germinação de grãos de pólen de milho foram observados no meio M2 (Tabela 2).

A sacarose empregada em todos os meios de cultura testados tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974). Pelos resultados obtidos, observa-se que 10% de sacarose no meio já é suficiente para garantir a energia requerida para o desenvolvimento do tubo polínico.

TABELA 2. Resultados de germinação de grãos de pólen *in vitro* (%) em diferentes meios de cultura.

Meios de cultura	Germinação (%) ¹
M1: 20% de sacarose; 0,15% de cloreto de cálcio.	31,8 b
M2: 10% de sacarose; 0,03% de ac. Bórico; 0,15% de cloreto de cálcio.	47,8 a
M3: 17% de sacarose; 0,01% de ac. Bórico; 0,03% de cloreto de cálcio; 0,7% de ágar.	12,7 d
M4: 15% de sacarose, 0,03% de ác. Bórico; 1% de ágar.	17,4 cd
M5: 15% de sacarose; 0,02% de ác. Bórico; 0,03% de cloreto de cálcio; 1% de ágar.	23,3 c

¹ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si na coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O boro maximiza a germinação *in vitro* e, segundo Pfahler (1968), a adição do mesmo permite a sua interação com o açúcar, o que forma um complexo ionizável açúcar – borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. Thompson & Batjer (1950) verificaram aumento da porcentagem de germinação e do comprimento do tubo polínico de grãos de pólen de várias frutíferas de clima temperado, com a adição de boro ao meio. Nesta pesquisa, o menor valor de germinação encontrado no meio de cultura M3 pode estar relacionado à pequena concentração de boro, na forma de ácido bórico no mesmo.

A adição de cálcio ao meio de cultura propicia menor permeabilidade do tubo polínico, crescimento em forma linear e aparência rígida do tubo polínico e do grão de pólen (Bhojwani & Bhatnagar, 1974).

Um fator de grande importância para a germinação *in vitro* é a consistência do meio de cultura. Os meios líquidos apresentam a desvantagem de ocorrer um desprendimento do tubo, dificultando a avaliação, além de provocar uma subestimativa da viabilidade dos gametas, pelo fato de grãos de pólen sem tubo polínico serem considerados não-germinados. Por outro lado, altas concentrações de ágar podem servir como barreira física, impedindo a germinação do tubo polínico (Almeida et al, 2002). A menor porcentagem de germinação dos meios M3, M4 e M5 pode ser consequência da presença de ágar.

Observou-se diferença significativa nos valores de germinação de grãos de pólen coletados nos diferentes horários, sendo que, no horário de 9 horas, foram observados os maiores valores (Tabela 3). Nesse horário, a umidade relativa do ar era de 80% e a temperatura do ambiente, de 19,5°C. No decorrer do dia, com o aumento da temperatura e a diminuição da umidade rela-

tiva do ar, houve uma redução nos valores de germinação de grãos de pólen.

TABELA 3. Porcentagem de germinação de grão de pólen em diferentes horários de coleta.

Horário de coleta	Germinação (%) ¹
09:00	60,0 a
14:00	47,1 b
16:00	36,6 c

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, na coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pela a análise de regressão (Figura 1), observou-se efeito quadrático do teor de água sobre os valores de germinação dos grãos de pólen de milho.

Quando os grãos de pólen não foram secados, com 51,7 % de teor de água, a germinação foi de 50,5%. Após a máxima germinação (69,03%), com 39,65% de teor de água, houve redução nos valores de germinação com a diminuição dos teores de água, com valores de 1,4% quando o teor de água era de 17,6%. Assim, o poder germinativo dos grãos de pólen foi reduzido substancialmente a partir de seis horas de secagem, quando o teor de água dos mesmos era de 21,7 %, o que indica que os grãos de pólen não toleram a dessecação, a partir desse valor de teor de água. De acordo com Barnabás (1988), o teor de água de grãos de pólen mais adequado está entre 15% e 20%, quando foram armazenados a baixa temperatura. No entanto, no presente trabalho, verificou-se que o poder germinativo de grãos de pólen foi reduzido quando eles foram submetidos a teores de água inferiores a 21,7%.

A germinação dos grãos de pólen do milho Híbrido GNZ – 2004, foi influenciada pela

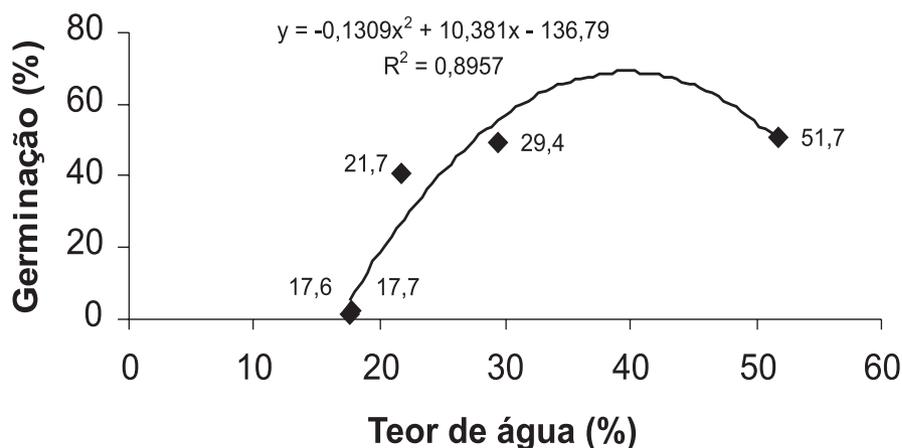


FIGURA 1. Estimativa dos valores de germinação em função dos teores de água de grãos de pólen de milho. UFLA, Lavras, MG, 2006.

interação dos fatores teor de água, tempo e condições de armazenamento.

Aos 14 dias de armazenamento, nos grãos de pólen não submetidos a secagem, maiores valores de germinação foram observados quando estes foram armazenados em nitrogênio líquido, seguidos dos armazenados em deep-freezer e geladeira, que não diferiram entre si. Para os grãos de pólen com teor de água de 29,4%, não houve diferença entre os ambientes de armazenamento.

Já nos grãos de pólen com 21,7% de teor de água, maiores valores de germinação foram encontrados quando estes foram armazenados em geladeira (Tabela 4).

Quando os grãos de pólen foram armazenados por 30 dias, não houve germinação, independente dos tratamentos adotados. Na testemunha, ou seja, em grãos de pólen não submetidos a secagem e a armazenamento, a germinação foi de 68%.

TABELA 4. Germinação de grãos de pólen do milho Híbrido GNZ – 2004, com diferentes teores de água e armazenados sob diferentes ambientes e tempos.

Tempos de armazenamento	Ambientes de armazenamento	Germinação (%) ¹		
		Teores de água (%)		
		51,7	29,4	21,7
14 dias	Geladeira	0 b	6,3 a	8,8 a
14 dias	Freezer	0,8 b	6,0 a	0,8 c
14 dias	Nitrogênio	9,5 a	6,8 a	2,5 b
30 dias	Geladeira	0 a	0 a	0 a
30 dias	Freezer	0 a	0 a	0 a
30 dias	Nitrogênio	0 a	0 a	0 a

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Aos 14 dias de armazenamento, nos grãos de pólen não submetidos a secagem, maior viabilidade foi observada quando estes foram armazenados em geladeira. Em grãos de pólen com 29,4% e 21,7% de teor de água, a maior viabilidade foi observada em grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido (Tabela 5).

Quando os grãos de pólen foram armazenados por 30 dias, não houve viabilidade em grãos de pólen não submetidos a secagem. Para os grãos de pólen com 29,4% de teor de água, maior viabilidade foi observada nos armazenados em freezer. Para os grãos de pólen com 21,7% de teor de água, maior viabilidade foi observada nos armazenados em nitrogênio líquido. Na testemunha, ou seja, grãos de pólen não submetidos a secagem e a armazenamento e avaliados por meio de terazólio, a viabilidade foi de 83%.

Para os grãos de pólen de linhagem, a germinação, nos diferentes tratamentos, foi nula, o que indica a maior dificuldade de armazenamento de grãos de pólen da linhagem em relação

ao híbrido. Na testemunha, ou seja, em grãos de pólen não submetidos a secagem e a armazenamento, a germinação foi de 70%.

Houve interação tripla significativa dos fatores: teor de água, período e ambiente de armazenamento para a viabilidade de grão de pólen da linhagem.

Aos 14 dias de armazenamento, nos grãos de pólen não submetidos a secagem, maior viabilidade foi observada quando estes foram armazenados em geladeira. Para os grãos de pólen secados até 29,4% de teor de água, a maior viabilidade foi observada quando armazenados em deep freezer. Já para os grãos de pólen com 21,7% de teor de água, a maior viabilidade foi observada quando armazenados em nitrogênio líquido. (Tabela 6).

Quando os grãos de pólen foram armazenados por 30 dias, não houve viabilidade em grãos de pólen não secados. Para os grãos de pólen secados a 29,4% e 21,7% de teor de água, não houve diferença significativa entre os ambientes de armazenamento.

TABELA 5. Viabilidade de grãos de pólen do milho Híbrido GNZ – 2004 (%), com diferentes teores de água e armazenamento por 14 e 30 dias, em diferentes ambientes.

Tempo de armazenamento	Ambiente de armazenamento	Viabilidade (%) ¹		
		Teor de água (%)		
		51,7	29,4	21,7
14 dias	Geladeira	3,8 a	0,5 b	2,8 bc
14 dias	Freezer	0 b	0 b	14,3 b
14 dias	Nitrogênio	0 b	2,3 a	81,0 a
30 dias	Geladeira	0 a	0 b	0 c
30 dias	Freezer	0 a	4,3 a	6,5 b
30 dias	Nitrogênio	0 a	1,5 b	12,8 a

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, na coluna, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na testemunha, ou seja, grãos de pólen não submetidos a secagem e a armazenamento e avaliados por meio de tetrazólio, a viabilidade foi de 68%.

Nos resultados do teste *in vivo*, a produção de sementes em plantas polinizadas com grãos de pólen, não submetidos a secagem, não

armazenados e com 51% de teor de água (tratamento testemunha) foi superior daquelas polinizadas com grãos de pólen armazenados com diferentes teores de água e ambientes de armazenamento, não havendo diferença na produção de sementes provenientes de grãos de pólen armazenados (Tabela 7).

TABELA 6. Viabilidade de grãos de pólen da linhagem Le-57 com diferentes teores e armazenados por 14 e 30 dias, em diferentes ambientes.

Tempo de armazenamento	Ambiente de armazenamento	Viabilidade (%) ¹		
		Teor de água (%)		
		51,7	29,4	21,7
14 dias	Geladeira	7,5 a	0,0 b	6,5 c
14 dias	Freezer	3,3 b	4,3 a	9,5 b
14 dias	Nitrogênio	0,0 c	1,3 a	91,0 a
30 dias	Geladeira	0 a	0 a	0 a
30 dias	Freezer	0 a	2,5 a	1 a
30 dias	Nitrogênio	0 a	0 a	1,8 a

¹Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si, na coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 7. Produção de sementes/espiga da linhagem Le-57 proveniente de plantas polinizadas com grãos de pólen com diferentes teores de água e armazenados em diferentes ambientes de armazenamento e com grãos de pólen não submetido a secagem e armazenamento (testemunha).

Tratamento	Sementes/espiga ¹
Testemunha	355,0 a
Nitrogênio 21,7%	31,0 b
Nitrogênio 51,7%	22,0 b
Nitrogênio 29,4%	22,0 b
Geladeira 51,7%	14,0 b
Deep Freezer 21,7%	11,0 b
Deep Freezer 29,4%	7,0 b
Deep Freezer 51,7%	6,0 b
Geladeira 21,7%	5,0 b
Geladeira 29,4%	4,0 b

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Roeckel-Drevet *et al.* (1995) observaram maior número de sementes por espiga quando a polinização foi realizada com grãos de pólen com teor de água entre 30 e 50%.

Em análise estatística complementar, para comparação dos resultados, excluindo o tratamento testemunha, houve diferença significativa entre os tratamentos caracterizados pelas combinações de teores de água e ambientes de armazenamento de grão de pólen. A produção de sementes da linhagem foi maior quando as plantas foram polinizadas com grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido e com teor de água de 21,7%. Já as menores produções de sementes foram observadas quando a polinização foi realizada com grãos de pólen armazenados em deep freezer com teor de água 51,7%, em geladeira com teores de 21,7 % e 29,4 %, sendo que esses tratamentos não diferiram entre si (Tabela 8). Esse tipo de análise permitiu uma melhor comparação dos resultados obtidos em grãos de pólen armazenados sob diferentes condições e teores de água. A análise ficava comprometida quando os resultados dos tratamentos eram comparados com os da testemunha, uma vez que, nessa última, a produção de sementes por espiga foi superior à dos demais.

Assim como nas linhagens, foi observada diferença significativa na produção de sementes provenientes de polinização realizada com grãos de pólen não submetidos a secagem e a armazenamento, em relação à observada nas plantas polinizadas com grãos de pólen secados e armazenados. Maior número de sementes por espiga foi observado em plantas polinizadas com grãos de pólen armazenados em deep-freezer e não submetidos a secagem e em nitrogênio líquido, com 21,7% de teor de água (Tabela 9).

Também em análise complementar, sem a presença da testemunha, houve diferença sig-

TABELA 8. Produção de sementes/espiga da linhagem Le-57 proveniente de plantas polinizadas com grãos de pólen com diferentes teores de água e armazenados em diferentes ambientes de armazenamento.

Tratamento	Sementes/espiga ¹
Nitrogênio 21,7%	31,0 a
Nitrogênio 51,7%	22,0 b
Nitrogênio 29,4%	22,0 b
Geladeira 51,7%	14,0 c
Deep Freezer 21,7%	11,0 cd
Deep Freezer 29,4%	7,0 cde
Deep Freezer 51,7%	6,0 de
Geladeira 21,7%	5,0 de
Geladeira 29,4%	4,0 de

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 9. Produção de sementes/espiga do híbrido GNZ 2004 proveniente de plantas polinizadas com grãos de pólen com diferentes teores de água e armazenados em diferentes ambientes de armazenamento e com grãos de pólen não submetido a secagem e armazenamento (testemunha).

Tratamento	Sementes/espiga ¹
Testemunha	397,0 a
Deep Freezer 51,7%	67,0 b
Nitrogênio 21,7%	40,0 b
Nitrogênio 51,7%	34,0 c
Deep Freezer 21,7%	24,0 c
Nitrogênio 29,4%	23,0 c
Geladeira 51,7%	21,0 c
Geladeira 21,7%	20,0 c
Deep Freezer 29,4%	15,0 c
Geladeira 29,4%	13,0 c

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

nificativa entre os tratamentos. A produção de sementes em plantas híbridas polinizadas com grãos de pólen armazenados em deep freezer e com teor de água de 51,7% foi superior à dos demais tratamentos, seguida da obtida em plantas polinizadas com grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido com 21,7% de teor de água e em nitrogênio líquido com 51,7% de teor de água. Já a menor produção de grãos foi observada nas plantas do híbrido polinizadas com grãos de pólen armazenados em geladeira, com teor de água 29,4% (Tabela 10), coincidindo com os resultados observados para a linhagem Le 57.

TABELA 10. Produção de sementes/espiga do híbrido GNZ 2004 proveniente de plantas polinizadas com grãos de pólen com diferentes teores de água e armazenados em diferentes ambientes de armazenamento.

Tratamento	Sementes /espigas ¹
Deep Freezer 51,7%	67,0 a
Nitrogênio 21,7%	40,0 b
Nitrogênio 51,7%	34,0 b
Deep Freezer 21,7%	24,0 c
Nitrogênio 29,4%	23,0 c
Geladeira 51,7%	21,0 cd
Geladeira 21,7%	20,0 cd
Deep Freezer 29,4%	15,0 cd
Geladeira 29,4%	13,0 d

¹ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A viabilidade e a germinação de grãos de pólen reduzem-se substancialmente com o armazenamento, independentemente do teor de água do grão de pólen. Para a linhagem, quando as plantas foram polinizadas com grãos de pólen

armazenados em nitrogênio líquido com teor de água de 21,7%, a produção de sementes correspondeu a 1,45% da produção de plantas que foram polinizadas com grãos de pólen não submetidos a secagem e a armazenamento. Já para o híbrido, quando as plantas foram polinizadas com grãos de pólen armazenados em deep freezer com teor de água de 51,7%, a produção de sementes correspondeu a 2,81% da produção de plantas que foram polinizadas com grãos de pólen não submetidos a secagem e o armazenamento. De forma geral, grãos de pólen de linhagem são mais sensíveis a armazenamento que grãos de pólen de híbrido.

Conclusões

Maiores valores de germinação dos grãos de pólen são observados em meio de cultura contendo 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de cálcio (M2).

Maiores valores de germinação são observados quando a coleta dos grãos de pólen é realizada às 9 horas.

A viabilidade dos grãos de pólen é reduzida substancialmente quando o teor de água é inferior a 21,7%, indicando que os mesmos não toleram a dessecação, abaixo desse valor.

As maiores médias de germinação para híbrido e linhagem são encontradas quando os grãos de pólen não são submetidos a secagem e o armazenamento.

Para melhor conservação, durante o armazenamento, os grãos de pólen deverão ser secados até 21,7%, de teor de água e armazenados em nitrogênio líquido.

Literatura Citada

AGARWALA, S. C.; CHATTERJEE, C.; SHARMA, P. N.; SHARMA, P. C.; NAUTIYAL,

N. Pollen development in maize plants subjected to molybdenum deficiency. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 1946-1950, 1979.

ALMEIDA, C. C. S.; AMORIM, E. P.; SERENO, M. J. C. M.; BARBOSA NETO, J. F.; VOLTZ, A.H. Efeito de desidratante e temperatura na estocagem de pólen de milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002. Florianópolis. **Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo: resumos**. Sete Lagoas: ABMS/Embrapa Milho e Sorgo/EPAGRI, 2002. CD Room.

BARNABÁS, B.; KOVACS, G.; ABAANYI, A.; PFAHLER, P. Effect of pollen storage by drying and deep freezing on the expression of different agronomic traits in maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 39, p. 221-225, 1988.

BHOJWANI, S. S.; BHATNAGAR, S. P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264 p.

BROGLIA, M.; BRUNORI, A. Synergistic effect of low temperature and high sucrose concentration on maize pollen viability in aqueous medium. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 528-529, 1994.

CONNOR, F. K.; TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, Wageningen, v. 68; p. 77-84, 1993.

GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196°C). **Tropical Agricultural**, Surrey, v. 63, n. 1, p. 46-48, 1986.

GEORGIEVA, I. D.; KRULEVA, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 72, p. 87-94, 1994.

HARRINGTON, J. F. Seed and pollen storage. In: FRANKEL, O. K.; BENNET, E. **Genetic resources in plants - their exploration and conservation**. Oxford: Blackwell, 1970. p. 469-489.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; DIGONNET-KERHOAS, C.; GAY, G. Pollen quality: definition and estimation. **Bulletin de la Societe Botanique de France Actualites Botaniques**, Paris, v. 137, n. 2, p. 97-100, 1990.

Hong T.D., HONG, T.D. ;ELLIS, R.H., BUITINK, J.; WALTERS, C.; HOEKSTRA, F.A.; CRANE, J. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in airdry storage environments. **Annals of Botany**, London, v. 83, p. 167-173, 1999.

KERHOAS, G.; DUMAS, C. Pollen quality in *Zea mays* as a prerequisite for sperm cell isolation and pollen transformation. In: WILMS, H. J.; KEIJZER, C. F. (Ed.). **Plant sperm cell as a tool for biotechnology**. Wageningen: Pudoc, 1988. p. 97-104.

KING, J. R. The storage of pollen-particularly by the freeze-drying method. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 92, p. 270-287, 1965.

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 grão de pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, n. 241, p. 308-312, 1995.

- MARTINS, M. E.; PRERA, L. E. H.; KAGEYAMA, P. Y. **Manejo de pólen de Pinus para fins de melhoramento genético**. Piracicaba: IPEF, 1981. 8 p. (IEPF. Circular técnica. 128).
- MATTHEWS, F. R.; KRAUS, J. Pollen storage. In: FRANKLIN, E. C. (Ed.). **Pollen management handbook**. Washington: USDA. Forest Service, 1981. p. 37-39. (USDA. Forest Service Handbook, 587).
- PFAHLER, P.L. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. II. Pollen source, calcium and boron interactions. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 46, p. 235-240, 1968.
- ROECKEL-DREVET, P.; DIGONNET, P. C.; MATTHYS-ROCHON, E.; CHAMPIAT, D.; DUMAS, C. Fertility of *Zea mays* pollen during dehydration: physiological steps outlined by nucleotide measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 33, p. 289-294, 1995.
- ROY, S. K.; RAHAMAN, S. M. L.; SALAHUDDIN, A. B. M. Pollination control in relation to seed yield and effect of temperature on pollen viability of maize (*Zea mays*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.65, p. 785-788, 1995.
- SHARMA, C. P.; SHARMA, P. N.; CHATTERJEE, C.; AGARWALA, S. C. Manganese deficiency in maize affects pollen viability. **Plant and Soil**, The Hague, v. 138, p. 139-142, 1991.
- SHARMA, P. N.; CHATTERJEE, C.; AGARWALA, S. C.; SHARMA, C. P. Zinc deficiency and pollen fertility in maize (*Zea mays*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 124, p. 221-225, 1990.
- SHARMA, P. N.; CHATTERJEE, C.; SHARMA, C. P.; AGARWALA, S. C. Zinc deficiency and anther development in maize. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.28, p. 11-18, 1987.
- SHARMA, P. N.; CHATTERJEE, C.; SHARMA, C. P.; NAUTIYAL, N.; AGARWALA, S. C. Effect of zinc deficiency on the development and physiology of wheat pollen. **Journal of the Indian Botanical Society**, Madras, v. 58, p. 330-334, 1979.
- SPRAGUE, J. R.; JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14., 1977, Gainesville. **Proceedings...** Macon: Eastern Tree Seed, 1977. p. 20-27.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer verlag, 1974. 172 p.
- THOMPSON, A. H.; BATJER, L. P. The effect of boron in the germination medium on pollen germination and pollen tube growth of several deciduous tree fruits. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 56, p. 227-230, 1950.
- VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, E. V. R. V.; GUIMARÃES, R. J.; OLIVEIRA, J. A. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).
- WALDEN, D.B.; EVERT, H.L. A quantitative method for the *in vivo* measurement of the viability of corn pollen. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 21-25, 1961.