

VIABILIDADE DE PÓLEN DE MILHO EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO EM BAIXA TEMPERATURA

LIVIA MARIA CHAMMA DAVIDE¹, ROSELAINÉ CRISTINA PEREIRA², GUILHERME BARBOSA ABREU¹, JOÃO CÂNDIDO DE SOUZA³ e ÉDILA VILELA DE REZENDE VON PINHO⁴

¹*Pós-Graduandos em Genética e Melhoramento de Plantas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: lmcdaide@yahoo.com.br; guibabreu@hotmail.com . Bolsista CNPq.*

²*Pós-doutoranda em Genética e Melhoramento de Plantas Departamento de Biologia, UFLA, Caixa Postal 37, 37200-000 Lavras, MG. E-mail: rcristina@yahoo.com.br*

³*Professor do Departamento de Biologia, UFLA, Caixa postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: cansouza@ufla.br*

⁴*Professora do Departamento de Fitotecnia, UFLA, Caixa postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: edila@ufla.br*

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.8, n.2, p. 199-206, 2009

RESUMO – O armazenamento de grãos de pólen se justifica em programas de melhoramento de milho, devido à não coincidência do florescimento das linhagens e/ou cultivares a serem cruzadas. Por essa razão, têm sido procuradas técnicas que possam armazenar os grãos de pólen sem que esses percam a eficiência. O objetivo do trabalho foi verificar a viabilidade do pólen armazenado, por meio de testes *in vivo* e *in vitro*. Grãos de pólen de quatro cultivares de milho foram armazenados em freezer por 2, 4, 8, 14 e 15 dias. A viabilidade dos mesmos foi verificada pela determinação da produção de sementes por espigas e por meio de testes de coloração e germinação dos grãos de pólen em meio de cultura. A porcentagem de germinação dos grãos de pólen *in vitro* e a produção de sementes, independente do tempo de armazenamento, foi, em média, 13%. No teste de coloração, todas as cultivares analisadas apresentaram viabilidade acima de 95%, independente da taxa de germinação *in vitro* e produção de sementes por espigas. O armazenamento de pólen de milho é um procedimento viável, porém há necessidade de adequação das técnicas de armazenamento e dos testes para a determinação da viabilidade dos mesmos.

Palavras-chave: conservação, germinação, grão de pólen, *Zea mays*.

MAIZE POLLEN VIABILITY AT DIFFERENT STORAGE PERIODS AT LOW TEMPERATURE

ABSTRACT – Pollen grain storage is justifiable in maize breeding programs due to the non-coincident flowering of lines and/or cultivars to be bred. Thus, pollen storage techniques have been developed which preserve pollen efficiency. The aim of this work was to verify the viability of stored pollen through *in vivo* and *in vitro* tests. Pollen grains of four maize cultivars were stored in freezer for 2, 4, 8, 14 and 15 days. Pollen viability was assessed through determination of seed production per ear, color tests and *in vitro* pollen germination. The percentage of *in vitro* pollen germination and seed production, independent of storage time, was 13 percent on average. In the color test, all analyzed cultivars presented more than 95% viability, independent of *in vitro* germination percentage and seed production per ear. The storage of maize pollen is a viable procedure; however, it is necessary to adjust the storage techniques, as well as the tests for assessing pollen viability.

Key words: conservation, germination, pollen grain, *Zea mays*.

O armazenamento de grãos de pólen se justifica em programas de melhoramento de milho quando não ocorre a coincidência do florescimento das linhagens e/ou cultivares a serem cruzadas. A alternativa mais utilizada para atenuar o problema é o “split”, isto é, semear os genitores em diferentes épocas. Essa estratégia, embora amplamente utilizada, é trabalhosa e nem sempre é eficaz, por problemas climáticos.

Por essa razão, têm sido procuradas técnicas que possam armazenar os grãos de pólen sem que esses percam a eficiência. Em várias espécies, esse procedimento já é utilizado rotineiramente (Pereira et al., 2002; Gomes et al., 2003). Apesar de parecer uma técnica simples, cuidados durante a extração e o armazenamento do pólen são necessários,

uma vez que há uma tendência à queda de sua longevidade com o armazenamento. A extração do pólen pode ser realizada a seco, em água ou em solventes orgânicos, sendo que, para a maioria das espécies, a extração a seco tem se mostrado mais adequada (Souza, 1988). Além da forma de extração, a viabilidade do pólen pode ser afetada por fatores genéticos, fisiológicos e pelas condições de armazenamento (Shivanna & Johri, 1989).

Para a maioria das espécies, baixas temperaturas e umidades de armazenamento favorecem a longevidade do pólen, pois diminuem a atividade metabólica e a ação de micro-organismos. A baixa umidade do pólen, entre 8 e 10%, propicia um armazenamento adequado, independente do método utilizado,

embora o teor de umidade ideal para o armazenamento varie entre as espécies. As gramíneas, por exemplo, requerem alta umidade e normalmente seu pólen tem longevidade menor que o da maioria das espécies. Em milho, foi verificado que os grãos de pólen não suportam uma redução de umidade superior a 50% sem perda de suas funções normais, sendo o teor de umidade adequado em torno de 20% (Barnabás et al., 1988; Ferreira et al., 2007).

A redução da umidade do pólen é recomendada mesmo para armazenamento a curto prazo e vários métodos são sugeridos para reduzir a umidade do pólen a teores adequados, tais como: secagem a vácuo, uso de sílica gel, ácido sulfúrico, hidróxido de potássio, cloreto de cálcio e liofilização (Souza, 1988). Além de métodos adequados de armazenamento, é importante também o conhecimento da viabilidade do pólen armazenado, um fator importante para garantir o sucesso das hibridações controladas. A viabilidade do pólen pode ser determinada por métodos *in vitro* e *in vivo*. Nos testes *in vivo*, a viabilidade do pólen pode ser verificada por meio de sua capacidade de produzir sementes. Já nos testes *in vitro*, a viabilidade pode ser feita por meio da viabilidade do pólen em meio de cultura ou pelo uso de corantes específicos.

No milho, existem alguns relatos de pesquisa a respeito do assunto (Barnabás, 1988; Almeida et al., 2002; Alyor, 2003, Ferreira et al., 2007). Um dos mais recentes foi realizado por Ferreira et al. (2007), que testou algumas

alternativas de armazenamento de pólen. Os autores constataram que a percentagem de pólen viável foi muito pequena quando esse foi armazenado por até 15 dias.

Com a eficiência obtida por Ferreira et al. (2007), o armazenamento do pólen de milho dificilmente poderá tornar-se rotina nos programas de melhoramento. Visando complementar as informações obtidas por Ferreira et al. (2007) e, ao mesmo tempo, verificar a viabilidade do pólen armazenado por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, para tornar o procedimento mais efetivo, foi realizado o presente trabalho.

Os experimentos foram conduzidos no campo experimental e no laboratório de citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em abril de 2008. Foram utilizadas três linhagens da Universidade Federal de Lavras (2, 30 e 8) e um híbrido simples comercial (DKB199). Para cada genótipo, foi realizado um ‘bulk’ de pólen obtido a partir de dez plantas. A coleta dos grãos de pólen foi realizada a seco, durante a antese, às 9 horas da manhã. A umidade relativa e a temperatura média foram de aproximadamente 80% e 23°C, respectivamente. Ainda no campo, os grãos de pólen foram transferidos para placas de Petri e, posteriormente, levados para o laboratório, para a redução da umidade, que foi realizada em estufa, até os mesmos atingirem 22% de umidade, valor este sugerido por Ferreira et al. (2007). Em seguida, 1,5 mL de grãos de pólen foi armazenado em microtubos,

devidamente identificados e dispostos no interior de caixas de acrílico tipo 'gerbox', contendo sílica. Os microtubos dentro das caixas de 'gerbox', foram mantidos em freezer a -10 °C por 2, 4, 8, 14 e 15 dias. Após o período de armazenamento, a viabilidade dos grãos de pólen foi verificada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*.

Para o teste *in vivo*, parte dos grãos de pólen armazenados foi reidratada por três horas. Inicialmente, as caixas de gerbox contendo os microtubos foram levadas para a geladeira por uma hora. Em seguida, os microtubos foram abertos e colocados em câmara úmida por duas horas. Após o período de reidratação, 1 mL de grãos de pólen de cada cultivar foi levado ao campo e utilizado para a polinização de estilos-estigmas das cultivares correspondentes. Os estilos-estigmas foram previamente protegidos, a fim de evitar contaminação. A viabilidade do pólen armazenado utilizado na polinização foi verificada por meio da contagem do número de sementes por espiga. A outra parte do pólen reidratado, aproximadamente 0,5 mL, foi utilizada para a avaliação da viabilidade

in vitro, por meio da germinação dos grãos de pólen em meio de cultura e pelo uso de corante 'Alexander' (Alexander, 1969).

Para a determinação da viabilidade do pólen por meio de testes de germinação, foram testados três diferentes meios de cultura (Tabela 1). Os componentes dos meios de cultura foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em mufla, até a dissolução completa. Os meios de cultura foram vertidos em lâminas para microscopia e em placas de Petri. Após a solidificação e resfriamento do meio, os grãos de pólen foram espalhados sobre os mesmos, com o auxílio de um pincel. Para evitar o ressecamento do meio de cultura, as lâminas e as placas foram mantidas em câmara úmida. A avaliação da germinação dos grãos de pólen *in vitro* foi realizada três horas após o preparo das lâminas e das placas, em microscópio óptico, com objetiva de aumento de 10x. Foram analisadas três repetições por genótipo, sendo que cada repetição foi representada por uma lâmina. Em cada lâmina, avaliaram-se 100 grãos de pólen e consideraram-se viáveis os grãos de pólen cujos tamanhos dos tubos polínicos fossem maiores que o diâmetro do próprio grão de pólen.

TABELA 1. Descrição dos meios de cultura utilizados no teste de germinação *in vitro* de grãos de pólen.

Meios de Cultura	Sacarose (%)	Ácido Bórico (%)	Cloreto de Cálcio (%)	Nitrato de Cálcio (%)	Agar (%)
M1	17	0,01	0,03	0,00	0,7
M2	20	0,00	0,15	0,00	0,00
M3	16,5	0,001	0,00	0,002	1,2

A viabilidade do pólen armazenado *in vitro* também foi avaliada por meio de teste de coloração, utilizando o corante ‘Alexander’ (Alexander, 1969). Para isso, foram preparadas lâminas com os grãos de pólen e feita a coloração das mesmas com o corante ‘Alexander’. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico, com objetiva de aumento de 10x. Foram consideradas três repetições para cada amostra e avaliados 100 grãos de pólen/repetição. Os grãos de pólen com coloração azul intensa foram considerados viáveis.

O resumo dos resultados obtidos nos teste de viabilidade de grãos de pólen *in vivo* e *in vitro* estão descritos na Tabela 2. No teste *in vivo*, verificou-se que os grãos de pólen armazenados, independentemente do período de tempo, foram capazes de fertilizar e produzir sementes nas linhagens 2 e 8 e no híbrido DKB 199. Apenas a linhagem 30 não produziu sementes em qualquer período de armazenamento. Esse resultado sugere que o genótipo exerce influência sobre a viabilidade do pólen. A maior porcentagem de fertilização foi observada na linhagem 8, com o

pólen armazenado por 14 dias. Nessa linhagem, foram verificados 55 grãos em apenas uma espiga.

Como resultado da avaliação dos diferentes meios de cultura, verificou-se que o meio mais adequado para a germinação do pólen foi o M3. Nesse meio, a germinação média dos grãos de pólen armazenados nos diferentes períodos foi de 13,33% (Tabela 2). Esse média foi ligeiramente superior aos valores relatados na literatura. Ferreira et al. (2007) observaram valores de 0,8 a 9,5%, com 14 dias de armazenamento. Para grãos de pólen não armazenados, a porcentagem de germinação é superior, há relatos variando entre 13 e 75% (Fonseca & Westgate, 2005).

Nos meios M1 e M2, houve a ruptura dos grãos, dificultando a visualização da germinação e/ou emissão dos tubos polínicos. Embora os meios M1 e M2 não tenham sido adequados no presente trabalho, esses são citados na literatura como eficientes para avaliar a germinação do pólen de milho *in vitro* (Ferreira et al., 2007). Isso demonstra que há necessidade de estabelecimento de um meio de cultura padrão

TABELA 2. Viabilidade média do pólen, obtida por meio de testes *in vitro* (germinação e coloração) e *in vivo* (semente por espiga).

Cultivares	Germinação (%)	Coloração (%)	Sementes por espiga
Linhagem 2	10	98	7
Linhagem 30	15	95	0
Linhagem 8	15,33	95	36
DKB199	13	96	9,5

para a avaliação da germinação do pólen de milho que possa ter o emprego generalizado para diferentes condições ambientais e de armazenamento.

Vale ressaltar que cada espécie requer um protocolo adequado para a avaliação da germinação, sendo a sacarose um componente indispensável. Outros componentes, como o boro e o cálcio variam de acordo com a espécie. Para o milho, a maioria dos protocolos contém, além da sacarose, cálcio e boro (Stanley & Linskens, 1974; Barnabás, 1985; Ferreira et al., 2007). Além disso, não apenas os componentes utilizados nos meios, mas também a composição desses, pode influenciar na percentagem de germinação.

Outro fator que interfere na germinação *in vitro* é a quantidade de pólen no meio de germinação. A grande quantidade de grãos de pólen no meio de cultura promove o aumento na ruptura dos grãos, sendo esse observado principalmente quando o meio de cultura foi depositado sobre as lâminas. Nas placas de Petri, a ruptura dos grãos de pólen ocorreu em menores proporção e velocidade.

A individualização dos grãos de pólen foi eficiente com o período de incubação de três horas em meio de cultura, pois, após esse período, ocorreu a ruptura dos grãos de pólen, dificultando a individualização dos mesmos. De acordo com Almeida et al. (2002), o tempo de incubação da maioria das espécies varia de uma a três horas. Longos períodos de incubação dificultam a avaliação, por provocarem a ruptura

do gameta e/ou favorecerem a proliferação de micro-organismos.

A viabilidade do pólen verificada pelo corante 'Alexander' foi superior a 95% (Tabela 2), independente do material genético utilizado, da taxa de germinação *in vitro* e da produção de sementes por espigas.

Como é sabido, o uso de corantes é uma técnica bastante atrativa, especialmente pela simplicidade e rapidez na obtenção dos resultados. Entretanto, a validade desse método tem sido questionada por problemas como, por exemplo, a coloração de grãos de pólen inviáveis ou grãos de pólen imaturos e abortados (Stanley & Linskens, 1974). Georgieva & Kruleva (1994), avaliando a viabilidade de pólen de milho, ao longo de dois anos, por meio de testes de coloração convencionais (carmin acético, vermelho neutro e acridina orange) e reação fluorocromática, concluíram que apenas os corantes fluorocromáticos (FCR) foram capazes de detectar a queda da viabilidade com o armazenamento ao longo desse período. Galleta (1983) comenta que a viabilidade verificada por coloração normalmente é mais alta do que aquela obtida por germinação.

Alguns autores afirmam que a viabilidade do grão de pólen verificada por meio de produção de sementes no campo apresenta alta correlação com germinação de grãos de pólen *in vitro* (Stanley & Linskens, 1974). Esse fato não foi confirmado no presente trabalho, onde as linhagens 30 e 8 apresentaram a mesma taxa de germinação (15%) e comportamento

distinto para produção de sementes. Isso pode ser explicado devido à influência de vários fatores, como estado nutricional das plantas, receptividade do estigma, condições ambientais nas quais foi realizada a polinização e o genótipo utilizado (Barnabás et al., 1988; Kernoas & Dumas, 1988).

Conclusão

O armazenamento de pólen de milho é uma técnica viável e a viabilidade varia de acordo com o genótipo utilizado. Novos estudos são necessários para aumentar a correlação entre os testes de viabilidade *in vitro* e a produção de sementes por espigas em programas de melhoramento de milho.

Literatura Citada

- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, n. 2, p. 117-122, 1969.
- 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 entre paraentes (*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 expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; EPAGRI, 2002, CD-ROM.
- AYLOR, D. E. Rate of dehydration of corn (*Zea mays* L.) pollen in the air. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 2307-2312, 2003.
- BARNABÁS, B. Effect of water loss on germination ability of maize pollen. **Annual of Botany**, London, v. 55, p. 201-204, 1985.
- BARNABÁS, B.; KOVACS, G.; ABRANYI, 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.
- FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. R. V. R.; ALVIM, P.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, D. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, p.159-173, 2007.
- FONSECA, A. E.; WESTGATE, M. A. Relationship between desiccation and viability of maize pollen. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 94, p.114-125, 2005.
- GALLETA G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruits breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.
- GEORGIEVA, I. D.; KRULEVA, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. **Euphytica**, Wageningen, v.72, p.87-94, 1994.
- GOMES, P. R.; RASEIRA, M. C. B.; BAUDET, L. L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF., v. 25, p.14-17, 2003.
- KERNOAS, 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 toll for biotechnology**. Wageningen: Pudoc, 1988. p. 97-104.

PEREIRA, R. C.; DAVIDE, L. C.; RAMALHO, M. A. P.; ANDRADE, H. B. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. **Cerne**, Lavras, v. 8, p. 60-69, 2002.

SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. **The angiosperm pollen: structure and function**. New York: J. Wiley 1989. 374 p.

SOUZA, V. A. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp.** 1988. 155 f. Tese (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, Berlin, 1974. 307 p.