

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**VIABILIDADE *IN VITRO* DE PÓLEN DE CULTIVARES DE
MILHO**

EMANOEL SANCHES MARTINS

GIAN JOSÉ MIRANDA

DOURADOS

MATO GROSSO DO SUL

2014

**VIABILIDADE *IN VITRO* DE PÓLEN DE CULTIVARES DE
MILHO**

EMANOEL SANCHES MARTINS

GIAN JOSÉ MIRANDA

Orientadora Prof^ª. Dr^ª: Livia Maria Chamma Davide

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal da Grande
Dourados, como parte das exigências do
Curso de Graduação em Agronomia, para
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL

2014

**VIABILIDADE *IN VITRO* DO PÓLEN DE CULTIVARES DE
MILHO**

Por:

Emanoel Sanches Martins

Gian José Miranda

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de ENGENHEIRO AGRÔNOMO.

Aprovado em: / /

Prof^ª. Dr^ª. Livia Maria Chamma Davide

Orientadora – UFGD/FCA

Prof^ª. Dr^ª Liliam Silvia Candido

Membro da Banca – UFGD/FCBA

Prof. Dr. Manoel Carlos Gonçalves

Membro da Banca – UFGD/FCA

Doutorando Rafael Pelloso de Carvalho

Membro da Banca – UFGD/FCA

Dedico

À Deus.

Aos meus pais, Edivaldo Carlos Martins e Marislei Sanches Ferreira Martins, que me incentivaram e não mediram esforços para que eu pudesse concluir essa fase da minha vida. A dedicação dos senhores que deram a esperança para seguir e certeza que estou no caminho certo.

Aos meus irmãos Edicarlos Sanches Martins, Edimari Sanches Martins e Emilly Sanches Martins e a minha cunhada Tamires Souza Rosa, que me incentivaram e acolheram quando necessário. O apoio de vocês foi essencial para o meu sucesso nessa caminhada.

Ao meu afilhado, que revitalizava sempre as minhas forças, mesmo sem que ele soubesse.

A minha orientadora Livia Maria Chamma Davide por ter sido uma mãe durante toda minha jornada acadêmica. Por ter sido paciente e compartilhar seu grandioso conhecimento durante toda essa caminhada. Os momentos vividos junto a senhora ficarão sempre em minha lembrança.

Emanoel Sanches Martins

Dedico

Antes de mais nada à Deus.

Dedico a minha vida a muitas pessoas, principalmente a minha família, na minha vida acadêmica não é diferente, minha família sempre me incentivou, orientou e além de tudo sempre me apoiou, sem eles, Marta Defendi Miranda e Roberto da Silva Miranda que foram pais melhores do que eu mereço ou sonhei merecer, não estaria nem próximo de onde estou hoje. Ao meu irmão Giovani José Miranda que além de irmão é um exemplo de profissional a qual eu almejo me tornar.

Durante a trajetória acadêmica houve também muitas pessoas que são a razão de eu estar aqui, são amigos, colegas, professores, enfim tantos que não caberiam em uma simples dedicatória, então me limito aqui a escrever uma dedicatória as pessoas que mudaram minha concepção de vida.

A minha professora orientadora, Livia Maria Chamma Davide que representa uma nova geração de educadores, onde estes deixam de serem apenas professores, são colegas, amigos e principalmente heróis que tem a missão de mudar a consciência dos jovens brasileiros. Professora que me tratou como um filho e me orientou mesmo eu sendo um dos maiores caneladas da turma, me orgulha dizer ser seu primeiro orientado, espero que eu tenha a sorte e o prazer de fazer, ao menos, um pouco o que foi me ensinado, pois isso já será o suficiente para realizar grandes feitos.

A minha namorada, Beatriz Barbosa da Silva, que merece muito mais que uma dedicatória, por estar sempre ao meu lado me auxiliando e dando atenção, mesmo em meus momentos de mau humor, me ajudando a passar por esta etapa de vida. A você meu sincero muito obrigado.

Aos meus amigos, que felicidade tenho de poder chama-los assim, infelizmente não tenho tempo para falar sobre todos, deste modo dedico estas palavras a todos em nome de apenas um, Emanuel Sanches Martins, com o qual tive a honra de concluir este trabalho e o curso, podendo assim aprender com seu modo de pensar e agir, o que me deu um grande conhecimento não apenas técnico, mas de vida.

Gian José Miranda

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por nos dar forças em todos os momentos e nos guiar aos melhores caminhos.

A nossa amada orientadora Profa. Dra. Livia Maria Chamma Davide por todos os momentos vividos, desde nossas primeiras discussões no primeiro ano de faculdade, as orientações no Trabalho de Conclusão de Curso. Aos momentos de amizade e descontração, momentos que não são passados apenas com uma professora e sim com uma mãezinha, uma colega, uma amiga. Nossa Gratidão e com isso uma promessa, de honrar todos vossos ensinamentos. E neste agradecimento ousamos ainda em fazer um pedido, para que assim continue, fazendo com que outros tenham não apenas ensinamentos técnicos, mas também de vida.

Ao Prof. Dr. Manoel Carlos Gonçalves, que sempre nos auxiliou para o término deste trabalho.

Ao Dr. Samir Oliveira Kassab, pelo incentivo e auxílio nesta reta final de conclusão deste trabalho.

Aos membros da banca Profa. Dra. Lilian Silvia Candido, Doutorando Rafael Pelloso de Carvalho e o Prof. Dr. Manoel Carlos Gonçalves, por disporem de seu tempo para participarem e engrandecerem com suas sugestões este trabalho tão especial para nós.

Aos amigos Francisco de Assis de Souza Júnior, Jefferson de Oliveira Barizon, Mailson Vieira de Jesus, Murilo Henrique Rojas e Paulo Alexandre Zaramella, pela dedicação e esforço para realização deste trabalho. Nosso muito obrigado.

A todos os professores com os quais tivemos a honra de aprender e conviver, por estes não terem sido apenas professores e sim mestres na educação.

Aos colegas e amigos da XXXIII Turma de Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados, pelos momentos vividos, momentos estes que nunca serão esquecidos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração dessa pesquisa, o nosso muito obrigado.

Emanoel Sanches Martins

Gian José Miranda

SUMÁRIO

RESUMO	ix
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	2
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	5
CONCLUSÕES	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1. Cultivares de milho utilizados para avaliação da viabilidade <i>in vitro</i> de grãos de pólen de milho.	3
Tabela 2. Resumo da análise de variância da viabilidade de grãos de pólen de milho avaliados em meio de cultura líquido, sólido e em teste de coloração em tetrazólio.	6
Tabela 3. Viabilidade de grãos de pólen de milho avaliados em meio de cultura líquido, sólido e tetrazólio.	7
Tabela 4. Viabilidade de grãos de pólen de milho avaliados em quatro cultivares, quatro dias de antese e três horários de coleta.	8

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Temperatura (°C) e umidade relativa (%) observadas no campo experimental durante a fase de antese de 4 cultivares de milho.	4
Figura 2. Germinação e viabilidade <i>in vitro</i> de grãos de pólen. A) Grãos de pólen germinado em meio de cultura sólido, apresentando tubo polínico maior que o diâmetro do grão (viável). B) Grãos de pólen não germinados em meio de cultura sólido (inviável). C) Grãos de pólen inviáveis em teste de tetrazólio. D) Grão de pólen viáveis (corados) em teste de tetrazólio.	5
Figura 3. Viabilidade <i>in vitro</i> de grãos de pólen de milho coletados em diferentes dias da antese as 8:00 horas. A) Viabilidade <i>in vitro</i> em meio de cultura sólido. B) Viabilidade <i>in vitro</i> em meio de cultura líquido. C) Viabilidade <i>in vitro</i> em teste de coloração com tetrazólio.	11
Figura 4. Viabilidade <i>in vitro</i> de grãos de pólen de milho coletados em diferentes dias da antese as 10:00 horas. A) Viabilidade <i>in vitro</i> em meio de cultura sólido. B) Viabilidade <i>in vitro</i> em meio de cultura líquido. C) Viabilidade <i>in vitro</i> em teste de coloração com tetrazólio.	12
Figura 5. Viabilidade <i>in vitro</i> de grãos de pólen de milho coletados em diferentes dias da antese as 12:00 horas. A) Viabilidade <i>in vitro</i> em meio de cultura sólido. B) Viabilidade <i>in vitro</i> em meio de cultura líquido. C) Viabilidade <i>in vitro</i> em teste de coloração com tetrazólio.	13

MARTINS, E. S.; MIRANDA, G. J. **Viabilidade *in vitro* do pólen de cultivares de milho.** 2014. MONOGRAFIA (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de milho coletados em diferentes horários e dias no campo. Para tanto, foram coletados grãos de pólen de quatro cultivares (Sol da Manhã, XB 6012, XB 8010 e BRS 2020). As coletas foram realizadas do segundo ao quinto dia da antese em três horários diferentes. As amostras de pólen das cultivares foram submetidas para a avaliação da viabilidade *in vitro* por meio de teste de germinação em meio de cultura líquido e sólido e por teste de coloração em tetrazólio. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em parcelas subsubdividadas, com 48 tratamentos e quatro repetições. Com os dados obtidos da viabilidade dos grãos de pólen de milho fez-se a análise de variância, seguida de teste de agrupamento de média. As médias de viabilidade dos grãos de pólen de milho foram submetidas à análise de regressão linear. A viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen das diferentes cultivares de milho foram influenciadas pelas condições climáticas observadas no dia e horário de coleta do pólen. A maior viabilidade foi observada no terceiro dia de antese entre as 8:00 e 10:00 horas da manhã.

Palavras-chave: antese, polinização, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

O estudo da viabilidade de grãos de pólen de milho por meio de avaliações *in vitro* do melhor dia e horário de coleta se justifica em programas de melhoramento como uma forma de aumentar a eficiência dos cruzamentos realizados, além de possibilitar futuramente o armazenamento de pólen para posterior utilização em campo.

A viabilidade do pólen é considerada uma medida de fertilidade masculina muito empregada no monitoramento de pólen armazenado, de modo a garantir a fecundação e tornar possíveis cruzamentos entre genótipos de potencial econômico que apresentam floração em épocas distintas (SOARES et al., 2011).

Cuidados durante a coleta dos grãos de pólen, o estágio de amadurecimento do pendão e condições externas, como umidade do ar e temperatura, influenciam a viabilidade do pólen. De acordo com Almeida et al. (2002) gametas recém formados apresentam maior viabilidade que grãos de pólen amadurecidos. Temperaturas elevadas, acima de 35° C e estresse hídrico podem reduzir drasticamente a produção de grãos de pólen (MAGALHÃES e DURÃES, 2006).

Luna et al. (2001) observaram que, em condições de temperatura entre 28 a 30°C e umidade relativa acima de 53%, o pólen de milho pode manter-se viável durante 2 horas. Este praticamente perde a viabilidade 6 horas após a antese, podendo ainda germinar 1 a 3 dias depois, porém em porcentagem muito reduzida.

Existem varias formas de avaliar a viabilidade do pólen, como o teste de coloração com corantes químicos, germinação *in vitro* e *in vivo*. A reação de tetrazólio, uns dos tipos de testes de coloração, baseia-se na alteração da coloração dos tecidos, em presença de solução salina de 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio. Este é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando no composto formazan, de coloração vermelha carmim. Tecidos vivos, isto é viáveis, quando em contato com o composto apresentam-se corados. Tecidos mortos, ou não viáveis, não se coram. (VIEIRA et al., 1998).

As técnicas de germinação *in vitro* consistem em verificar a emissão do tubo polínico, determinando se o pólen ira fecundar o estilo estigma do milho. Segundo Almeida et al. (2011) a germinação *in vitro* de pólen apresenta alta correlação com a fertilização no campo. Neste processo, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura e a viabilidade é observada por meio de microscópio óptico através da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico. São considerados germinados os grãos que apresentam tubos polínicos que

ultrapassam o comprimento do diâmetro do próprio grão de pólen (VEIGA et al., 2012; SHIVANNA e RANGASWAMY, 1992).

O sucesso da germinação *in vitro* depende de vários fatores como espécie vegetal, estado nutricional das plantas, época do ano e horário de coleta, fotoperíodo, temperatura, método de coleta, período de incubação e presença de micro e macronutrientes no meio de cultura (SOARES et al. 2008). Além de ajustes da composição dos meios de cultura para cada espécie (CHAGAS et al., 2010; SINIMBU NETO et al., 2011). Em várias espécies, como eucalipto e cebola, esse procedimento já é difundido (PEREIRA et al., 2002; GOMES et al., 2003).

Alguns relatos quanto ao uso destas técnicas estão relacionadas à cultura do milho (BARNABÁS et al., 1988; ALMEIDA et al., 2002; AYLOR, 2004, FERREIRA et al., 2007, DAVIDE et al., 2009). Ferreira et al. (2007), testaram algumas alternativas de armazenamento de pólen e constataram que a porcentagem de pólen viável foi muito pequena quando esse foi armazenado por até 15 dias. O mesmo ocorreu com Davide et al. (2009) trabalhando com a cultura do milho, verificando uma germinação de 15,33% com o pólen de milho armazenado por 14 dias. Tais resultados nos mostram a dificuldade de estabelecer técnicas e metodologias específicas, necessitando de novos estudos que possibilitem e tornem viável a utilização do armazenamento do pólen sem que esse perca sua viabilidade.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de milho em diferentes dias e horários de coleta no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi implantado em dezembro de 2011 na área experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, em Dourados – MS, com coordenadas de aproximadamente 22°13'15' de latitude Sul, 54°48'21'' de longitude Oeste e 430 m de altitude.

Quatro cultivares de milho com diferentes características agronômicas foram semeadas de forma escalonada sem delineamento estatístico, a cada sete dias, totalizando três semeaduras, a fim de garantir a quantidade de pólen necessário para as avaliações em laboratório (Tabela 1). Para cada genótipo foram semeadas 3 linhas de 10 metros, com espaçamento entre linhas de 0,9 m e entre plantas de 0,25m. Na semeadura, foram utilizados

400 kg ha⁻¹ da fórmula 8 (N): 28 (P₂O₅): 16 (K₂O). Os demais tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura.

As coletas dos grãos de pólen de milho foram realizadas entre os dias 10 e 13 de fevereiro de 2012. Durante a fase de antese foram tomados os dados de temperatura, umidade relativa e precipitação (Figura 1). Os grãos de pólen de 10 plantas de cada genótipo foram coletados do segundo ao quinto dia da antese, em 3 horários diferentes - 8:00, 10:00 e 12:00 horas. Para isto, no momento da coleta dos grãos de pólen os pendões foram cobertos com papel *Kraft* impermeável, seguido de leve agitação para liberação dos grãos de pólen. Este foi peneirado a fim de eliminar as anteras e 1,0 mL de pólen de cada uma das 10 plantas de cada cultivar foram dispostos em *eppendorf* de 1,5 mL e levados imediatamente ao laboratório para avaliação da viabilidade *in vitro*.

A viabilidade dos grãos de pólen foi analisada pela capacidade de germinação *in vitro* dos mesmos em meio de cultura líquido e sólido e em teste de tetrazólio. O meio de cultura líquido foi composto por 10% de sacarose; 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de cálcio. No meio de cultura sólido foram utilizados os mesmos reagentes do meio líquido mais 1,2% de agar. (FERREIRA et al., 2007; DAVIDE et al., 2009).

A capacidade de germinação dos grãos de pólen viáveis em meio de cultura foi observada em microscópio óptico, com objetiva de aumento de 10X, avaliando-se quatro campos de visão, correspondendo a quatro repetições. Foram considerados germinados os grãos que apresentavam tubos polínicos que ultrapassavam o comprimento do diâmetro do próprio grão de pólen (Figura 2).

Tabela 1. Cultivares de milho utilizadas para avaliação da viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de milho.

Cultivar	Empresa	Tipo	Ciclo
Sol da Manhã	EMBRAPA	Variedade	Precoce
XB 6012	SEMEALI	Híbrido simples	Precoce
XB 8010	SEMEALI	Híbrido duplo	Precoce
BRS 2020	EMBRAPA	Híbrido duplo	Precoce

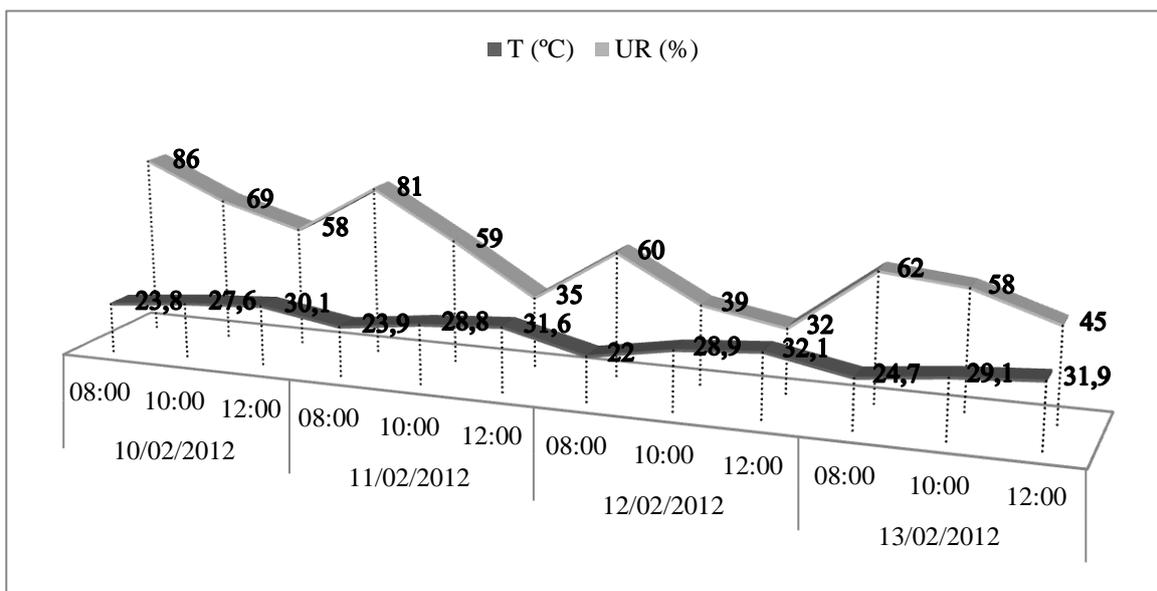


Figura 1. Temperatura (°C) e umidade relativa (%) observadas no campo experimental durante a fase de antese de 4 cultivares de milho.

A viabilidade dos grãos também foi avaliada pelo teste de tetrazólio. Em um microtubo foram acrescentados 0,05 mL de grãos de pólen frescos e 5 mL de 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio 0,75%. Os microtubos foram cobertos por papel alumínio previamente identificados e delicadamente agitados, a fim de permitir um melhor contato entre os grãos de pólen e a solução. Em seguida, os microtubos foram colocados em incubadora BOD a 25°C por 1 horas. Após este período, a viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada por meio da coloração da massa de pólen em um microscópio óptico com objetiva de aumento de 10X, em quatro campos de visão, sendo cada campo uma repetição. Os grãos de pólen com padrão de coloração vermelho foram considerados viáveis e os incolores, inviáveis (Figura 2).

O delineamento experimental utilizado nas avaliações em laboratório foi inteiramente ao acaso, com parcelas subdivididas, com 48 tratamentos e quatro repetições. As parcelas principais foram constituídas por quatro cultivares de milho, as subparcelas por quatro dias de coleta de pólen e as subsubparcelas por três horários de coleta de pólen. A característica avaliada foi a viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen de milho.

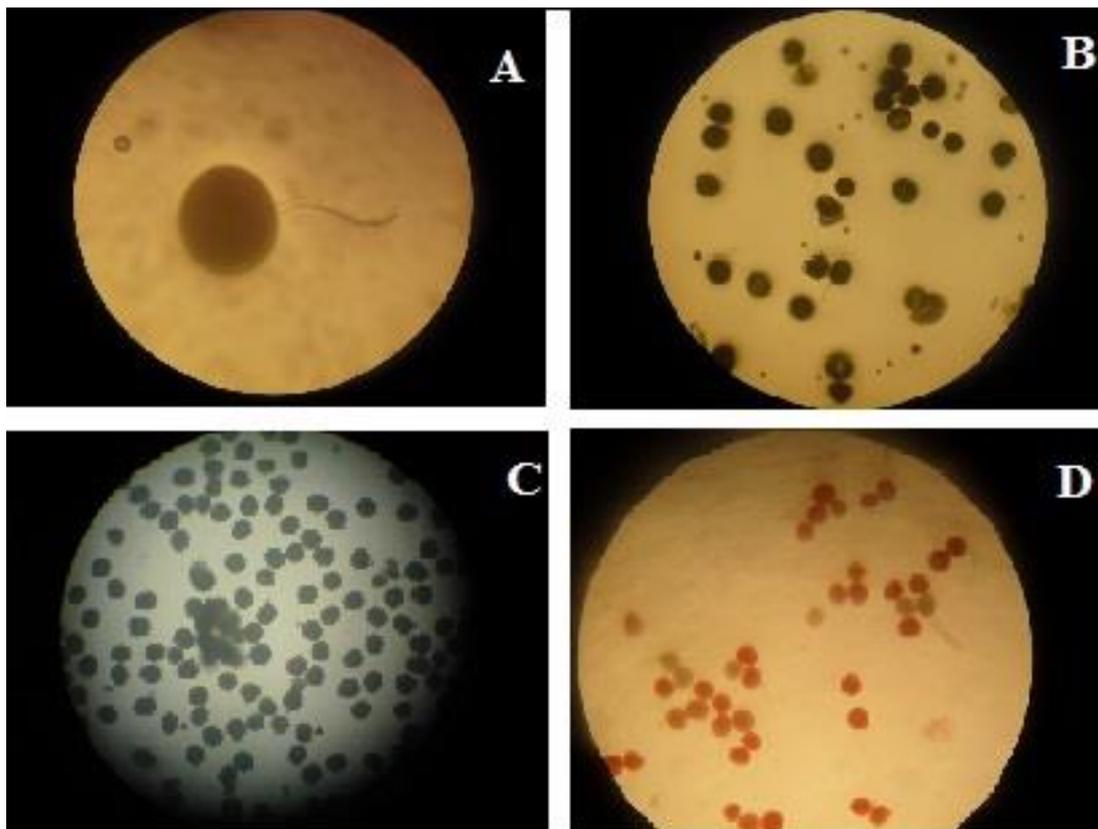


Figura 2. Germinação e viabilidade *in vitro* de grãos de pólen. A) Grãos de pólen germinado em meio de cultura sólido, apresentando tubo polínico maior que o diâmetro do grão (viável). B) Grãos de pólen não germinados em meio de cultura sólido (inviável). C) Grãos de pólen inviáveis em teste de tetrazólio. D) Grão de pólen viáveis (corados) em teste de tetrazólio.

Os dados foram submetidos à transformação $\sqrt{\%}$ de grãos de pólen viáveis. A análise de variância e o teste de agrupamento de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade foram realizados por meio do pacote estatístico ASSISTAT 7.7 (SILVA, 2013). As médias das variáveis quantitativas (% de grãos de pólen viáveis) foram submetidas à análise de regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A porcentagem de viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen avaliada em diferentes meios de cultura e em teste de tetrazólio apresentou diferenças significativas (Tabela 2). O

coeficiente de variação (CV%) foi de 3,77, valor considerado baixo, indicando boa precisão experimental, conforme Ferreira (1996).

A quantidade de sacarose, boro e cloreto de cálcio utilizados nos meios de cultura foi suficiente para garantir energia para auxiliar no processo de desenvolvimento do tubo polínico. Entretanto, a porcentagem de germinação *in vitro* foi mediana, indicando necessidade de alteração das concentrações utilizadas nos meios de cultura, principalmente de boro (Tabela 3). A baixa concentração de boro pode levar a inibição da divisão celular, aumentar a porcentagem de pólen anormal, inibir o crescimento do tubo polínico e diminuir a probabilidade de rompimento do mesmo (STANLEY e LINSKENS, 1974; FRANZON et al., 2007). Outra alternativa seria a inclusão de novos nutrientes ao meio de cultura, como por exemplo o molibdênio. A falta deste nutriente afeta principalmente a quantidade de água contida no grão de pólen e conseqüentemente a sua germinação (AGARWALA et al., 1979).

Verificou-se que o meio líquido foi mais eficiente que o meio sólido. Isso pode ser explicado pela presença do ágar no meio sólido, que em altas concentrações pode servir como barreira física e dificultar a emissão do tubo polínico (ALMEIDA et al., 2002).

Comparando-se a eficiência dos meios de cultura com o método de tetrazólio, verificou-se que o último apresentou maiores estimativas. Segundo Rodriguez-Riano e Dafni (2000), o método de tetrazólio pode superestimar a viabilidade, pois, algumas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ser corados, devido à presença suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias. Ainda Segundo Scorza e Sherman (1995), as reações com corantes podem não se correlacionar bem com a germinação *in vitro*. Assim, sugere-se a utilização de teste em meio de cultura líquido para avaliação da viabilidade *in vitro* dos grãos de pólen de milho.

Tabela 2. Resumo da análise de variância da viabilidade de grãos de pólen de milho avaliados em meio de cultura líquido, sólido e em teste de coloração em tetrazólio.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio
Tratamento	2	180,80**
Resíduo	9	1,47
Média (%)	-	32,21
CV (%)	-	3,77

** significativo 1% de probabilidade pelo teste de F.

Tabela 3. Viabilidade de grãos de pólen de milho avaliados em meio de cultura líquido, sólido e tetrazólio.

Meio	Viabilidade (%)
Líquido	32,37 b
Sólido	25,41 c
Tetrazólio	38,85 a

¹Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

Foram verificadas diferenças significativas para cultivares de milho, dias de antese, horários de coleta de grãos de pólen e suas interações quanto à viabilidade de grãos de pólen de milho (Tabela 4).

A maior viabilidade de grãos de pólen foi observada para os híbridos duplos XB 8010 e BRS 2020 em testes realizados em meio de cultura líquido e em teste de coloração com tetrazólio. Quando em meio de cultura sólido, o híbrido duplo BRS 2020, apresentou como o de maior porcentagem de germinação em relação as outras cultivares.

Independente do meio de cultura utilizado verificou-se que a maior porcentagem de germinação ocorreu nos primeiros dias da antese, sendo seu auge no segundo dia de coleta de pólen (terceiro dia da antese). Segundo Bignotto (2002) o período de antese pode durar de 2 a 14 dias, com maior frequência de 5 a 8 dias, tendo um máximo no terceiro dia.

A viabilidade do grão de pólen de milho avaliado em meio de cultura líquido e sólido teve comportamento semelhante aos relatados na literatura. Segundo Luna et al. (2001) umidades relativas abaixo de 53% reduzem drasticamente a viabilidade do grão de pólen, condição encontrada a partir do terceiro dia de coleta de pólen.

A partir das 8:00 horas a viabilidade de grãos de pólen possui valores consideráveis, sendo seu ápice observado às 10:00 horas da manhã. Às 12:00 horas foi observada a menor taxa de germinação. As altas temperaturas observadas neste horário estão relacionadas a menor umidade relativa, condição desfavorável a germinação e emissão dos tubos polínicos de grãos de pólen. Estes resultados assemelham-se ao obtido por Ferreira et al. (2007), onde foram avaliados 3 horário de coleta 9:00, 14:00 e 16:00 horas, sendo que a maior taxa de germinação ocorreu às 9:00 horas e a menor às 16:00 horas. Provavelmente, às condições climáticas mais favoráveis as viabilidades do pólen ocorrem no período das 8:00 às 10:00 horas da manhã, onde não há um excesso de umidade nos pendões e a temperatura é amena, se comparada ao período da tarde.

Tabela 4. Viabilidade de grãos de pólen de milho avaliados em quatro cultivares, quatro dias de antese e três horários de coleta.

Tratamentos ¹	Viabilidade em meio líquido (%)	Viabilidade em meio sólido (%)	Viabilidade em tetrazólio (%)
Cultivar (C)	179,41**	607,56**	1293,81**
Sol da Manhã	30,09 b	21,74 b	37,84 b
XB 6012	31,83 b	24,03 b	38,35 b
XB 8010	33,70 a	25,71 b	45,21 a
BRS 2020	34,36 a	30,16 a	48,38 a
Dia (D)	488,66**	937,99**	3533,36**
1	34,44 a	21,68 b	31,88 c
2	35,93 a	31,80 a	49,01 a
3	30,33 b	23,64 c	49,84 a
4	29,28 b	24,51 b	39,04 b
Horário (H)	1774,58**	1652,65**	2334,54**
08:00h	31,06 b	26,43 b	44,12 b
10:00h	38,33 a	29,90 a	47,47 a
12:00h	28,11 c	19,89 c	35,74 c
C x D	250,05**	318,18**	623,14**
C x H	286,11**	255,36**	1077,39**
D x H	312,62**	409,64**	1840,78**
C x D x H	488,52**	201,85**	578,85**
CV(%) parcela	13,40	31,11	18,03
CV(%) subparcela	15,75	17,61	10,55
CV(%) subsubparcela	15,72	17,71	12,24

¹Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade. ** significativo 1% de probabilidade pelo teste de F.

A resposta de cada cultivar quanto ao dia e ao horário coleta pode ser observada nas figuras 3, 4 e 5. Percebe-se uma alta influência do genótipo em relação à viabilidade dos grãos de pólen de milho, de modo que dependendo das condições ambientais cada cultivar se comporta de uma maneira diferente. Na coleta de pólen as 8:00 horas, quando em meio sólido, as cultivares XB 8010 e Sol da Manhã obtiveram os melhores valores de viabilidade *in vitro* de grão de pólen, próximos a 45%, com o pico no segundo dia de coleta. A BRS 2020 teve valores próximos a 40% no primeiro dia, seguida da XB 6012 com uma viabilidade de 35% entre o segundo e terceiro dias de coleta (Figura 3). Em meio líquido as cultivares XB 6012, XB 8010 e BRS 2020 apresentam comportamentos semelhantes. Verifica-se para estas valores máximos de viabilidade, próximos a 45%; sendo para XB 8010 e BRS 2020 entre o primeiro e segundo dia de coleta e para a XB 6012 ao segundo dia de coleta. Já a Sol da Manhã proporcionou valores próximos a 40% com auge entre o primeiro e segundo dia de

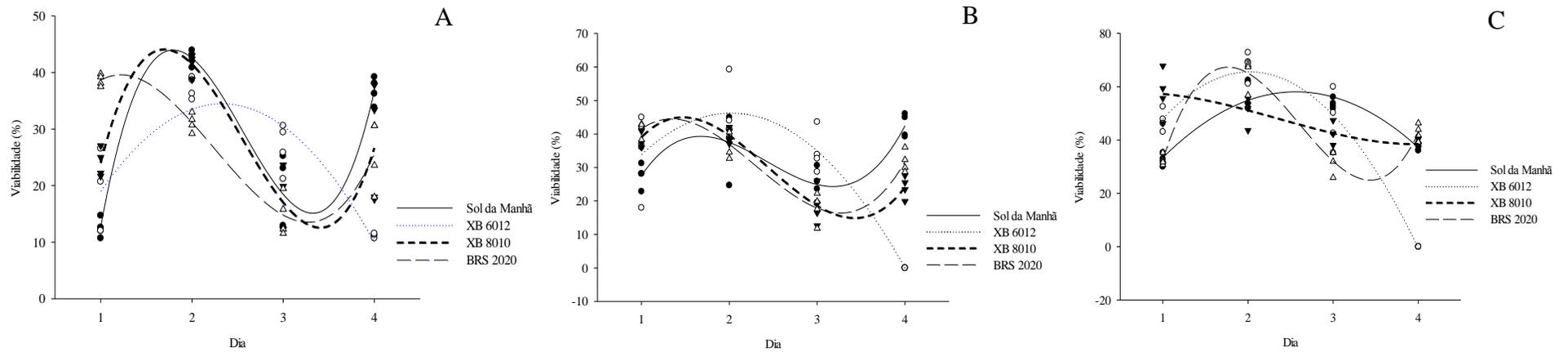
coleta. Para o teste em coloração com tetrazólio a BRS 2020 teve valores superiores em relação as outras cultivares com estimativas de viabilidade próximas a 70% entre o primeiro e segundo dia, seguida da XB 6012 com 65% de viabilidade de grãos de pólen e Sol da Manhã com 60%. Para a cultivar XB 8010 nota-se uma queda do primeiro ao quarto dia, diminuindo sua viabilidade quando mais maduro fosse o pendão. Nota-se que para a maioria das funções, os coeficientes de determinação (R^2) foram sempre próximos a 1, evidenciando que os modelos utilizados são os que melhor se ajustam a amostra, quando avaliados às 8 horas.

As 10:00 horas, em meio sólido, a equação para a cultivar BRS 2020 foi não significativa tendo um baixo ajuste ($R^2=0,21$), mostrando que a variação ocorrida na viabilidade de grãos de pólen não é totalmente explicada pelas variações ocorrida nos diferentes dias. As outras cultivares obtiveram um bom ajuste, tendo a XB 8010 as melhores estimativas com valores próximos a 40% entre o terceiro e quarto dia de coleta, seguido da XB 6012 com 35% de viabilidade do pólen ao segundo dia de coleta e a Sol da Manhã. Quando em meio líquido a Sol da Manhã apresenta um comportamento superior as outras cultivares com valores acima de 55% de pólen viáveis ao segundo dia de coleta, acompanhada da XB 8010 com 50% ao terceiro dia. A cultivar XB 6012 teve um baixo ajuste ($R^2=0,42$), apresentando pouca variação nos diferentes dias de coleta, sendo no primeiro dia de coleta 30% de grãos de pólen viáveis e no quarto dia próximo a 40%. Já em tetrazólio, pode-se inferir que todas tiveram um bom ajuste na reta, sendo todos estes significativos. Verifica-se um comportamento semelhante para cultivar Sol da Manhã e XB 8010 com um pico de viabilidade no terceiro dia de coleta com valores acima de 60% de grãos de pólen viável. As cultivares BRS 2020 e XB 6012 possuem um aumento na viabilidade até o segundo dia, 60% e 50% respectivamente, tendo uma queda ao terceiro dia seguida de leve recuperação ao quarto dia.

No último horário de coleta, as 12:00, nota-se um baixo ajuste da reta para a variedade Sol da Manhã em meio sólido ($R^2=0,24$) e pro híbrido simples XB 6012 ($R^2=0,32$) em meio líquido, não variando muito sua viabilidade ao decorrer dos dias de coleta. Neste horário, que o híbrido duplo BRS 2020, em todos os meios de cultura avaliados e no teste de coloração, obteve valores sempre superiores as outras cultivares estudadas, chegando há apresentar 15% de grãos de pólen viável a mais que os outros genótipos. Nota-se também, que em geral, as cultivares Sol da Manhã e XB 6012 apresentam valores baixos de viabilidade quando comparada a BRS 2020, mostrando que este horário não é o mais recomendado para coleta do grão de pólen nestas cultivares.

As cultivares Sol da Manhã e XB 6012 apresentam as 8:00 horas viabilidade maior quando comparado aos outros horário de coleta, independente do meio de cultura utilizado. Diferentemente do híbrido duplo XB 8010 que possui uma maior viabilidade as 10:00 horas da manhã. Pode-se especular que à morfologia do pendão das cultivares interfira na viabilidade de grãos de pólen, sendo que pendões com maior ângulo de inserção entre a raquis e as ramificações laterais apresentarão maior deiscência do pólen já aos primeiros horários do dia, como no caso das cultivares Sol da Manhã e XB 6012.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os observados na literatura (BIGNOTTO, 2002; LUNA et al., 2001). A maioria das cultivares apresentou maior quantidade de grãos de pólen viáveis ao segundo dia de coleta, terceiro dia de antese. A queda de umidade pode levar a redução da viabilidade dos grãos de pólen.

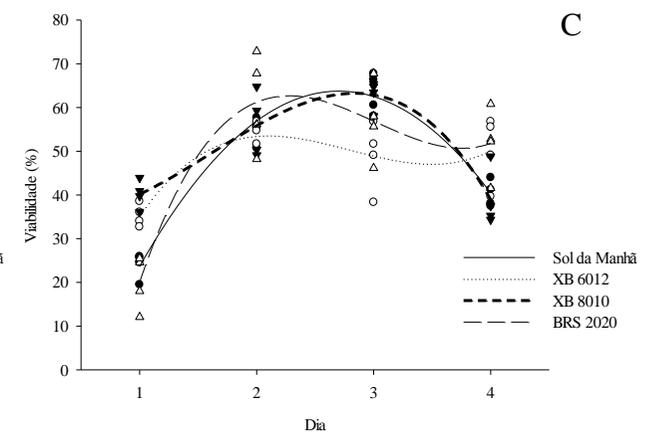
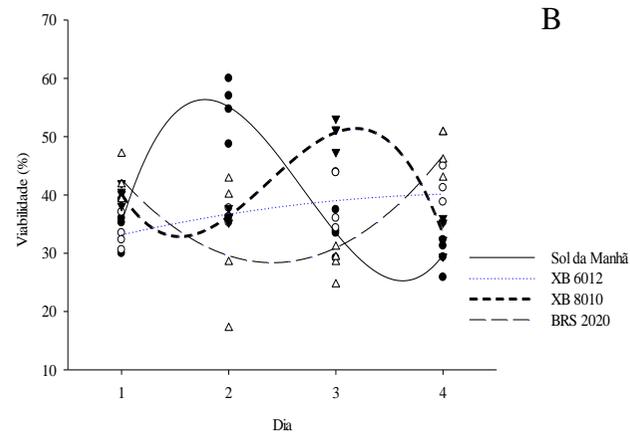
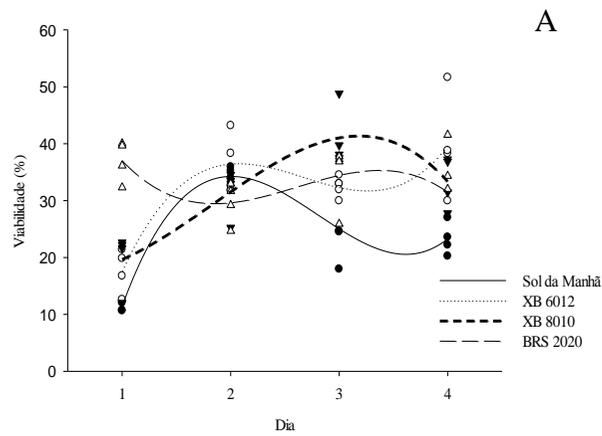


Cultivares	Equações	P=	R ² =
Sol da Manhã	$\hat{y} = -167,9352 + 287,9698x - 123,5386x^2 + 16,0866x^3$	0,0001	0,93
XB 6012	$\hat{y} = -12,9929 + 40,8712x - 8,7867x^2$	0,0001	0,80
XB 8010	$\hat{y} = -111,3977 + 219,6540x - 96,9364x^2 + 12,6631x^3$	0,0009	0,73
BRS 2020	$\hat{y} = 1,1385 + 72,0655x - 40,5802x^2 + 6,0246x^3$	0,0001	0,88

Cultivares	Equações	P=	R ² =
Sol da Manhã	$\hat{y} = -57,68 + 140,50x - 64,045x^2 + 8,7950x^3$	0,0025	0,68
XB 6012	$\hat{y} = -1,88575 + 47,7243x - 11,8192x^2$	0,0001	0,86
XB 8010	$\hat{y} = -31,0040 + 120,8094x - 58,7826x^2 + 8,0058x^3$	0,0001	0,89
BRS 2020	$\hat{y} = -15,5122 + 103,7065x - 54,5332x^2 + 7,8904x^3$	0,0001	0,89

Cultivares	Equações	P=	R ² =
Sol da Manhã	$\hat{y} = -8,2997 + 51,8224x - 10,1132x^2$	0,0001	0,90
XB 6012	$\hat{y} = -3,0857 + 68,1979x - 16,9052x^2$	0,0001	0,95
XB 8010	$\hat{y} = 54,0336 + 10,2292x - 8,1433x^2 + 1,1534x^3$	0,0019	0,69
BRS 2020	$\hat{y} = -174,9189 + 331,2584x - 142,06x^2 + 18,2138x^3$	0,0001	0,93

Figura 3. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de milho coletados em diferentes dias da antese as 8:00 horas. A) Viabilidade *in vitro* em meio de cultura sólido. B) Viabilidade *in vitro* em meio de cultura líquido. C) Viabilidade *in vitro* em teste de coloração com tetrazólio



Cultivares	Equações	P=
Sol da Manhã	$\hat{y} = -82,9212 + 143,2964x - 55,5218x^2 + 6,5838x^3$	0,0001 $R^2 = 0,87$
XB 6012	$\hat{y} = -58,6280 + 116,5047x - 45,9564x^2 + 5,7440x^3$	0,0006 $R^2 = 0,7491$
XB 8010	$\hat{y} = 20,0348 - 11,4734x + 13,5351x^2 - 2,4586x^3$	0,0004 $R^2 = 0,77$
BRS 2020	$\hat{y} = 76,6798 - 62,4277x + 26,1207x^2 - 3,3348x^3$	0,3910 $R^2 = 0,21$

Cultivares	Equações	P=
Sol da Manhã	$\hat{y} = -85,8854 + 191,3385x - 80,2219x^2 + 9,9028x^3$	0,0001 $R^2 = 0,90$
XB 6012	$\hat{y} = 28,45 + 5,3903x - 0,6118x^2$	0,02 $R^2 = 0,42$
XB 8010	$\hat{y} = 112,4904 - 123,1645x + 59,2597x^2 - 8,3551x^3$	0,0001 $R^2 = 0,92$
BRS 2020	$\hat{y} = 70,2790 - 34,8414x + 7,2422x^2$	0,0025 $R^2 = 0,60$

Cultivares	Equações	P=
Sol da Manhã	$\hat{y} = -37,2885 + 74,7817x - 13,8371x^2$	0,0001 $R^2 = 0,9669$
XB 6012	$\hat{y} = -34,0325 + 104,4528x - 39,8472x^2 + 4,7508x^3$	0,0042 $R^2 = 0,65$
XB 8010	$\hat{y} = 38,1213 - 12,1797x + 17,9566x^2 - 3,7145x^3$	0,0001 $R^2 = 0,82$
BRS 2020	$\hat{y} = -111,6899 + 191,8874x - 67,6685x^2 + 7,4792x^3$	0,0001 $R^2 = 0,82$

Figura 4. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de milho coletados em diferentes dias da antese as 10:00 horas. **A)** Viabilidade *in vitro* em meio de cultura sólido. **B)** Viabilidade *in vitro* em meio de cultura líquido. **C)** Viabilidade *in vitro* em teste de coloração com tetrazólio

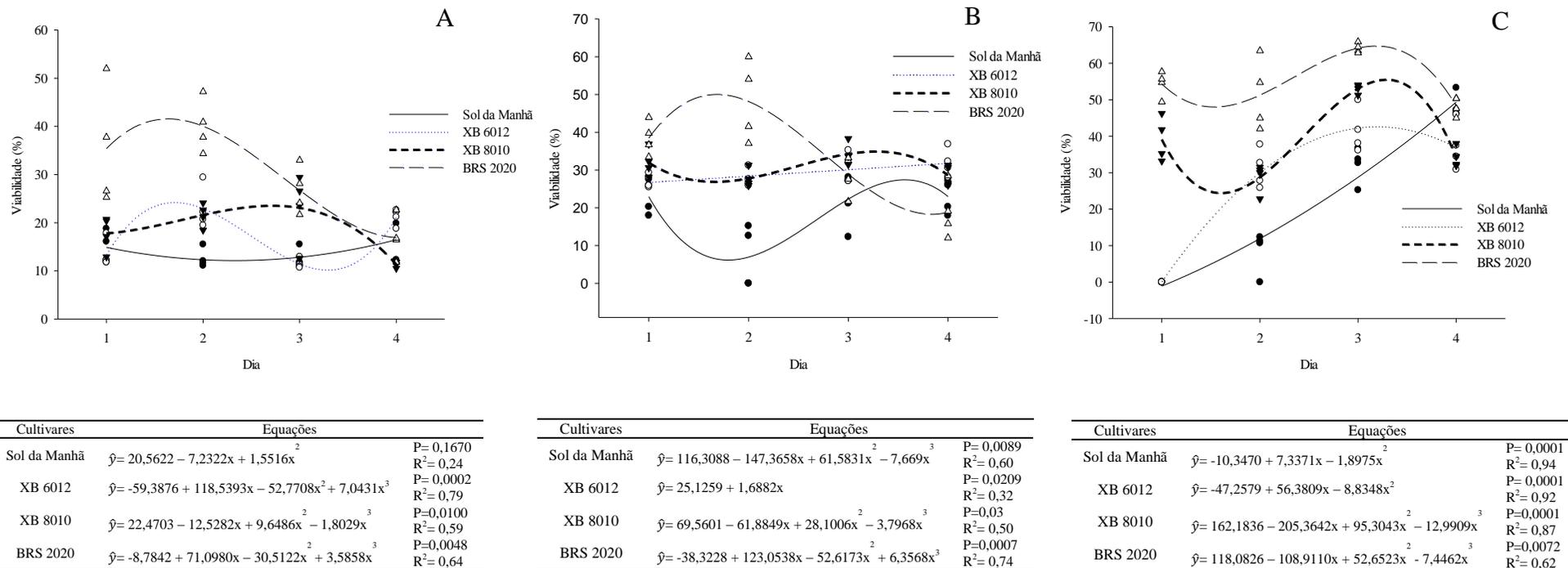


Figura 5. Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de milho coletados em diferentes dias da antese as 12:00 horas. A) Viabilidade *in vitro* em meio de cultura sólido. B) Viabilidade *in vitro* em meio de cultura líquido. C) Viabilidade *in vitro* em teste de coloração com tetrazólio.

CONCLUSÕES

O comportamento das cultivares quanto a viabilidade de pólen é dependente das condições climáticas.

O terceiro dia da antese e os horários entre 8:00 e 10:00 horas da manhã podem ser considerados os melhores para realização de polinizações em campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, C.; AMARAL, A. L.; BARBOSA NETO, J. F.; SERENO, M. J. C. M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasil**. Botucatu, vol.34, n.4, p. 493-497, 2011.

AYLOR D. E. Survival of maize (*Zea mays*) pollen exposed in the atmosphere. **Agricultural and Forest Meteorology**, s.l, v.123, p.125-133, 2004.

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.

BIGNOTTO, E. A. **Seleção gamética por meio da posição de semente na espiga de milho**. 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CHAGAS, E.A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUA, M.; BETTIOL NETO, J. E.; Composição de meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.40, n.2, p.231-236, 2010.

DAVIDE, L. M. C.; PEREIRA, R. C.; ABREU, G. B.; SOUZA, J. C.; VON PINHO, E. V. R. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.8, p. 199-206, 2009.

FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada a agronomia**. Maceió: Edufal, 1996. 606 p.

- 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.
- FRANZON, R.C., RASEIRA, M.C.B., WAGNER JR, A. Testes de germinação in vitro e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 29, 251-255, 2007.
- GOMES, P. R., RASEIRA, M. C. B. AND BAUDET, L. L. Onion (*Allium cepa* L.) Pollen Storage. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, n 1, p.14-17, 2003.
- LUNA, V.S., FIGUEROA, M.J., BALTAZAR, M.B., GOMEZ, L.R., TOWNSEND, R., SCHOPER, J.B. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, v. 41, p.1551–1557, 2001.
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. Fisiologia do milho. Sete Lagoas: **EMBRAPA-CNPMS**, 2006. 10p. (Circular Técnica, 76).
- PEREIRA, R. C.; RAMALHO, M. A. ; DAVIDE, L.C. ; ANDRADE, H. B. . Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de Eucalyptus. **Revista Cerne**, Lavras, v. 2, p. 60-69, 2002.
- RODRIGUEZ-RIANO, T., DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, Springer-Verlag, v. 12, p.241-244, 2000.
- SOARES, T.L; SILVA, S.O.; COSTA, M. A. C.; SEJO, J. A. S.; SOUZA, A. S.; LINO., L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.8, p.111-118, 2008.
- SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; ROSSI, M. L.; SOUZA, F. V. D. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciencia Rural**. Santa Maria, vol.41, n.10, p. 1744-1749, 2011.
- SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. Fruit breeding. **New York: John & Sons**, 1995. p.325-440.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington D.C., v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology**. A laboratory manual. Berlin; New York: Springer-Verlag, 1992. 119p.
- SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. 2013 INPI 0004051-2. Disponível em: <http://www.assistat.com>. Acesso em 12 de maio de 2014.
- SINIMBÚ NETO, F.A.; MARTINS, A.B.G; BARBOSA, J.C. Viabilidade in vitro de grãos de pólen de bacurizeiro - Clusiaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, p. 593-600, 2011.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen: biology, biochemistry management. **Berlin: Springer-Verlag**, Berlin, 1974. 307 p.

VEIGA, P. O. A.; PINHO, R. G. V.; PINHO, E. V. R. V.; VEIGA, A. D.; OLIVEIRA, K. C.; DINIZ, R. P. Meios de cultura para germinação de grãos de pólen de milho. **Revista Agrarian**. Dourados, v.5, n.17, p.206-211, 2012.

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 anos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).