

### **Avaliação Da Viabilidade *In Vitro* De Grãos De Pólen De Milho**

Arthur Kenji Mendes Maeda<sup>1</sup>, André Carlesso<sup>2</sup>, Emanuel Sanches Martins<sup>3</sup>, Livia Maria Chamma Davide<sup>4</sup>, Gian José Miranda<sup>5</sup>, Jefferson de Oliveira Barizon<sup>6</sup>, Rafael Heinz<sup>7</sup>, Wesley Souza Prado<sup>8</sup> e Francisco de Assis Souza Junior<sup>9</sup>.

1- Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados-MS, arthur\_maeda@hotmail.com, 2- UFGD, Dourados-MS, andre\_titimi@hotmail.com, 3- UFGD, Dourados-MS, manoemanoel@hotmail.com, 4- UFGD, Dourados-MS, liviadavide@ufgd.edu.br, 5- UFGD, Dourados-MS, gian\_defendi@hotmail.com, 6- UFGD, Dourados-MS, jeffersonbarizon@hotmail.com, 7-UFGD, Dourados-MS, rafael\_heinz@hotmail.com, 8- UFGD, Dourados-MS, wesleywsp@hotmail.com, 9- UFGD, Dourados-MS, junior.souza05@hotmail.com.

**RESUMO** - A avaliação da viabilidade do pólen de milho se justifica como uma forma de possibilitar num futuro o armazenamento deste e possivelmente a polinização cruzada entre genótipos com ciclo de polinização distintos. Deste modo o objetivo deste trabalho foi verificar qual o período em que os grãos de pólen estão mais viáveis no campo, por meio da avaliação do melhor dia e horário para a coleta dos mesmos onde foi estudado a germinação com meio de cultura e em teste de coloração com tetrazólio. O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do Campus II da Universidade Federal da Grande Dourados. Os horários de coleta foram 8, 10 e 12 horas, apresentando o horário das 10 a maior quantidade de pólen viável, e o segundo e terceiro dia da fase de antese das cultivares como melhor dia para coleta do pólen. As cultivares analisadas foram Variedade, Híbrido simples, Híbrido duplo 1 e 2 e Híbrido triplo, sendo o Híbrido duplo 2 melhores resultados no teste de germinação em meio de cultura e em coloração.

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

### **Introdução**

O milho é uma gramínea da espécie *Zea mays*, da família Poaceae, que atualmente é cultivado em vários continentes, sendo os maiores produtores Estados Unidos, China, Brasil e México, dada a importância desta cultura, muitos programas de melhoramento trabalham a fim de desenvolver novas variedades, híbridos e linhagens que se adequem ao produtor, ao consumidor e às indústrias alimentícias.

A avaliação da viabilidade do pólen de milho se justifica como uma forma de possibilitar num futuro o armazenamento deste e possivelmente a polinização cruzada entre genótipos com ciclo de polinização distintos, facilitando, deste modo, a busca de indivíduos superiores pelo melhoramento genético.

Existe essa procura por um método eficaz para a conservação do pólen de milho, sem que haja perda de sua eficiência germinativa. Em base que já existem métodos de conservação utilizados em várias outras espécies (Pereira et al., 2002; Gomes et al., 2003). Um dos grandes problemas no armazenamento do pólen é a certificação de viabilidade do mesmo. Pois ainda não existe um método completamente satisfatório para a determinação da viabilidade do pólen após o armazenamento (Stanley e Linskens 1974). Existem várias formas de avaliar a viabilidade do pólen, dentre tantas, temos em teste com tetrazólio e em meio de

cultura, o primeiro sendo considerados os grãos corados como viáveis e o segundo consiste em verificar a emissão do tubo polínico, determinando se o pólen irá fecundar o estilo estigma do milho, entretanto o tubo polínico para ser considerado viável deve ser de ter tamanho maior do que a circunferência do grão de pólen.

Há ainda que considerar que diversos fatores influenciam na germinação *in vitro* do grão de pólen como 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). Coletando este grão em diversos horários e dias distintos poderia conseguir uma coleta com maior número de grãos de pólen viáveis, de forma que viabilizaria uma melhor polinização, pois estes não seriam afetados por condições desfavoráveis a sua coleta.

Deste modo objetivou-se com este trabalho, verificar o período em que os grãos de pólen estão mais viáveis no campo, por meio da avaliação do melhor dia e horário para a coleta do mesmo.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido em Dourados MS, no campus II da Universidade Federal da Grande Dourados no Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias, com coordenadas 22°11'51,36"S e 54°56'16,02"O a 224 km de Campo Grande - MS. O clima de Dourados apresenta características de verão quente e chuvoso e inverno frio e seco. As temperaturas médias ficam em torno de 22° C e ocorrem de outubro até abril. Nos outros meses do ano, são registradas médias de 17 e 21° C. Os meses mais frios são junho e julho e os mais quentes são dezembro e janeiro. A altitude é em torno de 430 m. As condições climáticas em Dourados ao final dos meses de setembro e começo de outubro são amenas.

Foram utilizados 1 variedade (Sol da manhã), 1 híbrido simples (XB6012), 2 híbridos duplos (XB8010 Híbrido duplo 1; BRS2020 Híbrido duplo 2) e 1 híbrido triplo (BRS3030) com diferentes características agrônômicas e genéticas. Os genótipos utilizados foram plantados a partir do dia 08/12/2011 de forma escalonada a cada sete dias, sendo no final três plantios, a fim de garantir a quantidade de pólen necessário para as avaliações em laboratório. Para cada genótipo foram plantado 3 linhas de 10 metros, com espaçamento entre linhas de 0,9 m e entre plantas de 0,25 m. Na semeadura, foram utilizados 400 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 8 (N): 28 (P2O5): 16 (K2O). Os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações da cultura.

A viabilidade do pólen de milho foi avaliada a partir do primeiro até o último dia da antese. Para isso, grãos de pólen de 10 plantas de cada genótipo foram coletados às 8, 10 e 12 horas. A coleta foi realizada de maneira tradicional, ou seja, introduzindo o pendão em um saco de papel pardo impermeável, seguido por leve agitação do mesmo. O material coletado foi coado em peneira a fim de separar as anteras secas e outras impurezas da amostra. Em seguida, 1,0 mL de pólen de cada cultivar foi colocado em eppendorf de 1,5 mL e levado ao laboratório de Fitopatologia.

A viabilidade dos mesmos 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 – trifênil cloreto de tetrazólio 0,75%. O tetrazólio é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando num composto chamado formazan, de coloração vermelha carmim. O padrão de coloração dos tecidos pode ser utilizado para classificar os grãos de pólen corados como viáveis e os incolores, como inviáveis.

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 os tetrazólio 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 cor da massa de pólen no microtubo visualizadas pela da coloração dos grãos de pólen em lâminas, observadas em um microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x.

A viabilidade dos grãos de pólen foi confirmada pela avaliação da sua capacidade de germinação em meio de cultura, conforme realizado por Ferreira et al. (2007). O meio de cultura foi composto por 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de cálcio. Os componentes dos meios de cultura foram completamente dissolvidos em água destilada. Os meios de cultura foram vertidos em lâminas para microscopia e em placas de Petri. Após o resfriamento do meio, os grãos de pólen foram espalhados sobre os mesmos, com o auxílio de um pincel. A contagem de grãos de pólen viáveis foi feita 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.

A partir dos dados obtidos foi realizada uma análise de variância, seguido por teste de agrupamento de médias de Scott e Knott (1974) à 5% de probabilidade. Os experimentos foram avaliados usando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2008).

## Resultados e Discussões

A análise de grãos de pólen germinados nos teste em meio de cultura apresentaram resultados expressivos quanto a viabilidade. Scorza e Sherman (1995), consideram que um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos, e com envelhecimento dos grãos pólen, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Em meio líquido observou diferença significativa nas interações cultivar x dia, cultivar x horário e cultivar x dia x horário, a nível de 5% de probabilidade no teste de Scott e Knott (1974). A presença de interação significativa implica um maior esforço do pesquisador em detalhar mais a análise dos dados (Zimmermann, 2004).

Nas tabelas 1 e 2 temos a análise da viabilidade do pólen em meio líquido de diversas cultivares em diferentes horários e dias, podendo observar que as cultivares são influenciadas pelos horários de coleta e pelos dias de antese. Vemos que as melhores cultivares para a viabilidade foram os híbridos duplos tendo melhores resultados nos três horários e nos quatro dias analisados do que as demais, sendo que o melhor horário para a maioria das cultivares foram às 10:00 horas diferindo apenas no híbrido triplo tendo seu melhor resultado às 8:00 horas. E o melhor dia de antese para coleta foi no segundo dia diferindo no híbrido triplo com melhor resultado em seu primeiro dia de antese.

No teste em meio sólido obtemos interação significativa nas interações cultivar x horário, cultivar x dia, horário x dia e cultivar x horário x dia. Observando as tabelas 1, 2 e 3, podemos afirmar que a cultivar com melhor resultado foi o híbrido duplo 2 sendo que os resultados de cada cultivar foram influenciados pelo horário e dia, onde o horário com mais pólen viáveis, foi novamente às 10:00 horas e o segundo dia de antese como melhor dia de coleta.

Na análise em tetrazólio os resultados obtidos não diferiram muito dos encontrados tanto em meio sólido quanto meio líquido, sendo que nesta o resultado foi obtido em coleta de cinco dias de antese e que foi confirmado novamente que as cultivares sofrem influência tanto do horário de coleta quanto o a fase de antese, analisando as tabelas 4 e 5, podemos ver que a melhor cultivar novamente foi o híbrido duplo 2, seguido do melhor horário de coleta às 10:00 e melhor dia de antese aqui sendo o terceiro que corresponde ao mesmo dia considerado como segundo nas outras análises.

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 Davide et al. (2009). E que a viabilidade diferem em teste coloração e em teste de germinação, Galleta (1983) comenta que a

viabilidade verificada por coloração normalmente é mais alta do que aquela obtida por germinação, tal afirmação confirmado neste presente trabalho

### Conclusões

- As cultivares são influenciadas pelo horário e pelo dia de antese,;

O melhor horário para a coleta de pólen ser realizado é às 10:00. - O melhor dia da fase de antese, foi o segundo e terceiro dia de antese. - E sendo a cultivar BRS2020 com os melhores resultados tanto nos horários de coleta quanto nos dias de antese..

### Literatura Citada

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.

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, 8:199-206, 2009.

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.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. Revista Científica Symposium, 6:36-41, 2008.

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.

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.

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.

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

ZIMMERMANN, F. J. P. Estatística aplicada à pesquisa agrícola. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arros e Feijão, 2004. 402

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). Fruit breeding. New York: John & Sons, 1995. p.325-440.

**Tabela 1.** Viabilidade do grão de pólen do milho de diferentes cultivares em diferentes horários em meio de cultura líquido e sólido.

Cultivar	Meio líquido			Meio Sólido		
	08:00	10:00	12:00	08:00	10:00	12:00
<b>Variedade(Var.)</b>	7,75 aB	9,75 aA	3,18 cC	6,00 aA	4,25 bB	1,31 bC
<b>H. simples(HS)</b>	7,37 aB	9,18 aA	6,06 bB	4,31 aB	7,31 aA	2,12 bC
<b>H. duplo 1(HD1)</b>	6,81 aB	10,43 aA	6,56 bB	5,81 aA	7,18 aA	2,56 bB
<b>H. duplo 2(HD2)</b>	7,37 aB	9,56 aA	8,12 aB	5,75 aA	7,75 aA	6,75 aA
<b>H. triplo(HT)</b>	5,81 aA	4,18 bB	3,62 cB	5,12 aA	3,43 bA	3,68 bA

1- Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e linha, não diferem entre si no teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 2.** Viabilidade do grão de pólen do milho de diferentes cultivares em diferentes dias em meio de cultura líquido e sólido.

Cultivar	Meio Líquido				Meio Sólido			
	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Var.</b>	5,91 bB	9,00 aA	5,41 bB	7,25 aA	0,83 bC	6,66 aA	2,83 bB	5,08 aA
<b>HS</b>	7,08 bB	9,08 aA	8,25 aA	5,75 bB	2,00 bC	7,50 aA	4,25 aB	4,58 aB
<b>HD1</b>	9,16 aA	8,15 aA	8,58 aA	5,83 bB	3,25 bB	7,16 aA	5,83 aA	4,50 aB
<b>HD2</b>	10,66 aA	10,25 aA	4,75 bC	7,75 aB	9,33 aA	7,83 aA	5,00 aB	4,83 aB
<b>HT</b>	7,41 bA	5,40 bB	2,00 cC	3,25 cC	8,25 aA	3,83 bB	1,08 bC	3,16 aB

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e linha, não diferem entre si no teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 3.** Viabilidade de grão de pólen de milho em três horários de coleta em diferentes dias, em meio de cultura sólido

Horário	Dia			
	1	2	3	4
<b>08:00</b>	5,00 aC	7,70 aA	3,05 bD	5,85 aB
<b>10:00</b>	4,45 aB	7,35 aA	6,25 aA	5,90 aA
<b>12:00</b>	4,75 aA	4,75 bA	2,10 bB	1,15 bB

1- Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e linha, não diferem entre si no teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 4.** Viabilidade do grão de pólen do milho de diferentes cultivares coletado em diferentes horários e dias em meio tetrazólio.

Cultivar	Horario			Dia				
	08:00	10:00	12:00	1	2	3	4	5
<b>Var.</b>	10,20aB	12,40bA	4,80cC	4,08cC	3,83 bC	12,00cB	14,41aA	11,33bB
<b>HS</b>	9,55aB	13,25bA	7,45bC	7,66bC	7,25cC	14,75bA	12,75bB	8,00 cC
<b>HD1</b>	10,85aB	14,25aA	8,05bC	4,75cA	12,75aB	12,66cB	15,75aA	9,33 cC
<b>HD2</b>	9,25aB	14,70aA	15,40aA	10,16aC	9,00bC	17,91aA	14,91aB	13,58aB
<b>HT</b>	2,20bB	7,35cA	4,10cC	6,25cA	6,58cA	7,75dA	1,25cC	0,91dC

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e linha, não diferem entre si no teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 5.** Viabilidade do grão de pólen do milho de três horários de coleta em diferentes dias em meio tetrazólio.

<b>Cultivar</b>	<b>Dia</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>08:00</b>	0,00cD	10,05aB	14,95bA	10,35bB	6,70bC
<b>10:00</b>	15,15aB	5,25cD	17,30aA	14,15aB	10,10aC
<b>12:00</b>	4,60bD	8,35bB	6,80cC	10,95bA	9,10aB

1 Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e linha, não diferem entre si no teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.