

**VIABILIDADE E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS
DE PÓLEN DE MILHO**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA ALVIM

2008

PATRÍCIA DE OLIVEIRA ALVIM

VIABILIDADE E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MILHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Alvim, Patrícia de Oliveira.

Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho / Patrícia de
Oliveira Alvim. Lavras : UFLA, 2008.

54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Renzo Garcia Von Pinho.

Bibliografia.

1. *Zea mays*. 2. Atividade enzimática. 3. Melhoramento genético. 4.
Conservação de recursos genéticos. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 633.153

PATRÍCIA DE OLIVEIRA ALVIM

VIABILIDADE E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MILHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de maio de 2008

Profª. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Prof. Dr. João Cândido de Souza	UFLA
Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho
UFLA (Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

Aos meus pais, Wolney e Denise, pelo amor, carinho e ensinamentos durante toda a minha vida, e aos meus irmãos, Cris e Júnior, pela amizade e companheirismo.

OFEREÇO.

CONFIA AO SENHOR AS TUAS OBRAS E OS SEUS
DESÍGNIOS SERÃO ESTABELECIDOS.

Pv 16:3

A meu namorado, André, familiares e amigos

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua Divina Providência e Luz em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Renzo Garcia Von Pinho, pela orientação e confiança durante a realização do trabalho.

Aos professores João Almir Oliveira, Maria Laene Moreira de Carvalho e Renato Mendes Guimarães, pela amizade e colaboração.

À minha co-orientadora, Profa. Édila Vilela de Resende Von Pinho, pelas valiosas contribuições e pelo exemplo de dedicação.

À professora Geovana, da Citogenética e à estagiária Kátia, pela ajuda.

Aos meus avós, pelos ensinamentos e pelas orações.

À minha sogra, Beth e ao meu sogro, Delly, por todo apoio nesta etapa da minha vida.

Aos funcionários do Setor de Grandes Culturas: João Pila, Manguinho, Alessandro, Júlio, Agnaldo e Marcinho, pela ajuda durante a condução do experimento no campo.

Às funcionárias do Laboratório de Sementes da UFLA, Dona Elza, Elenir, Andréa e Dalva, pela disponibilidade e atenção durante a realização do curso.

Às funcionárias da pós-graduação, Marli e Neuzi, pela ajuda, compreensão e incentivo durante o curso.

Aos “meninos do milho”, pela grande ajuda na condução do experimento no campo.

Aos bolsistas de iniciação científica, Kênia Oliveira, Felipe de Lima Vilela e Rafael Parreira Diniz, pela incansável ajuda.

A minha grande amiga, Kênia, pela amizade sincera, pelos conselhos e por estar sempre comigo quando sempre precisei.

À Priscila, pelo companheirismo e amizade.

Ao meu amigo Zezinho, pelas inúmeras contribuições nas análises estatísticas.

À Marcela, pela grande amizade.

Aos amigos Ana Camila, Clarissa, Cláudio, Dri, Lucrécio, Paulo e Toninho, pela amizade e ajuda, pois, sem vocês, tudo teria sido bem mais difícil!!

A todos os meus familiares que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão do meu curso e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu agradecimento.

MUITO OBRIGADO !

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Estrutura floral do milho.....	2
2.2 Polinização e fertilização.....	4
2.3 Fatores que interferem na conservação de grãos de pólen de milho.....	5
2.4 Metodologia para a avaliação da viabilidade de grãos de pólen.....	8
2.5 Meio de cultura, temperatura e tempo de incubação para a avaliação da germinação de grãos de pólen.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Localização do experimento.....	13
3.2 Ensaios preliminares.....	13
3.2.1 Definição do meio de cultura e da temperatura de incubação para a germinação dos grãos de pólen.....	14
3.2.2 Definição do melhor horário de coleta dos grãos de pólen..	15
3.2.3 Determinação da tolerância dos grãos de pólen à secagem sob diferentes sais.....	15
3.3 Germinação e viabilidade de grãos de pólen de milho armazenados em diferentes ambientes, secados a diferentes teores de água.....	16
3.3.1 Avaliação in vitro e in vivo.....	17
3.4 Procedimento estatístico.....	18
3.5 Análises eletroforéticas de enzimas.....	19

3.5.1 Esterase.....	20
3.5.2 Superóxido dismutase.....	20
3.5.3 Peroxidase.....	20
3.5.4 Malato desidrogenase.....	20
3.5.5 Proteínas resistente ao calor.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Ensaio preliminares.....	21
4.1.1 Definição do meio de cultura e temperatura de incubação para a germinação dos grãos de pólen.....	21
4.1.2 Definição do melhor horário de coleta dos grãos de pólen..	23
4.1.3 Determinação da tolerância dos grãos de pólen à secagem..	24
4.2 Germinação e viabilidade de grãos de pólen de milho armazenados em diferentes ambientes e secados a diferentes teores de água.....	26
4.3 Atividade de enzimas nos grãos de pólen.....	33
5 CONCLUSÕES.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
Anexos.....	47

RESUMO

ALVIM, Patrícia de Oliveira. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho** 2008. 54p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Nos 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 de pesquisas relacionadas aos fatores que interferem na conservação de grãos de pólen. Com este trabalho, objetivou-se avaliar a conservação de grãos de pólen de milho sob diferentes ambientes de armazenamento e teores de água. Os ensaios foram realizados no Laboratório Central de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da UFLA. Foram conduzidos ensaios preliminares, nos quais foram avaliados diferentes meios de cultura para germinação e temperaturas para incubação e diferentes horários de coleta dos grãos de pólen. Avaliou-se também a tolerância do grão de pólen à dessecação. A partir dos resultados dos ensaios preliminares, foi conduzido um experimento, no qual os grãos de pólen, com teores de água de 51,7% e 29,4%, foram armazenados em deep freezer (-86°C), geladeira (4°C) e em nitrogênio líquido (-196°C). Após o armazenamento, a germinação e a viabilidade dos grãos de pólen foram avaliadas *in vitro* em meio de cultura, pelo teste do corante e *in vivo*, por meio de autofecundações em plantas da linhagem Le-57 e do híbrido GNZ 2004. Avaliou-se a atividade enzimática dos grãos de pólen armazenados nas diferentes condições por meio das enzimas esterase, malato desidrogenase, peroxidase, superóxido dismutase e proteínas resistentes ao calor. 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 sódio a 25°C e quando a coleta foi realizada às 9 horas. A conservação de grãos de pólen de milho varia com os ambientes de armazenamento e com os teores de água e torna-se reduzida com o armazenamento. O poder germinativo dos grãos de pólen reduz-se com a dessecação. Diferentes padrões protéicos foram observados em grãos de pólen armazenados sob diferentes condições.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho - UFLA (Orientador), Profa. Dra. Édila Vilela de Rezende Von Pinho – UFLA.

ABSTRACT

ALVIM, Patrícia de Oliveira. **Viability and conservation of corn pollen grains.** 2008. 54p. Dissertation (Master's degree in Crop Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Gerais*.

In corn breeding programs factors related to the duration of the stigma receptivity, pollen grain longevity in the plant, differences in flowering periods among plants and conservation of genetic resources are aspects which reinforce the importance of researches related to factors interfering in corn pollen grains conservation. In this work, it was aimed to evaluate the conservation of corn pollen grains in different environments and water contents. The experiments were performed at the Agricultural Department of the Federal University of Lavras in the Laboratories of Seed Analysis and Molecular Biology and in an experimental field. In the pre-tests, different culture media for germination and temperatures for incubation and different times of pollen grain collection were evaluated. The tolerance of pollen grain to dissection was also determined. Following in a second experiment, pollen grains with water contents of 51.7% and 29.4% were stored in a deep freezer (-86°C), refrigerator (4°C) and in liquid nitrogen (-196°C). After storage, germination and viability of the pollen grains were evaluated *in vitro* in a culture medium, *in vivo* by the staining test and through self-fecundation in plants of Le-57 line and of GNZ 2004 hybrid. The enzyme activity of pollen grains stored under the different conditions was evaluated using the enzymes esterase, malate dehydrogenase, peroxidase, superoxide dismutase and was also evaluate the expression of heat resistant proteins. Higher values of pollen grains germination were found in culture medium containing 10% of sucrose, 0.03 of Boric Acid and 0.15 of Sodium Chlorite at 25°C and when the collection of the pollen grains was performed at 9 a.m. The conservation of the pollen grains varied with storage environment and with the water content and decreasing during storage. The germination of the pollen grains reduced with desiccation. Different patterns of enzymes and protein were observed in pollen grains under storage at different conditions.

* Guidance Committee: Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho- UFLA (Major Professor), Prof^a. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Há poucas informações sobre a viabilidade e o armazenamento de grãos de pólen de milho em áreas tropicais. Essas informações são importantes, principalmente, para programas de melhoramento, nos quais são realizados vários tipos de polinização controlada e também na preservação de recursos genéticos de milho.

Nesses programas são feitos vários cruzamentos entre diferentes genótipos para testar a capacidade combinatória das linhagens. É comum o cruzamento entre genótipos de ciclos distintos, não havendo o sincronismo no florescimento, o que inviabiliza a produção de sementes. Neste caso, o armazenamento do grão de pólen sob condições artificiais, visando preservar a viabilidade dos gametas masculinos por diferentes períodos, é uma alternativa muito útil.

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 em condições controladas (Ganeshan, 1986).

Outra ênfase da conservação de pólen tem sido na coleção de germoplasma, com o objetivo de preservar a diversidade genética (Connor & Towill, 1993).

Sabe-se que fatores importantes intrínsecos ao próprio pólen, relacionados a seu estado de maturação fisiológica, origem, características genéticas, nutrição da planta, assim como os extrínsecos, como composição do meio de cultura, densidade de pólen no meio, temperatura de incubação, período de coleta e agentes ambientais, como temperatura e umidade, entre outros, podem influenciar a germinação e a viabilidade do grão de pólen (Stanley &

Linskens, 1974). Outro fator a ser considerado é a avaliação adequada da viabilidade e da germinação do grão de pólen, para que se tenha, com segurança, a sua qualidade preservada. A viabilidade de grãos de pólen pode ser avaliada de várias maneiras, como coloração com corantes químicos, geminação *in vitro* e fertilização a campo, o que permite a análise da capacidade de emissão do tubo polínico e uma correlação desta taxa com a viabilidade do pólen.

Diante do exposto, com a realização deste trabalho, objetivou-se avaliar a conservação de grãos de pólen de milho sob diferentes ambientes de armazenamento e teores de água.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura floral do milho

A inflorescência masculina ou o pendão do milho consiste em um eixo central, denominado ráquis, do qual surgem ramificações laterais secundárias e terciárias. Ao longo das ramificações estão localizadas as espiguetas, que são dispostas aos pares, arranjadas alternadamente, sendo uma sésil e outra pedicelada (Goodman & Smith, 1987).

As espiguetas têm um par de brácteas protetoras, em forma de bainha, envolvendo duas pequenas flores. Cada flor consiste de uma lema e pálea, envolvendo três estames, duas lodículas e um pistilo abortado.

O estame que originará o grão de pólen diferencia-se a partir de um lóbulo no ponto de crescimento central da flor. A sua extremidade superior originará a antera e a inferior, o filamento. Nas anteras, a meiose irá ocorrer em um grupo de células originadas por mitose e que se denominam de microsporócitos. Cada microsporócito, após a segunda fase meiótica, dá origem a quatro micrósporos, os quais, após maturação, produzem o que se denomina de

grão de pólen (Goodman & Smith, 1987).

O florescimento varia conforme a cultivar e, nesse momento, as anteras abrem-se próximo às extremidades, formando poros, por meio dos quais os grãos de pólen são liberados. Até pouco tempo antes de sua liberação, o grão de pólen permanece uninucleado. É neste momento que o seu núcleo do sofre uma endomitose, formando o núcleo vegetativo e o núcleo generativo. Este último se divide novamente em outros dois núcleos generativos ou reprodutivos. Assim, o grão de pólen será constituído por três núcleos, dois generativos e um vegetativo.

Cada uma das anteras, quando madura, contém, em seu interior, sacos polínicos, nos quais estão os grãos de pólen, que, estima-se, sejam da ordem de 2.500 por antera. Pouco pólen é liberado até que as anteras sejam movimentadas pelo vento, ou seja, no geral, o pólen é retido até que haja vento suficiente para transportá-lo para outras plantas. Essa tendência assegura alta porcentagem de polinização cruzada sob condições de campo (Ramalho et al., 2000).

Um pendão inicia a liberação de pólen no eixo principal de cima para baixo. As ramificações começam a liberação logo após o eixo principal e esse processo pode durar mais de uma semana. Considerando cada espiguetta, a flor superior inicia a liberação de pólen aproximadamente um a três dias antes da inferior. A deiscência e a dispersão do pólen, usualmente, ocorrem dois a três dias antes da emergência dos estilos-estigmas. A liberação pode começar desde o nascer do sol até o meio dia, dependendo da temperatura e umidade e, usualmente, se completa com quatro a cinco horas (Goodman & Smith, 1987).

Somente os grãos de pólen que são interceptados pelos estilos-estigma frescos podem germinar. Geralmente, muitos desses grãos germinam no mesmo cabelo, mas somente um irá atingir a micrópila do óvulo para produzir a semente.

2.2 Polinização e fertilização

Com os grãos de pólen liberados, a germinação ocorre rapidamente, quando em contato com os pêlos viscosos do estilo-estigma. O tempo necessário, desde a polinização até a fertilização, depende da temperatura, da umidade e da constituição genética da planta (Goodman & Smith, 1987).

A germinação do grão de pólen consiste na emissão do tubo polínico. Numa das extremidades fica uma massa viscosa ou citoplasma, com três núcleos. Um desses, chamado vegetativo, é responsável pelo funcionamento dessa ponta apical. Os outros dois núcleos são generativos, que somente entram em ação no processo de fertilização (Chang & Neuffer, 1992).

Muitos grãos de pólen de milho caem e germinam em um mesmo cabelo e competem entre si para atingir a fertilização. Os tubos polínicos penetram entre as células dos pêlos e, quando atingem o interior do estilo-estigma, os acompanham até as células da bainha, que circundam o tecido vascular para a base do cabelo. Neste ponto, o tecido de condução deixa o estilo-estigma e passa para a cavidade do ovário (Ramalho et al., 2000).

Os tubos polínicos germinam e crescem, inicialmente, com base nas substâncias de reserva contidas no próprio grão de pólen, ficando depois dependente, para a sua própria nutrição, do estilo-estigma, no qual eles se desenvolvem. A direção do seu crescimento é orientada por um mecanismo quimiotrópico e, especialmente quando ele passa do estilo-estigma para a cavidade do ovário, e são substâncias produzidas por células de cada ovário que atraem o tubo polínico para o óvulo. Existem diferenças da taxa de crescimento desses tubos durante todo o seu percurso, as quais são controladas por genes denominados genes gametofíticos (Brieger & Blumenschein, 1966).

Quando a ponta do tubo atinge a micrópila, se desenvolve entre as células do tecido nucelar até atingir o saco embrionário. Na entrada do saco

embrionário, a extremidade se rompe, liberando os dois núcleos generativos. Um dos dois núcleos se funde com a oosfera formando o zigoto, enquanto o outro núcleo se funde com os dois núcleos polares, estabelecendo o núcleo primário do endosperma.

2.3 Fatores que interferem na conservação de grãos de pólen de milho

Sabe-se que o armazenamento, como meio de manutenção da viabilidade do pólen, é uma ferramenta valiosa empregada por melhoristas e geneticistas, justificando-se em programas de hibridação quando há defasagem no florescimento entre as espécies de interesse ou quando os mesmos se encontram em regiões distintas.

O armazenamento pode ser classificado em dois tipos: a curto e a longo prazo. Segundo Sousa (1988), normalmente, procede-se o armazenamento a curto prazo visando estudos de genética e de melhoramento, e, a longo prazo, para a conservação genética e é comum ocorrerem alterações que podem levar, após muitos anos, a populações geneticamente diferentes das originais.

Dentre os fatores que mais influenciam na longevidade do pólen durante o armazenamento, destacam-se a umidade relativa, a temperatura de armazenamento e as embalagens de armazenamento. Essas variáveis devem ser definidas para possibilitar a manutenção da viabilidade por um período maior possível (Sousa, 1988). A maioria dos métodos empregados envolve a redução do teor de água e a manutenção do pólen à baixa temperatura, de modo que as oscilações sejam evitadas.

Os fatores genéticos e fisiológicos também podem afetar a longevidade do pólen. Muitos autores relatam que grãos de pólen binucleados possuem maior viabilidade, comparados com os trinucleados, que se classificam em tolerantes ou sensíveis à desidratação, respectivamente. Dentre as possíveis explicações para o fato, Sousa (1988) cita que a segunda divisão meiótica priva o grão

de pólen de reservas suficientes para propiciar uma boa longevidade e germinação. Kirby & Smith (1974) chegaram à conclusão de que há maior quantidade de compostos de superfície na parede dos polens binucleados. O pólen das gramíneas é trinuclear, incluindo o milho, dificultando, assim, a armazenagem de gametas masculinos.

Podem ocorrer também alterações fisiológicas durante o armazenamento do pólen, o que contribui para um decréscimo na viabilidade.

O teor de água do pólen é um dos fatores mais importantes que envolvem o armazenamento e, normalmente, encontra-se negativamente relacionado à longevidade (Sousa, 1988). Mas, o teor de água ideal varia para cada caso empregado. Sousa (1988) afirma que o cuidado para a secagem de pólen trinucleado deve ser muito grande, pois os componentes nucleares das células masculinas podem ser danificados, provocando redução da viabilidade.

Vários métodos são empregados para conseguir a redução do teor de água dos grãos de pólen, como a manipulação por meio de sais saturados, como LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NH₄NO₃, KCl, CuSO₄.5H₂O, P₂O₅, ZnCl₂, Ca(NO₃)₂, NaNO₂, sílica gel, dessecação a vácuo e vapor de nitrogênio líquido (Connor & Towil, 1993; Hong et al., 1999). O processo de desidratação/hidratação está no equilíbrio entre a umidade relativa do ar e a umidade contida no grão de pólen (Connor & Towil, 1993).

Como já mencionado, 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.

O emprego de baixas temperaturas, normalmente, encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Pode-se conseguir redução de temperatura por meio de refrigeradores e freezer, que são de fácil acesso, entretanto, outros métodos mais sofisticados, como gases liquefeitos, também podem ser empregados.

Barnabás et al. (1988) verificaram que grãos de pólen de milho, com teor de água entre 15% a 20%, armazenados à baixa temperatura, apresentaram viabilidade na germinação *in vitro* de 50% e fertilidade *in vivo* de 30%, após três anos de conservação. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Roy et al. (1995) que, trabalhando com controle de polinização em relação ao rendimento de sementes e efeito da temperatura na viabilidade do pólen do milho, verificaram que essa viabilidade diminuiu significativamente com o aumento da temperatura de armazenamento.

O pólen de cebola cultivar Petrolini foi armazenado, pelo período de um ano, em nitrogênio líquido e no interior de um dessecador com ácido sulfúrico, mantido em congelador -18°C (Gomes et al., 2000). Os autores constataram que a melhor condição para o armazenamento foi em nitrogênio líquido.

Gomes et al. (2003) armazenaram grãos de pólen de cebola, em diferentes condições, por dois anos. O pólen conservado por um ano, em nitrogênio líquido, foi, então, transferido para um refrigerador, a 4°C, registrando-se a percentagem de germinação após dez, quinze, vinte e trinta dias de permanência neste. O armazenamento em nitrogênio líquido foi o melhor ambiente para a conservação dos grãos de pólen, durante dois anos. As amostras armazenadas por um ano, em nitrogênio líquido, que foram transferidas para o refrigerador, conservaram-se viáveis por até dez dias.

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. Estes autores destacaram a sensibilidade que as anteras apresentam ao boro, cuja ausência pode levar alguns tecidos ao colapso e 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. Os autores salientam, ainda, que pode ocorrer a

produção de pólen anormal, mesmo quando a parede da antera continuou crescendo e o saco embrionário parece inafetado. Agarwala et al. (1979) comprovaram que plantas de milho com deficiência de molibidênio tiveram redução na viabilidade de grãos de pólen.

2.4 Metodologia para avaliação da viabilidade de grãos de pólen

Existem várias técnicas para estimar a viabilidade do grão de pólen, como o teste com corantes químicos, a germinação *in vitro* e a *in vivo* (Pio, 2004). A coloração é um procedimento bastante simples, barato e que fornece resultados rapidamente, tornando-se bastante atrativa para a palinologia, que é a ciência que estuda os grãos de pólen. Considerando que existe uma correlação entre a viabilidade e a coloração, a estimativa é dada pela contagem dos polens não abortados e abortados que se mostram corados e não corados, respectivamente. Vários são os corantes empregados com essa finalidade. Dentre eles, destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio, cloreto de trifeniltetrazólio (TCC), tetrazólio vermelho, (Stanley & Linskens, 1974) e verde malaquita com fucsina ácida (Alexander, 1969 e 1980).

Na literatura, não há descrição de um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico. A maioria dos trabalhos relata o uso dos corantes nucleares, sobretudo carmim acético, para vários grupos de plantas. Entretanto, Andrés et al. (1999) destacaram que o carmim acético foi deficiente para constatar a viabilidade do pólen *in vitro*, comparado à germinação *in vitro*, em que se avaliou o crescimento do tubo polínico. Neste caso, o carmim acético superestimou os dados.

A utilização desses corantes foi questionada por Alexander (1969), pelo fato de os grãos de pólen inviáveis não serem corados. Segundo o autor, esse é um fator limitante no estudo de polens com paredes espessas, mucilaginosas e com a presença de espículas, pois elas dificultam a penetração do corante e,

conseqüentemente, a coloração. Nessa condição, polens viáveis podem não apresentar coloração e ser equivocadamente classificados como abortados. Por isso, o autor propôs a utilização de um corante diferencial, à base de verde malaquita e fucsina ácida, em que o pólen viável cora-se de roxo e o inviável de verde. A coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não é totalmente confiável, pois, conforme já relatado, pode fornecer uma informação equivocada da viabilidade. Pode-se, então, optar simultaneamente pela observação da capacidade germinativa dos grãos de pólen, em razão de ser um caráter que se correlaciona diretamente com a habilidade para fertilização.

Estudos com 14 acessos de milho, capim-elefante e híbridos, realizados por Pedrozo et al. (2001), comparando a eficiência dos corantes carmin propiônico,orceína acética e corante Alexander, demonstraram que o mais indicado para determinar a viabilidade de pólen é o corante Alexander.

Nos testes de germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura que, geralmente, contém sacarose e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico (Sousa, 1988). São considerados germinados os grãos que apresentam tubos polínicos que ultrapassam o comprimento do diâmetro do próprio grão de pólen.

Existem também os testes de germinação *in vivo*, nos quais se deposita o grão de pólen no estigma receptivo. Essa metodologia apresenta algumas desvantagens, do ponto de vista prático, que podem refletir na avaliação da viabilidade, tais como a dificuldade de penetração do tubo polínico na superfície cuticular, a presença de água no estigma, podendo levar à ruptura do pólen, a não receptividade do estigma ou a incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; a aplicação de alta concentração de pólen que irá inibir a penetração do tubo polínico no estilete e a queda acentuada na temperatura, podendo modificar drasticamente a germinação do pólen *in vivo* (Stanley & Linskens, 1974).

Outra técnica empregada para a avaliação da qualidade grãos de pólen de plantas de milho produzidas é a determinação da atividade de enzimas hidrolíticas, como a amilase e a invertase. Outras enzimas, como esterase, peroxidase, malato desidrogenase, fosfatase ácida, superóxido dismutase, catalase e glutamato desidrogenase, foram utilizadas em grãos de pólen para a separação de espécies pertencentes ao gênero *Zea*, evidenciando a similaridade entre o milho e o teosinte (Katiyar & Sachan, 1992).

Sementes e organismos que toleram a desidratação apresentam algumas proteínas, cujas funções ainda não estão bem esclarecidas. Mas, sua estabilidade, sua alta afinidade com moléculas de água e abundância em organismos que toleram a desidratação sugerem seu importante papel em aquisição de tolerância à dessecação (Blackman et al., 1991).

Estas proteínas, primeiramente descobertas em embriões de algodão, nomeadas proteínas *lea*, moduladas por ácido abscísico, acumulam-se em embriões de sementes de milho e cevada, durante os estádios mais tardios do desenvolvimento, em fase correspondente à aquisição de tolerância à dessecação (Bostock & Quatrano, citados por Leprince et al., 1993) e a sua expressão cessa rapidamente após germinação (Blackman et al., 1991; Blackman et al., 1992). Segundo Thomann et al. (1992) e Rosa (2004), proteínas *lea* também se acumulam em embriões de sementes de milho durante a lenta secagem, em fase correspondente à aquisição de tolerância à dessecação. Workers et al. (1998) observaram que embriões imaturos de milho, os quais adquirem tolerância à dessecação quando submetidos à lenta secagem, apresentam padrão de proteínas semelhante ao de proteínas *lea*, presentes em sementes maduras e tolerantes à dessecação.

2.5 Meio de cultura, temperatura e tempo de incubação para avaliação da germinação de grãos de pólen

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar, qualitativa e quantitativamente, os componentes necessários para a melhor composição do meio de cultura para a germinação dos grãos de pólen. O meio de cultura deve ser constituído, basicamente, por carboidratos e elementos estimulantes, como ácido bórico, ácido cítrico, nitrato de cálcio e reguladores de crescimento, dentre outros (Sousa, 1988).

A sacarose empregada no meio de cultura tem a finalidade de 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).

A adição de boro é importante e suas respostas são variáveis, conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. Já a adição de cálcio ao meio de cultura propicia características fisiológicas, como tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade do tubo polínico e crescimento em forma linear, suave e aparência rígida (Bhojwani & Bhatnagar, 1974). Pio et al. (2004) concluíram que a melhor germinação de grãos de pólen de citros foi obtida com 800 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio.

Outros fatores de grande importância no controle das condições ambientais e que influenciam significativamente a fertilidade dos grãos de pólen são a temperatura e o tempo (período de incubação) necessários para a germinação do pólen.

Na maioria das espécies, o tempo de incubação varia de 1 a 3 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).

Entretanto, períodos de incubação maiores, desde 4 até 13 horas de incubação, foram observados para o pólen de araçazeiro (Raseira & Raseira, 1996). Avaliando o pólen de cerejeira-do-rio-grande, Frazon & Raseira (2006) observaram que três horas de incubação foram suficientes para a germinação *in vitro*. Estas referências confirmam que o tempo de incubação necessário para iniciar a germinação *in vitro* varia de acordo com a espécie e, até mesmo, entre cultivares da mesma espécie. Thompson & Batjer (1950) utilizaram 24°C para pólen de ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira. Loupassaki et al. (1997) afirmam que 25°C é a ideal para germinação de pólen de abacateiro e Nunes et al. (2001) utilizaram esta mesma temperatura para macieira.

Em milho, temperatura de 24°C tem proporcionado boa germinação e temperatura de 0°C a inibe (Broglia & Brunori, 1994). Já Ferreira et al. (2007) utilizaram a temperatura de 27°C para a germinação.

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).

São poucos os trabalhos relacionando secagem e armazenamento de grãos de pólen de milho, o que ressalta a importância de trabalhos desta natureza para avaliar a influência de diversos fatores na sua longevidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do experimento

Este trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, localizado na região Sul de Minas Gerais, a 21°14' de latitude S e 40°17' de longitude W e tipo de clima Cwa, segundo a classificação de Kopen.

3.2 Ensaios preliminares

Inicialmente, foram realizadas coletas de pendões de plantas de milho, os quais foram secados em BOD, a 25°C, para a retirada de grãos de pólen. Como eles não se desprenderam das anteras nesta tentativa, foi necessária a coleta no campo, em sacos de papel. Para tal procedimento, os pendões foram agitados dentro destes sacos, o que permitiu a soltura dos grãos de pólen das anteras.

Foram realizados alguns ensaios preliminares para definir algumas condições necessárias para a melhor condução do experimento principal. O primeiro ensaio preliminar definiu o melhor meio de cultura e a temperatura de incubação para a avaliação da germinação dos grãos de pólen. O segundo ensaio preliminar foi realizado para estabelecer o melhor horário de coleta e o terceiro e último ensaio preliminar, para determinar a tolerância dos grãos de pólen à secagem em dois saís.

Os grãos de pólen utilizados para a realização dos ensaios preliminares foram coletados, pela manhã, em uma lavoura conduzida com o híbrido GNZ 2004, da empresa Geneze Sementes Ltda., em área do Departamento de Agricultura da UFLA.

3.2.1 Definição do meio de cultura e da temperatura de incubação para a germinação dos grãos de pólen

Foram avaliados seis meios de cultura, nas temperaturas de 25° e 30°C (Tabela 1). Os elementos componentes dos meios foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em forno microondas até a dissolução completa dos componentes. Para o aquecimento dos meios, foi utilizado um aparelho microondas, na potência 10, marca Brastemp, modelo BPM 40 ESAAB, série 4 AGO 83154. Cerca de 20 mL 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 25°C e de 30°C. Os grãos de pólen foram coletados às nove horas da manhã e uma amostra foi colocada nas placas de Petri. Depois de 2 horas de incubação, foi realizada a contagem de grãos de pólen germinados, com auxílio de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10 vezes, avaliando quatro campos de visão, correspondendo a quatro repetições. Foram considerados germinados os grãos que apresentaram tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen.

TABELA1. Composição dos meios de cultura utilizados para a avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen de milho. UFLA, Lavras, MG 2008.

Meio (n°)	Sacarose (%)	H ₃ BO ₃ (%)	Na Cl (%)	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
M6	30	-	-	0,8

3.2.2 Definição do melhor horário de coleta dos grãos de pólen

Foram realizadas coletas de grãos de pólen às 9, às 14 e às 16 horas. Amostras foram incubadas no meio de cultura M2 (Tabela 1), a 25°C, conforme resultados obtidos no primeiro ensaio preliminar e conforme metodologia descrita anteriormente. Após duas horas em estufa tipo BOD, avaliou-se o número de grãos de pólen germinados, conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.3 Determinação da tolerância dos grãos de pólen à secagem sob diferentes sais

Para testar a tolerância à dessecação, os grãos de pólen foram submetidos à secagem, por meio do controle artificial da umidade do ar no interior de caixas de acrílico tipo gerbox, sendo estas mantidas sob temperatura de 25°C. Foram avaliados dois sais para a realização dessas secagens, o cloreto de sódio e o cloreto de lítio.

No fundo de cada caixa de acrílico, foi colocada uma solução higroscópica do sal dissolvido em água destilada, até a formação de uma pasta. Os grãos de pólen foram colocados sobre o fundo telado, dentro das caixas tipo gerbox, sobre papel germitest, para evitar o contato com a solução salina. Foram, então, mantidos por períodos correspondentes a quatro, seis, oito e dez horas. Foi utilizado também um tratamento testemunha, correspondente aos grãos de pólen que não foram submetidos à secagem. No momento da coleta dos grãos de pólen e após cada tempo de secagem, foi avaliado o teor de água destes, por meio do teste da estufa (Brasil, 1992). Após cada tempo de secagem, a viabilidade dos grãos de pólen foi avaliada por meio do teste de germinação e do teste do corante.

O teste de germinação foi realizado como já descrito, no meio de cultura M2, à temperatura de 25°C e incubados em BOD, por duas horas.

Posteriormente, avaliou-se a germinação em microscópio óptico.

Para o teste do corante, os grãos de pólen foram submetidos a lâminas com corante Alexander, cuja composição é: 20 mL de álcool etílico absoluto, 20 mg de verde malaquita, 50 mL de água destilada, 40 mL de glicerol, 100 mg de fucsina ácida, 5 g de fenol e 2 mL de ácido láctico. Sobre cada lâmina foi colocada uma lamínula, as quais foram armazenadas, por 24 horas, em geladeira, a 4°C, em câmara úmida. Após 24 horas de armazenamento, foram feitas as avaliações, em microscópio de luz, de quatro campos de visão, correspondendo a quatro repetições. Os polens corados de roxo foram considerados viáveis e os corados de verde, inviáveis.

3.3 Germinação e viabilidade de grãos de pólen de milho armazenados em diferentes ambientes e secados a diferentes teores de água

Para a coleta de grãos de pólen, foi implantado um campo de milho em área do Departamento de Agricultura, com as cultivares correspondendo à linhagem Le-57 e o híbrido simples GNZ 2004. O plantio foi feito 15 dias antes da instalação do campo, para as avaliações *in vivo*, ou seja, no dia 8/11/2006. Este campo foi composto de 28 parcelas, para o híbrido simples GNZ 2004 e de 40 parcelas da linhagem Le-57, sendo ambos com duas linhas de seis metros de comprimento.

Para a análise *in vivo*, no dia 23/11/2006, foram instalados dois campos com a linhagem Le-57 e o híbrido simples GNZ-2004. Esses campos foram compostos por 28 parcelas de duas linhas de seis metros para cada genótipo com quatro repetições. Antes da semeadura, as sementes foram umedecidas com água, na quantidade de 1% do peso e tratadas com os fungicidas Captan e Tecto 600®, na dosagem 100g/100 kg e 40g/100kg de sementes e com o inseticida Futur, na dosagem de 2L/100kg de sementes.

A coleta dos grãos de pólen do híbrido e da linhagem foi realizada aos 56 dias após a semeadura, às nove horas da manhã, com temperatura média do ar de 23,2°C e umidade relativa de 77,5%.

3.3.1 Avaliação *in vivo* e *in vitro*

Uma parte dos grãos de pólen foi secada utilizando NaCl, por 4 horas e a outra parte não foi submetida à secagem. Foi utilizado o método da estufa para determinação do teor de água dos grãos pólen, segundo Brasil (1992). No momento da coleta, os grãos de pólen que não foram submetidos à secagem estavam com 51,7% de teor de água e os que foram secados por quatro horas continham 29,4% do teor de água. Em seguida, os grãos de pólen com 51,7% e com 29,4% de teor de água foram colocados em tubos tipo Eppendorf de 5 ml e armazenados em geladeira (4°C), em deep freezer (-86°C) e em nitrogênio líquido (-196°C). Para os grãos de pólen do híbrido, o armazenamento foi de 14 dias e, para a linhagem, de 16 dias.

Após 14 dias de armazenamento, foi realizada a avaliação dos grãos de pólen, por meio do teste *in vivo*, no híbrido e após 16 dias, na linhagem. Para isso, Eppendorfs com 5 ml de grãos de pólen armazenados foram levados para o campo e realizadas as autofecundações, em 10 plantas por parcela, das respectivas cultivares, quando as mesmas apresentavam estilo-estigma receptivos (3 a 5 cm). As plantas que receberam os grãos de pólen armazenados tiveram seus estilos-estigmas protegidos anteriormente com sacos plásticos. Para a realização da autofecundação, os grãos de pólen armazenados foram levados para o campo em Eppendorf de 5 ml, dentro de caixas de isopor com gelo, para preservação da temperatura do material.

No mesmo momento em que foi feita a avaliação *in vivo* dos grãos de pólen de milho por meio de autofecundações de plantas no campo,

foram realizados o teste de germinação e o teste do corante. O teste de germinação foi realizado da mesma maneira como descrito anteriormente, em meio de cultura M2 e na temperatura de 25°C, sendo incubados em BOD por duas horas. A germinação foi avaliada com auxílio do microscópio óptico. No teste do corante, os grãos de pólen foram submetidos a lâminas com corante Alexander e, sobre cada lâmina, foi colocada uma lamínula, que foram armazenadas, por 24 horas, em geladeira, a 4°C, em câmara úmida. Após 24 horas de armazenamento em geladeira, foram feitas as avaliações em microscópio de luz, avaliando-se quatro campos de visão, correspondendo a quatro repetições. Os polens corados de roxo foram considerados viáveis e os corados de verde, inviáveis.

A colheita das espigas autofecundadas foi realizada no dia 3/04/2007, ou seja, 130 dias após o plantio. Após a colheita, foi avaliada a viabilidade dos grãos de pólen armazenados sob diferentes condições por meio da contagem do número de sementes formadas por espiga.

3.4 Procedimento estatístico

No primeiro ensaio preliminar que definiu o melhor meio de cultura e a temperatura para incubação dos grãos de pólen, foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 6 (meios de cultura) x 2 (temperaturas), com quatro repetições. No segundo ensaio preliminar, que definiu o melhor horário de coleta utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos (horários de coleta) e sete repetições. No terceiro ensaio preliminar, em que foi determinada a tolerância dos grãos de pólen à dessecação tanto para a germinação quanto para a viabilidade, foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, com nove tratamentos (teores de água e sais) e três repetições.

Todas as médias foram agrupadas, pelo teste de Skott Knot, a 5% de probabilidade.

Para a avaliação da germinação e da viabilidade dos grãos de pólen, foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 3 (ambientes de armazenamento) x 2 (teores de água de grãos de pólen), mais um tratamento adicional (testemunha) caracterizado por grãos de pólen que não foram submetidos à secagem e ao armazenamento, com quatro repetições.

Para a avaliação *in vivo*, foi seguido o delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 (ambientes de armazenamento) x 2 (teores de água de grãos de pólen), mais um tratamento adicional (testemunha) caracterizado por grãos de pólen que não foram submetidos à secagem e ao armazenamento, com quatro repetições. O tratamento adicional (testemunha) foi comparado com os outros tratamentos pela utilização de contrastes caracterizados da seguinte forma: adicional versus teor de água de 51,7%; adicional versus teor de água de 29,4%; adicional versus armazenamento em nitrogênio líquido; adicional versus armazenamento em geladeira e adicional versus armazenamento em deep freezer.

3.5 Análises eletroforéticas de enzimas

Para as análises eletroforéticas, foram utilizadas duas amostras de pólen, considerando todos os tratamentos avaliados. Foram retiradas subamostras de 100 mg, às quais foi adicionado o tampão de extração (Tris HCl 0,2 M pH 8), na quantidade de 2,5 vezes o peso de cada amostra e 0,1% de β -mercaptoetanol. O material foi colocado em geladeira “over night” e, depois, foi centrifugado a 14.000 rpm, por 30 minutos, a 4°C. Foram aplicados 40-60 μ L do sobrenadante no gel. Para a revelação das enzimas, foram seguidas as metodologias propostas por Alfenas (1998), descritas a seguir.

3.5.1 Esterase

Para a revelação da enzima, foram preparadas duas soluções. A solução 1 foi composta de 50 mg de α -naftil acetato e 50 mg de β -naftil acetato, dissolvidos em 10 mL de acetona 50%. A solução 2 foi composta de 100 mL de Tris HCl 0,05 M pH 7,1 e 100 mg de Fast Blue RR. A solução foi filtrada e o seu volume foi completado para 100 mL, com 3mL da solução 1. O gel foi, então, mergulhado na solução reveladora e mantido a 37°C até o aparecimento das bandas.

3.5.2 Superóxido dismutase (SOD)

Foram dissolvidos 4 mg de riboflavina e 300 mg de EDTA em solução tampão. Em seguida, foi adicionado MTT para a revelação. O gel foi incubado a 30°-37°C, exposto a luz, até as bandas acromáticas aparecerem. A solução foi descartada e o gel fixado em solução aquosa de glicerol a 10%.

3.5.3 Peroxidase

Em 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1M com pH 4,5 (q.s.q.), foram acrescentados 32 mg de O-dianisidina bi-HCl e 2 mL de H₂O₂ (3%). O gel foi incubado a 30°-37°C, até as bandas aparecerem. A solução foi descartada e o gel fixado em solução aquosa de glicerol a 10%.

3.5.4 Malato desidrogenase (MDH)

Foram dissolvidos 0,015g de NAD em 2,8 mL de DL malato 10% (pH 8,5) e adicionados 67,2 mL de MTT e 2 mL de PMS 1%. O gel foi incubado a 30°-37°C, até as bandas aparecerem.

3.5.5 Proteínas resistentes ao calor

As amostras de grãos de pólen de cada tratamento, tanto do híbrido quanto da linhagem, foram retiradas do deep freezer, tendo sido separados 200 mg de cada material em microtubos, para aplicação de 300 µl de tampão de extração (50mM tris-HCl-7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) e Antipain, na proporção de 5 mg para cada ml de tampão. Em seguida, os microtubos foram agitados em Vortex e levados para centrifuga, a 14.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi, então, incubado em banho-maria, a 85°C, por 15 minutos e novamente centrifugado, por 30 minutos, como acima referido. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação, os microtubos contendo 45 µl do extrato de proteína + 23 µl do tampão da amostra (5 ml de glicerol, 2,5 ml de solução tampão do gel concentrador, 2,5 mg de azul de bromofenol, completando o volume para 25 ml de água destilada) foram levados ao banho-maria, em ebulição, por 5 minutos. Foram aplicados 40 µl de cada amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5 % (gel separador) e 6% (gel concentrador).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio preliminares

4.1.1 Definição do meio de cultura e da temperatura de incubação para germinação dos grãos de pólen

Pela análise de variância dos dados (Tabela 1A), observa-se diferença significativa nos valores de germinação dos grãos de pólen submetidos aos diferentes meios de cultura e temperatura, e também para a interação meios de cultura e temperaturas. À temperatura de 25°C, maiores valores de germinação foram encontrados quando foi utilizado o meio M2, seguido pelo M1

e o M3. Nos meios de cultura M4, M5 e M6, a germinação dos grãos de pólen foi nula, o que também ocorreu à temperatura de 30°C (Tabela 2). Sob esta temperatura foi observado maior valor de germinação no M1, seguido pelo M2 e o M3.

Nos meios M4, M5 e M6 não foi observada diferença significativa na percentagem de germinação, nas duas temperaturas. Já para os meios M2 e M3, a maior germinação foi observada à temperatura de 25°C.

Tabela 2. Resultados médios de germinação (%) de grãos de pólen em diferentes meios de cultura, nas temperaturas de 25° e 30°C. UFLA, Lavras MG, 2008

Meios de cultura	25°C	30°C
M1	38,96 Ab	40,06 Aa
M2	55,85 Aa	21,98 Bb
M3	7,87 Ac	3,43 Bc
M4	0,0 Ad	0,0 Ad
M5	0,0 Ad	0,0 Ad
M6	0,0 Ad	0,0 Ad

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

A sacarose empregada em todos os meios de cultura tem a finalidade de 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). Almeida et al. (2002) demonstraram que os meios contendo teor de sacarose entre 10% e 20% proporcionaram maior germinação, sendo a concentração em torno de 10% a mais indicada para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de milho. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho. Nota-se que, nos meios M₁ e M₂, em que foram utilizados 10%

e 20% de sacarose, foram observadas as maiores médias de germinação. A menor germinação do meio M3 deve ser resultado da adição de ágar, que pode servir como barreira física, impedindo a germinação do tubo polínico.

Já o boro tem se mostrado um elemento que maximiza a germinação *in vitro*. Segundo Pfahler (1968), a adição de boro é importante e suas respostas são variáveis conforme a espécie.

Pio et al. (2004) encontraram, em citros, maior quantidade de tubos polínicos soltos da estrutura do pólen na ausência de boro, para todas as variedades testadas. O cálcio, assim como o boro, também foi indicado como promotor na germinação e no alongamento do tubo polínico.

Um fator de grande importância para a germinação de grãos de pólen *in vitro* é a consistência do meio de cultura. Os meios líquidos têm uma desvantagem porque ocorre um desprendimento do tubo, dificultando a avaliação, além de provocar uma subestimativa da viabilidade dos gametas, uma vez que os grãos de pólen sem tubo polínico não são considerados germinados. Por outro lado, altas concentrações de ágar podem servir como barreira física, impedindo a germinação do tubo polínico (Almeida et al., 2002). A percentagem de germinação nula obtida nos meios M4, M5, M6 pode ser consequência da adição de ágar ao meio de cultura.

Com base nos resultados deste ensaio preliminar, definiu-se que o melhor meio de cultura para a germinação dos grãos de pólen de milho foi o meio M2, incubado em BOD por duas horas, a 25°C.

4.1.2 Definição do melhor horário de coleta dos grãos de pólen

Foram observadas diferenças significativas nas percentagens de germinação de grãos de pólen coletados em diferentes horários (Tabela 2A). O horário de 9 horas da manhã foi o mais adequado para a coleta, por proporcionar maiores valores de germinação (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 relativa do ar, houve redução nos valores de porcentagem de germinação dos grãos de pólen.

Com base nesses resultados, estabeleceu-se o horário das 9 horas da manhã para a coleta de grão de pólen nos trabalhos posteriores.

TABELA 3. Porcentagem de germinação de grão de pólen, em função de diferentes horários de coleta. UFLA, Lavras MG, 2008.

Horário de coleta	Germinação
09 horas	60,00 a
14 horas	47,13 b
16 horas	36,63 c

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

4.1.3 Determinação da tolerância dos grãos de pólen à secagem

Constataram-se diferenças significativas na porcentagem de germinação de grãos de pólen em função dos diferentes teores de água e sais utilizados no processo de secagem dos grãos de pólen (Tabelas 3A e 4A). Quando os grãos de pólen não foram secados e possuíam umidade de 51,7%, a germinação foi de 70,67% (Tabela 4).

Percebe-se que quando os grãos de pólen foram secados com NaCl, obtiveram-se maiores médias de germinação. Já para a viabilidade avaliada com o corante Alexander, maiores valores foram encontrados quando os grãos de pólen foram secados com cloreto de lítio.

É sabido que o teste do corante pode superestimar a viabilidade dos grãos de pólen. Isto foi observado quando se compararam os valores de germinação com os de viabilidade, por isso a necessidade de fazer uma correlação com algum outro teste. Estabeleceu-se que a secagem dos

grãos de pólen deve ser realizada com NaCl, uma vez que as médias de germinação foram maiores e sem grandes variações.

O valor máximo de germinação (70,67%) foi obtido no tratamento testemunha. Com a diminuição dos teores de água do pólen, considerando o NaCl, os valores de germinação decresceram até 14,26% quando os grãos de pólen se encontravam com 10,04% de água, depois de secados por dez horas em cloreto de sódio. Isso evidencia que os grãos de pólen perdem a viabilidade à medida que são dessecados. Resultados semelhantes foram encontrados por Roeckel-Drevet et al. (1995), que encontraram maior percentagem de germinação, com umidade do grão de pólen entre 40% e 50% .

Assim, adotou-se o método de secagem artificial em cloreto de sódio, devido às maiores médias de germinação.

TABELA 4 Resultados do ensaio preliminar da tolerância dos grãos de pólen à secagem com diferentes sais. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tratamentos	Teor de água	Germinação	Viabilidade
Testemunha	51,7%	70,67 a	89,84 b
4 hs NaCl	29,4%	48,43 b	89,77 b
4 hs LiCl	28,3%	27,01 c	94,78 a
6 hs NaCl	21,7%	34,17 c	99,31 a
6 hs LiCl	20,2%	32,90 c	100,00 a
8 hs NaCl	17,6%	20,47 d	83,82 b
8 hs LiCl	15,9%	3,71 e	96,97 a
10 hs NaCl	10,4%	14,26 d	97,92 a
10 hs LiCl	9,1%	10,05 e	45,64 c

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

4.2 Germinação e viabilidade de grãos de pólen de milho armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água

Para o número de sementes formadas por espiga, considerando o híbrido GNZ 2004, não foram constatadas diferenças significativas para todas as fontes de variação avaliadas (Tabela 5A). Desse modo, o número de sementes formadas independe do ambiente de armazenamento e da umidade inicial do grão de pólen (Tabelas 5 e 6).

Quando o tratamento adicional foi comparado com os outros tratamentos, constatou-se significância para todos os contrastes testados (Tabela 5A). Isso indica que foi constatado maior número de sementes por espiga formada no híbrido quando os grãos de pólen não foram secados nem armazenados. Este valor foi, em média, de 517 sementes por espiga, que é superior à maior média do contraste caracterizado pelos tratamentos nos quais os grãos de pólen foram armazenados em nitrogênio líquido (18 sementes por espiga).

Com base nestes resultados, constata-se a dificuldade de armazenagem de grãos de pólen de milho. Segundo Fehr & Hadley (1980), esses grãos têm uma membrana muito fina, que oferece pouca proteção, por isso a viabilidade pode ser perdida em poucos minutos após a coleta, devido à dessecação.

TABELA 5. Número médio de sementes formadas por espiga do híbrido GNZ 2004, provenientes de grãos de pólen armazenados em diferentes ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Ambientes de armazenamento	Número de sementes por espiga
Nitrogênio	8,89 a
Geladeira	8,53 a
Deep freezer	6,02 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 6. Número médio de sementes por espiga do híbrido GNZ 2004, provenientes de grãos de pólen com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Teores de água	Número de sementes por espiga
51,7%	6,69 a
29,4%	8,94 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Constatou-se a presença de interação significativa entre os teores de água e os ambientes de armazenamento para a germinação e a percentagem de viabilidade de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004 (Tabela 6A). Quando os grãos de pólen não foram secados, ou seja, estavam com 51,7% de teor de água, maior germinação foi observada quando estes foram armazenados em deep freezer e em nitrogênio líquido (Tabela 7); quando estavam com 29,4% de água, maiores valores de germinação foram obtidos quando os grãos foram armazenados em geladeira e em nitrogênio líquido.

Nos grãos de pólen armazenados em geladeira e em nitrogênio líquido, maiores valores de germinação foram encontrados quando estes foram secados por 4 horas e apresentavam 29,4% de teor de água. Para os grãos de pólen armazenados em deep freezer, maiores valores de germinação foram encontrados quando estes não foram secados e apresentavam 51,7% de teor de água.

Quando o tratamento adicional foi utilizado para avaliar a percentagem de germinação de grãos de pólen do híbrido, não foi observada diferença significativa entre os valores da testemunha (71,45%) e os valores de germinação dos grãos de pólen armazenados em nitrogênio (55,58%).

Ferreira et al. (2007) observaram que as maiores médias de germinação são encontradas quando os grãos de pólen de milho não são submetidos à secagem e ao armazenamento.

TABELA 7. Percentagem de germinação de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004 armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Teor de água	Ambiente		
	Deep freezer	Geladeira	Nitrogênio
51,7%	52,38 aA	12,88 bB	38,78 bA
29,4%	7,34 bB	74,77 aA	72,39 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Para a viabilidade dos grãos de pólen do híbrido, quando os grãos de pólen não foram secados, foi observada maior viabilidade quando estes foram armazenados em geladeira (Tabela 8). Almeida et al. (2002) mostraram que a geladeira proporcionou maior conservação de grãos de pólen de milho em relação ao freezer, quando estes apresentavam 20% de água. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Everett (1958), que concluiu que a melhor temperatura para o armazenamento de grãos de pólen de milho está entre -7°C e 4°C.

Quando os grãos de pólen estavam com 29,4% de teor de água, os maiores valores de viabilidade foram obtidos quando estes foram armazenados em nitrogênio líquido. Para os grãos armazenados em deep freezer e em geladeira, não foram observadas diferenças entre as

percentagens de viabilidade dos grãos de pólen com e sem secagem.

Considerando os contrastes com o tratamento adicional, para a viabilidade dos grãos de pólen do híbrido, não foi constatada significância entre os valores da testemunha (76,69%) e os valores de viabilidade dos grãos armazenados em nitrogênio (53,48%) e em geladeira (67,66%) (Tabela 6A).

TABELA 8. Percentagem de viabilidade de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004 armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Teor de água	Ambiente		
	Deep freezer	Geladeira	Nitrogênio
51,7%	15,33aB	65,69 aA	15,73 bB
29,4%	1,61 aC	69,68 aB	91,23 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Para o número de sementes formadas na espiga da linhagem Le 57, não foi detectada significância para nenhuma das fontes de variação avaliada (Tabela 7A, 9 e 10). Como nos grãos de pólen do híbrido, quando foi avaliado o contraste do tratamento adicional com os outros tratamentos, constatou-se significância para todos os contrastes testados (Tabela 7A). Isso indica que foi constatado maior número de sementes por espiga formadas na linhagem quando os grãos de pólen não foram secados nem armazenados (159 sementes por espiga).

Ressalta-se, mais uma vez, a dificuldade da armazenagem de grãos de pólen de milho. Vale ressaltar que esse tipo de grão é trinucleado, sendo menos tolerante à secagem. Sousa (1988) afirmou que isso pode ocorrer porque a segunda divisão meiótica priva o grão de pólen de reservas que garantam maior longevidade.

Ferreira et al. (2007) observaram que maior número de sementes formadas por espiga foi encontrado no tratamento testemunha, tanto para o híbrido quanto para a linhagem, quando as autofecundações foram realizadas com grãos de pólen não submetidos à secagem e ao armazenamento. Esses resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho.

Pfahler (1967) encontrou que a armazenagem de grãos de pólen de milho por um dia a 5⁰C não proporcionou mudança na habilidade para fertilização. Observa-se, então, que a armazenagem de grão de pólen de milho pode ser realizada por pequenos períodos.

Percebe-se que o número de sementes formadas por espiga e a germinação da linhagem foram muito inferiores quando comparados com os valores do híbrido. Sabe-se que a célula-mãe do grão de pólen tem a mesma constituição genética da planta-mãe e que, no híbrido, existe a heterose, ou vigor híbrido, que é o desempenho do híbrido em relação à média dos progenitores. Já as linhagens são endogâmicas, com os locos em homozigose Ramalho et al, 2000. Este melhor desempenho do híbrido pode ter passado para os grãos de pólen, influenciando, então, estes resultados.

TABELA 9. Número médio de sementes formadas por espiga da linhagem Le-57, provenientes de grãos de pólen armazenados em diferentes ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Ambientes de armazenamento	Número de sementes por espiga
Nitrogênio	3,76 a
Geladeira	3,96 a
Deep freezer	5,43 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 10. Número médio de sementes por espiga da Linhagem Le-57, provenientes de grãos de pólen com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Teores de água	Número de sementes por espiga
51,7%	4,13 a
29,4%	4,63 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Para a percentagem de viabilidade dos grãos de pólen da linhagem Le 57, constatou-se a presença de interação significativa entre o teor de água e o ambiente de armazenamento (Tabela 8A). Quando os grãos de pólen da linhagem não foram secados, foi observada maior viabilidade quando estes foram armazenados em geladeira (Tabela 11). Já quando estes estavam com 29,4% de teor água, os maiores valores de viabilidade foram obtidos quando os grãos de pólen foram armazenados em nitrogênio e em deep freezer.

Quando o tratamento adicional foi comparado com os outros tratamentos, constatou-se significância para todos os contrastes testados (Tabela 8A). Isso indica que foi constatada maior viabilidade dos grãos de pólen da linhagem quando os grãos de pólen não foram secados nem armazenados (65,22%).

TABELA 11. Viabilidade de grãos de pólen da linhagem Le 57 armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Teor de água	Ambiente		
	Deep freezer	Geladeira	Nitrogênio
51,7%	0 Cb	97,14 Aa	7,29 Bb
29,4%	76,58 Aa	0,78 Bb	66,63 Aa

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Para a germinação de grãos de pólen da linhagem, constatou-se efeito isolado do ambiente de armazenamento e do teor de água (Tabela 8A). Maiores valores de germinação foram observados quando os grãos de pólen foram armazenados em deep freezer e em nitrogênio líquido (Tabela 12) e quando os grãos de pólen foram secados até o teor de água de 29,4% (Tabela 13).

Na avaliação dos contrastes do tratamento adicional com os outros tratamentos, para a germinação dos grãos de pólen da linhagem, diferenças significativas foram observadas naqueles em que os grãos de pólen continham 51,7% de teor de água (26,25%) e quando foram armazenados em geladeira (5,04%). Em ambos os contrastes, os maiores valores de germinação foram observados quando os grãos de pólen não sofreram secagem artificial e nem foram armazenados (61,58%) (Tabela 8A).

TABELA 12. Percentagem de germinação de grãos de pólen da linhagem Le 57 armazenados em diferentes ambientes. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Ambientes de armazenamento	Germinação (%)
Nitrogênio líquido	49,0 a
Geladeira	5,04 b
Deep freezer	51,12 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 13 Percentagem de germinação de grãos de pólen da linhagem Le 57 com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Teores de água	Germinação (%)
51,7%	26,25 b
29,4%	47,86 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

4.3 Atividade de enzimas nos grãos de pólen

Para a linhagem, foi observada menor atividade da enzima esterase em grãos de pólen armazenados em geladeira e com 51,7% e 29,4% de teor de água (Figura 1). Nesse ambiente de armazenamento, foi observado o menor valor de germinação dos grãos de pólen (Tabela 12). Menor viabilidade foi observada nos grãos armazenados em geladeira, com 29,4% de teor de água (Tabela 11). No entanto, nesse ambiente, foi observada maior viabilidade dos grãos de pólen armazenados com 51,7% de teor de água. Foi observada, ainda, maior atividade dessa enzima em grãos armazenados em deep freezer, ambiente em que foi observada neles maior germinação. Já para os grãos de pólen do híbrido, foi constatada maior atividade da enzima quando estes foram armazenados com 29,4% de teor de água, independente do ambiente de armazenamento. Os valores de viabilidade e de germinação dos grãos de pólen de plantas híbridas variaram

com o ambiente de armazenamento e com os teores de água desses grãos.

A esterase é uma enzima que atua em ésteres de membrana e pode estar relacionada com a deterioração de tecidos (Santos et al., 2004). Nessa pesquisa, não houve relação entre as perdas de viabilidade e de germinação, com a atividade desta enzima. Em grãos de pólen com diferentes níveis de germinação e de viabilidade, houve variações não consistentes na atividade desta enzima.

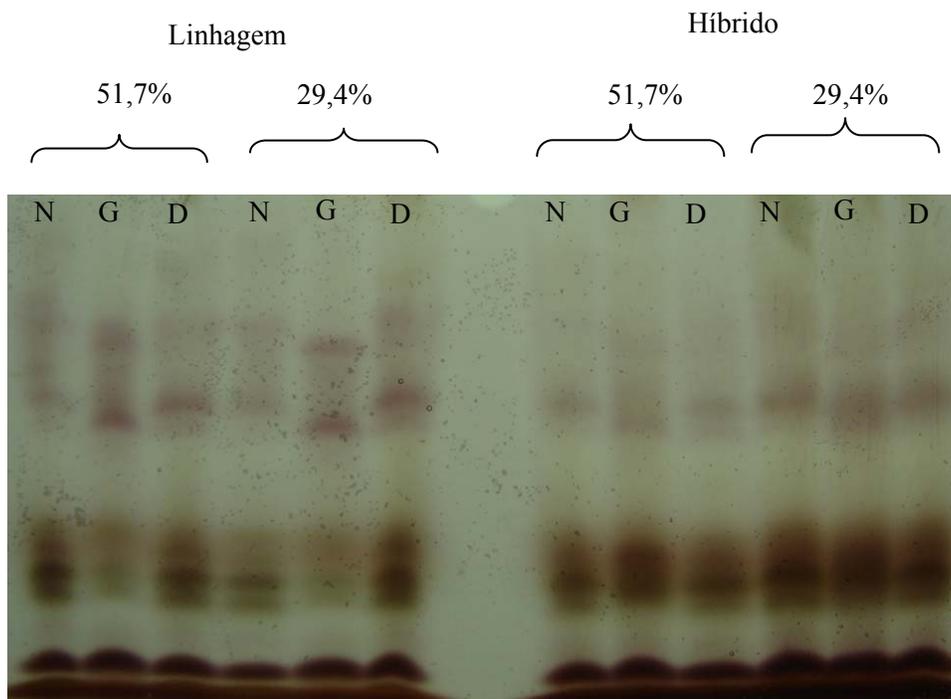


FIGURA 1. Padrões da enzima esterase em grãos de pólen de milho com teores de água de 51,7% e de 29,4%, armazenados em nitrogênio líquido (N), em geladeira (G) e em deep freezer (D). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Para o sistema enzimático malato desidrogenase (MDH) (Figura 2), os grãos de pólen da linhagem que foram armazenados com 51,7% de teor de água em geladeira apresentaram maior intensidade nas bandas. Nesse mesmo tratamento, foi observado maior valor de viabilidade (Tabela 11). Para os grãos de pólen do híbrido, observou-se o desaparecimento de bandas no zimograma dos grãos de pólen que foram armazenados em geladeira e em deep freezer, com 29,4% de teor de água. Nos grãos armazenados nessas condições, houve menor viabilidade, quando comparada à observada em nitrogênio (Tabela 8).

A malato desidrogenase (MDH) é uma enzima importante na via aeróbica da respiração. Dessa forma, a manutenção da atividade dessa enzima parece importante para a preservação da viabilidade dos grãos de pólen.

A MDH tem sido utilizada como um dos marcadores de qualidade fisiológica em sementes de diferentes espécies. Aumento na sua atividade foi observado em sementes envelhecidas de milho e de algodão (Brandão Júnior, 1996, Vieira 1996).

Essa enzima catalisa a conversão de malato a oxaloacetato e tem uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato por meio da membrana mitocondrial e de outros compartimentos celulares. Geralmente, é de natureza constitutiva com atividade não limitante em todas as organelas e no citoplasma.

Lima et al. (2003) observaram grande variabilidade na atividade da malato desidrogenase em grão de pólen e em folhas de diferentes cultivares de pessegueiro e de nectarina, tornando essa enzima importante na caracterização de cultivares destas fruteiras.

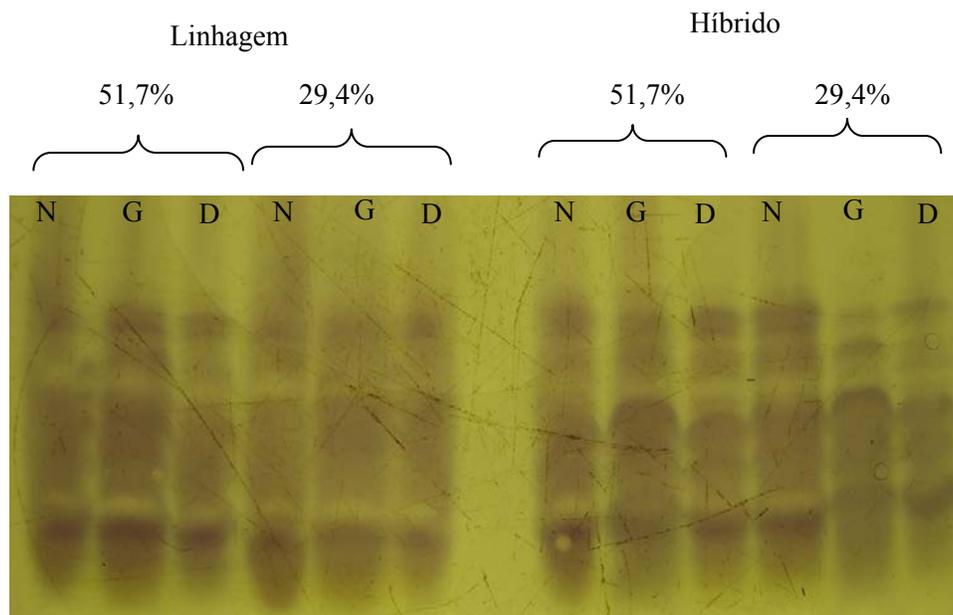


FIGURA 2. Padrões da enzima malato desidrogenase em grãos de pólen de milho com teores de água de 51,7% e de 29,4%, armazenados em nitrogênio líquido (N), em geladeira (G) e em deep freezer (D). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Para o sistema enzimático peroxidase (Figura 3), não foram observadas diferenças significativas entre os padrões eletroforéticos dos grãos de pólen do híbrido. Já em relação aos padrões observados para a linhagem, menor atividade dessa enzima foi observada em grãos de pólen que foram armazenados em geladeira, com 51,7% de teor de água. Nos grãos armazenados nessas condições foi observado maior valor de viabilidade (Tabela 11).

Provavelmente, houve menor presença de radicais livres formados nesses grãos de pólen durante o armazenamento e, conseqüentemente, menor necessidade dessa enzima, que está envolvida na remoção de radicais

livres, os quais estão presentes durante a deterioração de tecidos.

Já nos grãos de pólen armazenados em deep freezer, com 51,7%, houve maior atividade dessa enzima e, nesse tratamento, foi observada menor viabilidade (Tabela 11). No entanto, nos grãos de pólen com 29,4% de teor de água e armazenados também em deep freezer, houve alta atividade da enzima peroxidase e maior viabilidade dos grãos de pólen. Assim, a atividade dessa enzima parece estar diretamente relacionada ao teor de água dos grãos de pólen.

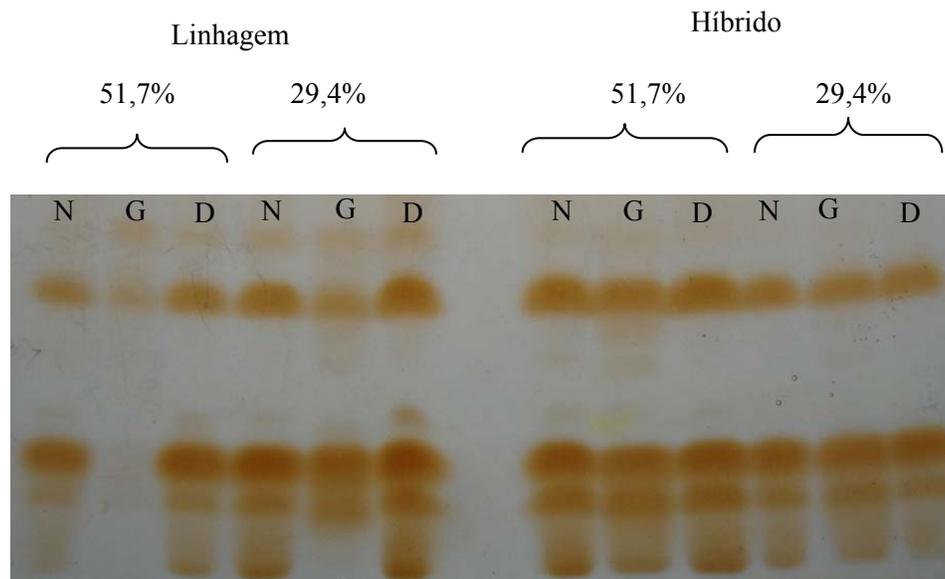


FIGURA 3. Padrões da enzima peroxidase em grãos de pólen de milho com teores de água de 51,7% e de 29,4%, armazenados em nitrogênio líquido (N), em geladeira (G) e em deep freezer (D). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Observou-se maior atividade da enzima superóxido dismutase (Figura 4) nos grãos de pólen do híbrido que foram armazenados em nitrogênio líquido e em geladeira, com 51,7% de teor de água, e menor atividade nos que foram

armazenados em deep freezer. Esta enzima está presente no citoplasma celular e na matriz mitocondrial, catalisando a reação de desmutação do O_2 tóxico para O_2 e H_2O_2 . Este composto formado deve ser removido por outras enzimas, como a catalase e a peroxidase.

Menor viabilidade foi observada em grãos de pólen armazenados nessas condições, em que pode ocorrer oxidação com perdas na viabilidade. Já para os grãos armazenados com 29,4% não houve diferença na atividade dessa enzima, independente do ambiente de armazenamento.

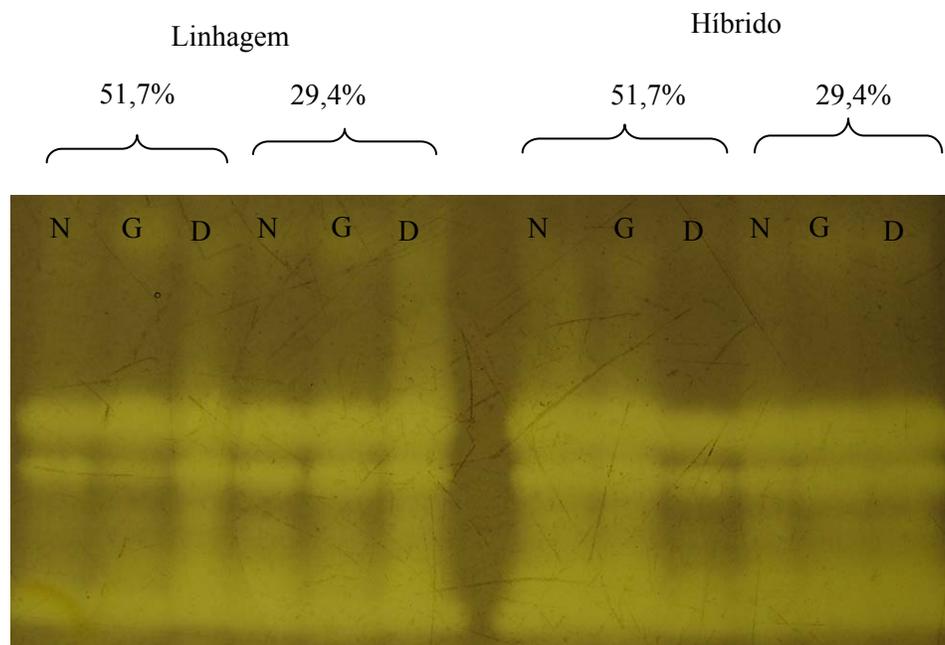


FIGURA 4. Padrões da enzima superóxido dismutase em grãos de pólen de milho com teores de água de 51,7 e de 29,4%, armazenados em nitrogênio líquido (N), em geladeira (G) e em deep freezer (D). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Pelo perfil eletroforético de proteínas resistentes ao calor (Figura 5), pôde-se observar a predominância de bandas de baixo peso molecular, ao redor de 10 KDa.

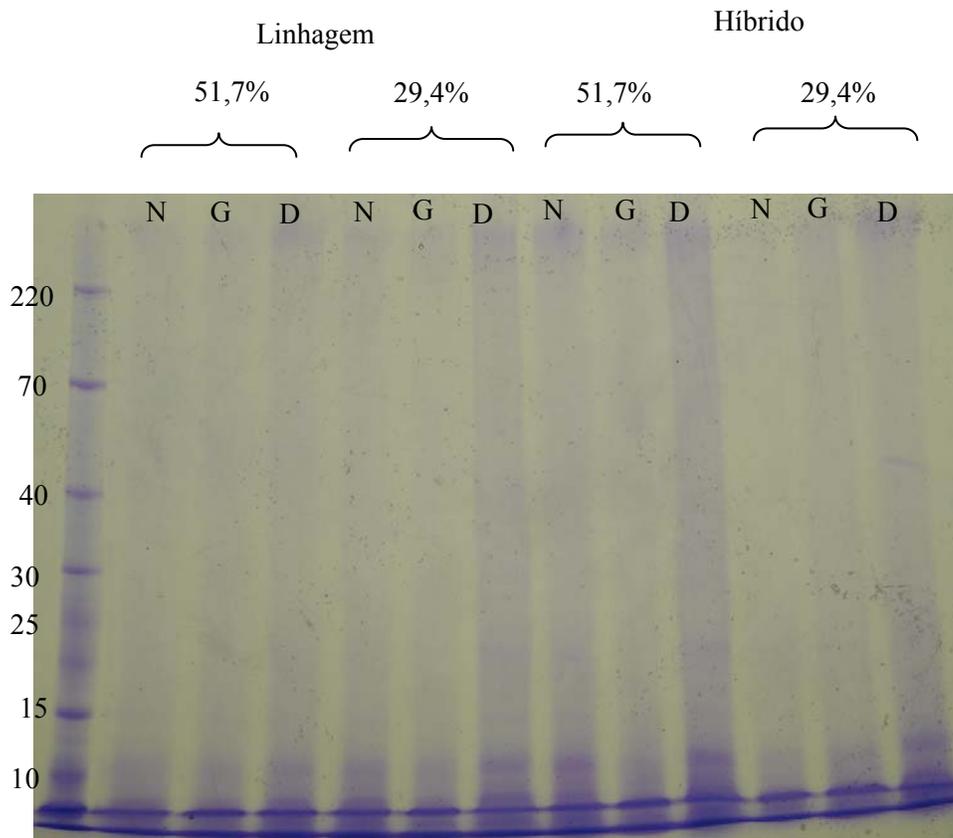


FIGURA 5. Perfil eletroforético de proteínas extraídas pelo calor em grãos de pólen de milho com teores de água de 51,7% e de 29,4%, armazenados em nitrogênio líquido (N), em geladeira (G) e em deep freezer (D). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Em sementes intolerantes à dessecação, também há predominância de proteínas resistentes ao calor com baixo peso molecular. Dessa forma, essa predominância pode estar contribuindo para que a tolerância à dessecação dos grãos de pólen de milho seja baixa. Isso pôde ser observado também nos resultados obtidos para viabilidade, germinação e número de sementes por espiga, nos quais houve redução desses valores, quando os grãos de pólen foram submetidos à secagem.

As proteínas resistentes ao calor são formadas, principalmente, no final do processo de desenvolvimento das sementes e estão relacionadas com a tolerância à dessecação porque são altamente hidrofílicas e mantêm a estrutura de membranas de organelas organizada.

Os marcadores enzimáticos, avaliados isoladamente, não são seguros para prever a viabilidade de grãos de pólen submetidos à secagem e armazenados sob diferentes condições. No entanto, por meio dos zimogramas, observaram-se variações nas atividades dessas enzimas nos grãos de pólen armazenados sob diferentes condições. Isso indica que há mudanças, no âmbito bioquímico, em grãos de pólen submetidos à secagem e armazenados sob diferentes condições. Essas mudanças, no conjunto, podem, de alguma forma, influenciar a viabilidade dos grãos de pólen.

5 CONCLUSÕES

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 sódio a 25°C e quando a coleta foi realizada às 9 horas.

O poder germinativo dos grãos de pólen reduz-se com a dessecação.

A conservação de grãos de pólen de milho varia com os ambientes de armazenamento e com os teores de água, e torna-se reduzida com o armazenamento.

Diferentes padrões protéicos foram observados em grãos de pólen armazenados sob diferentes condições.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWALA, S.C.; CHATTERJEE, C.; SHARMA, P.N.; SHARMA, P.C.; NAUTIYAL, N. Pollen developmet in maize plants subjected to molibdenum deficiency. **Canadian Journal Botanic**, v.57, p.1946-1950, 1979.

ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Tecnology**, Baltimore, v. 44, p.117-122, 1969.

ALEXANDER, M.P.A A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v.55, p.13-18, 1980.

ALFENAS, A.C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1998. p.151-182.

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. **Anais...** Florianópolis, 2002.

ANDRES, M.V.; RODRIGUEZ, J.; DURAN, J.M. Viabilidade del pólen de lalbaricoqueiro (*Prunus armeniaca* L.). **Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.**, v. 14, p.1-2, 1999.

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**, v.39, p.221-225, 1988.

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

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation on tolerance in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, July 1991.

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, n.1, p.225-230, Sept. 1992.

BRANDÃO JUNIOR, D.E. **Eletofórese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.

BRIEGER, F.G.; BLUMENSCHNEIN, A. Botânica e origem do milho. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE POTASSA. **Cultura e adubação do milho**. São Paulo, 1996. p.80-107.

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

CHANG, M.T.; NEUFFER, M.G. Position of the vegetative and sperm cells of germinating pollen grain in maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v.37, p.233-243, 1992.

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

EVERETT, H.L. Increasing the longevity of corn pollen. **Annual Hybrid Corn Ind. Res. Conf.** v.13. p.47-53, 1958.

FEHR, W.R.; HADLEY, H.H. **Hybridization of crop plants**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. 766 p.

FERREIRA, C.A.; VON, V. PINHO, E.V.R.; ALVIM, P.O.; ANDRADE, V.; SILVA, T.T.A.; CARDOSO, D.L. Conservação e determinação da viabilidade de grãos de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.26, n. 2, p.159-173, 2007.

FRANZON, R.C.; RASEIRA, M.C.B. Germinação in vitro e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, p.18-20, 2006.

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

GOMES, P.R.; GARCIA, A.; RASEIRA, M. do C.R.; SILVA, J.B. da. Coleta e conservação de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Agropecuária Clima Temperado**, v.3, n.1, p.19-29, 2000.

GOMES, P.R.; RASEIRA, M. do C.R.; BAUDET, L.L.; PESKE, S. T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.1, p.14-17, 2003.

GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. Botânica. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. v.1, p.41-78.

HONG, T.D. et al. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in airdry storage environments. **Annals of Botany**, v.83, p.167-173, 1999.

KATIYAR, S.K.; SACHAN, J.K.S. Isozyme diversity in *Zea* and related genera. **Maize Newsletter**, v. 66, 1992.

KIRBY, E.G.; SMITH, J.E. Elutable substances of pollen grain walls. In: LINSKENS, H.F. **Fertilization in higher plants**. Amsterdam: North-Holland, 1974. p.127130.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v.3, n.3, p.231-246, Sept. 1993.

LIMA, M.R.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; RASEIRA, M.C.B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.349-355, 2003.

LOUPASSAKI, M.; VASILAKAKIS, M.; ANDROULAKIS, I. Effect of pre-incubation humidity and temperature treatment on the in vitro germination of avocado pollen grains. **Euphytica**, Wageningen, v.94, p.247-251, 1997.

NUNES, J.C.O.; DANTAS, A.C.M.; PEDROTTI, E.L.; ORTH, A. GUERRA, M.P. Germinação de pólen in vitro e receptividade estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.35-39, 2001.

PEDROZO, C.A.; SOUZA, T.M.; DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; PEREIRA, A.V. Estimativa da viabilidade de pólen em *Pennisetum* spp. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 10, 2001, Lavras. **Programa e Resumos...** Lavras: UFLA/Capes, 2001.

PFAHLER, P.L. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. II. Pollen source, calcium and boron interations. **Canadian Journal Botanic**, v.46, p.235-240, 1968.

PFAHLER, P.L. Fertilization hability of maize pollen grains. Pollen genotype, female sporophyte, and pollen storage interactions. **Genetics**, v.57, p.513-521, 1967.

PIO, L.A.S.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M.; RAMOS, J.D.; ARAÚJO, A.G. Germinação in vitro de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n.3, p.293-296, jul./set. 2004

RAMALHO, M.A.P.; FERREIRA, D.F.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 303p.

RASEIRA, M. do C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum***. Pelotas, RS: Embrapa/Cpact, 1996. 95p.

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.

ROSA, S.D.V.F. da.; VON PINHO, E.V.R.; VIEIRA, M.G.G.C.; VEIGA, R.D. Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento à baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.2, p.290-318, 2004.

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**, v.65, n.11, p.785-788, 1995.

SANTOS, C. M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.V. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.110-119, 2004.

SOUSA, V.A. de. **Manejo e viabilidade do pólen de Eucalyptus spp.** 1988. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management.** New York: Springer Verlag, 1974. 172p

THOMANN, E.B.; SOLLINGER, J.; WHITE, C.; RIVIN, C.J. Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in *Zea mays* embryos. Roles of abscisic acid and the viviparous-1 gene product. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, n.2, p.607-614, June 1992.

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, July 1950.

VIEIRA, M.G.G.C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum L.*).** Lavras, 1996. 114p. Tese (Doutorado em fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras.

WORKERS, W.F.; BOCHICCHIO, A.; SELVAGGI, G.; HOEKSTRA, F.A. Fourier transform infrared microscopy detects changes in protein secondary structure associated with desiccation tolerance in developing maize embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, n.3, p.1169-1177, Mar. 1998.

ANEXOS

	Página
TABELA 1 A	
Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à percentagem de germinação de grãos de pólen de milho submetidos a diferentes meios de cultura e temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	49
TABELA 2 A	
Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à percentagem de germinação de grãos de pólen, em função de diferentes horários de coleta. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	49
TABELA 3 A	
Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à percentagem de germinação de grãos de pólen de milho secados com diferentes sais e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	50
TABELA 4 A	
Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à percentagem de viabilidade de grãos de pólen de milho secados com diferentes sais e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	50

TABELA 5A	Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos ao número de sementes formadas por espigas provenientes de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	51
TABELA 6 A	Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à germinação e à viabilidade de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	52
TABELA 7 A	Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos ao número de sementes por espiga provenientes de grãos de pólen da linhagem Le 57, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	53
TABELA 8 A	Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à percentagem de germinação e de viabilidade de grãos de pólen da linhagem Le 57, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.....	54

TABELA 1A. Resumo da análise de variância dos dados relativos à percentagem de germinação de grãos de pólen de milho submetidos a diferentes meios de cultura e temperaturas. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios
Meios de Cultura	5	3086,80*
Temperatura	1	461,67 *
Meios x Temp.	5	375,06 *
Erro	36	
Total	47	
Média	14,01	
CV	47,06	

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 2A. Resumo da análise de variância dos dados relativos à percentagem de germinação de grãos de pólen, em função de diferentes horários de coleta. UFLA, Lavras, MG, 2008.

FV	GL	QM
Horários	2	1096,54 *
Erro	21	70,03
Total	23	
CV		14,63

TABELA 3A. Resumo da análise de variância dos dados relativos à percentagem de germinação de grãos de pólen de milho secados com diferentes sais e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios
Tratamentos	8	1293,00*
Erro	18	88,05
Total	26	
Média	29,1	
CV(%)	32,27	

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 4A. Resumo da análise de variância dos dados relativos à percentagem de viabilidade de grãos de pólen de milho secados com diferentes sais e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios
Tratamentos	8	866,71 *
Erro	18	61,32
Total	26	
Média	88,7	
CV (%)	8,83	

* significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

TABELA 5A. Resumo da análise de variância dos dados relativos ao número de sementes formadas por espiga provenientes de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

FV	GL	QM
Ambiente (A)	2	19,62
Teores (T)	1	30,35
A*T	2	94,14
Bloco	3	62,22
Média	7,81	
CV (%)	79,54	
Tratamento adicional		
Adicional versus 51,7%	1	782977,24 **
Adicional versus 29,4%	1	776098,17 **
Adicional versus nitrogênio	1	689990,51 **
Adicional versus geladeira	1	690967,50 **
Adicional versus deep freezer	1	697812,18 **
Média	80,64	
CV (%)	13,70	

TABELA 6A. Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à germinação e à viabilidade de grãos de pólen do híbrido GNZ 2004, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

FV	GL	QM	
		Germinação	Viabilidade
Ambiente(A)	2	0,21**	1,29**
Teores (T)	1	0,16	0,49**
A*T	2	0,90**	0,94**
Média		1,18	
CV (%)		16,30	
Tratamento adicional	1		
Adicional versus 51,7%	1	0,49**	0,92**
Adicional versus 29,4%	1	0,18**	0,22**
Adicional versus nitrogênio	1	0,07	0,18
Adicional versus geladeira	1	0,26**	0,03
Adicional versus deep freezer	1	0,64**	2,01 **
Média		1,23	1,23
CV (%)		14,56	17,65

TABELA 7A. Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos ao número de sementes por espiga provenientes de grãos de pólen da linhagem Le 57, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

FV	GL	QM
Ambiente (A)	2	6,61
Teores(T)	1	1,51
A*T	2	3,79
Bloco	3	6,55
Média		57,52
CV (%)		4,38
Tratamento adicional		
Adicional versus 51,7%	1	72477,71**
Adicional versus 29,4%	1	72011,00**
Adicional versus nitrogênio	1	64733,45**
Adicional versus geladeira	1	64566,12**
Adicional versus deep freezer	1	63355,96**
Média		26,55
CV (%)		61,39

TABELA 8A. Resumo da análise de variância (QM) dos dados relativos à germinação e à viabilidade de grãos de pólen da linhagem Le 57, armazenados em diferentes ambientes e com diferentes teores de água. UFLA, Lavras, MG, 2008.

FV	GL	QM	
		Germinação	Viabilidade
Ambiente(A)	2	1,44**	0,09
Teores(T)	1	0,38**	0,11
A*T	2	0,02	3,62**
Média		1,07	1,13
CV (%)		17,37	12,15
Tratamento adicional			
Adicional versus 51,7%		0,62**	0,43**
Adicional versus 29,4%		0,13	0,18**
Adicional versus nitrogênio		0,04	0,31**
Adicional versus geladeira		1,78**	0,10**
Adicional versus deep freezer		0,01	0,43**
Média		1,12	1,17
CV (%)		15,71	11,05