



Meios de cultura para germinação de grãos de pólen de milho

Culture media for germination of pollen grains of maize

**Patrícia de Oliveira Alvim Veiga¹, Renzo Garcia Von Pinho², Édila Vilela de Rezende Von Pinho²,
André Delly Veiga¹, Kênia Carvalho de Oliveira³, Rafael Parreira Diniz⁴**

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS), Campus Machado, Rodovia Machado- Paraguaçu, km 03, Bairro Santo Antônio, Machado, MG. E-mail: paalvim@hotmail.com

²Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitotecnia, Lavras, MG

³Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Campinas, SP

⁴Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Genética, Lavras, MG

Recebido em: 25/04/2011

Aceito em: 06/07/2012

Resumo. O objetivo desse trabalho foi selecionar o melhor meio de cultura e a temperatura de incubação para germinação dos grãos de pólen e determinar o horário de coleta e a metodologia de secagem destes. Os ensaios foram realizados no Laboratório Central de Sementes e na área experimental do Departamento de Agricultura da UFLA. Foram testados seis meios de cultura e duas temperaturas para incubação de grãos de pólen (25 e 30°C) coletados em diferentes horários do dia (9, 14 e 16 horas). Avaliou-se também a tolerância do grão de pólen à dessecação usando dois sais (cloreto de sódio e de lítio). Para avaliar a germinação, os grãos de pólen foram colocados em placas de petri com meio de cultura na temperatura adequada por duas horas. Para o teste do corante utilizado para avaliar a viabilidade, os grãos de pólen foram submetidos a lâminas com corante Alexander e avaliados com auxílio de microscópio óptico. Maiores valores de germinação dos grãos de pólen são observados em meio de cultura contendo 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de sódio a 25°C e quando a coleta é realizada às 9 horas. Grãos de pólen de milho perdem a viabilidade na medida em que são dessecados.

Palavras-chave. Conservação de recursos genético, Melhoramento genético, *Zea mays*.

Abstract. The objective of this work was to select the best culture medium and incubation temperature for germination of pollen grain and determine the collection time and drying methodology of them. The trials were performed in the Central Laboratory of Seeds and in the experimental area of the UFLA Agriculture Department. Six culture media and two temperatures for incubating pollen grains (25 e 30°C) collected at different times of day (9, 14 and 16 hours) were tested. Also the tolerance of the pollen grain to dissection using two salts (sodium and lithium chlorite) was evaluated. To evaluate germination, the pollen grains were placed onto Petri dishes with culture medium at the adequate temperature for two hours. For the test of the dye utilized to evaluate viability, the pollen grains were submitted to slides with Alexander dye. The evaluation was done with the aid of a light microscope. Increased values of pollen germination grains are 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 is done at 9 hours. Corn pollen grains lose their viability as they are dissected.

Keywords. Conservation of genetic resources, Genetic breeding, *Zea mays*.

Introdução

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar qualitativamente 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 Souza (1988).

A sacarose empregada no meio de cultura tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornecer



energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974).

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).

Outros fatores de grande importância na viabilidade 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). Para a temperatura os resultados encontrados também variam, sendo que Thompson & Batjer, (1950) utilizaram 24°C para pólen de ameixeira, pessegueiro, damasqueiro, cerejeira européia, pereira e macieira. Em milho uma temperatura de 24°C tem proporcionado boa germinação, e a temperatura de 0°C a inibe (Broglia & Brunori, 1994).

O teor de água do pólen deve ser considerado, e normalmente encontra-se negativamente relacionado à longevidade (Sousa, 1988). Mas o teor de água ideal varia para cada caso empregado. Souza, 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 uma 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 (Connor & Towil, 1993; Hong et al., 1999), sílica gel, dessecação à vácuo e vapor de nitrogênio líquido. 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).

Outro fator a ser considerado é a avaliação adequada da viabilidade e germinação do grão de pólen para que se avalie com segurança a qualidade

do pólen. Existem várias técnicas para estimar a viabilidade do grão de pólen, como o teste dos corantes químicos, germinação *in vitro* e *in vivo* (Pio, 2004). A coloração é um procedimento bastante simples, barato e que fornece resultados rapidamente, tornando-se bastante atrativa para a palinologia. Considerando que existe uma correlação entre a viabilidade e a coloração, a estimativa é dada pela contagem dos pólenes não abortados e abortados que mostram-se corados e não corados, respectivamente. Vários são os corantes empregados com esta 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), 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* quando comparado com a germinação *in vitro* onde se avaliou o crescimento do tubo polínico, 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 pólenes com paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas, pois dificultam a penetração do corante e conseqüentemente, a coloração. Nessa condição, pólenes viáveis podem não apresentar coloração e ser equivocadamente classificados como abortados. Por isso o autor propôs a utilização de um corante diferencial a 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, 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.

Nos testes de germinação I, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura e a viabilidade é observada por meio de microscópio, através da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico. São considerados germinados os grãos que



apresentavam tubos polínicos que ultrapassam o comprimento do diâmetro do próprio grão de pólen.

Poucos são os trabalhos relacionando as condições ideais para a germinação e viabilidade dos polens *in vitro*, assim como uma adequada técnica para a avaliação desta viabilidade, ressaltando então a importância de trabalhos desta natureza que avaliam a influência dos fatores na longevidade dos grãos de pólen de milho.

Diante do exposto, neste trabalho, objetivou-se avaliar diferentes meios de cultura para germinação e temperaturas para incubação, associados a diferentes horários de coleta dos grãos de pólen. Avaliou-se também a tolerância do grão de pólen à dessecação quando secados em dois diferentes sais.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Sementes e no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Os grãos de pólen utilizados para a realização do trabalho foram coletados em uma lavoura conduzida com o híbrido GNZ 2004, da empresa Geneze Sementes Ltda, em área do Departamento de Agricultura da UFLA. Foram avaliados seis meios de cultura nas temperaturas de 25 e 30°C (Tabela 1).

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para avaliação da germinação *in vitro* de grãos de pólen de milho.

| Meio (n°) | Sacarose (%) | H3BO3 (%) | 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 |

Os elementos componentes dos meios foram dissolvidos em água destilada e aquecidos em forno microondas até a dissolução completa dos componentes. Cerca de 20 mL de meio ainda quente, foi colocado 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 (um *ependorf* de 200 ul) foi colocada nas

placas de petri. Após 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 de pólen que apresentaram tubo polínico de comprimento igual ou superior ao diâmetro do próprio pólen (Pio, 2004).

Foram realizadas coletas de grãos de pólen às 9, 14, 16 horas. Amostras dos grãos de pólen foram incubadas no meio de cultura M2 (Tabela 1) à 25°C e a avaliação foi conforme metodologia descrita anteriormente.

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 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 dos grãos de pólen com a solução salina. Estes foram mantidos por períodos correspondentes à quatro, seis, oito e dez horas dentro da estufa tipo BOD. Foi utilizado também um tratamento testemunha, correspondente aos grãos de pólen que não foram submetidos a 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 através do teste do corante. O teste de germinação foi realizado como já descrito, no meio de cultura M2 a uma temperatura de 25 °C e incubados em BOD por duas horas. Posteriormente avaliou-se a germinação através do microscópio óptico. Para o teste do corante os grãos de pólen foram submetidos a lâminas com corante Alexander, (Alexander, 1969). Após 24 horas de armazenamento, foram feitas as avaliações em microscópio de luz, avaliando quatro campos de visão, correspondendo a quatro repetições. Os polens corados de roxo foram considerados viáveis e os corados de verde inviáveis.

Para definir 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. Para definição do melhor horário de coleta dos grãos de pólen utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso com três tratamentos (horários de coleta) e sete repetições. Para determinar 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.

Resultados e Discussão

Observou-se diferença significativa nos valores de germinação dos grãos de pólen submetidos aos diferentes meios de cultura e temperatura e também para a interação entre meios de cultura e temperaturas. Na temperatura de 25° C maiores valores de germinação foram encontrados quando foi utilizado o meio M2 seguido pelo M1 e M3. Nos meios de cultura M4, M5, M6 a germinação dos grãos de pólen foi nula, o que também ocorreu na temperatura de 30° C (Tabela 2). Nesta temperatura foi o observado maior valor de germinação no M1, seguido pelo M2 e M3. Nos meios M4, M5, M6 não foi observada diferença significativa na porcentagem de germinação nas duas temperaturas. Já para os meios M2 e M3 a maior germinação foi observada na temperatura de 25° C.

Tabela 2. Resultados médio de germinação (%) de grãos de pólen em diferentes meios de cultura nas temperaturas de 25° e 30°C.

| 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.

Almeida et al. (2002) mostraram que os meios contendo teor de sacarose entre 10 e 20% proporcionaram maior germinação, sendo que a concentração em torno de 10% é 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 onde foi utilizado 10 e 20% de sacarose observou-se as maiores médias de germinação. A menor germinação do meio M3 deve ser sido resultante 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) concluíram, 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 alongamento do tubo polínico.

A consistência do meio de cultura é de grande importância para germinação de grãos de pólen *in vitro*. Os meios líquidos têm uma desvantagem porque ocorre um desprendimento do tubo polínico 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 porcentagem de germinação nula obtida nos meios M4, M5, M6 pode ser consequência da adição de agar no meio de cultura. Com base nestes resultados observamos que o melhor meio de cultura para germinação dos grãos de pólen de milho foi o meio M2, incubado em BOD por duas horas à 25° C.

O horário de 9 horas da manhã foi o mais adequado para coleta por proporcionar maiores valores de germinação. No decorrer do dia, com o aumento da temperatura e diminuição da umidade relativa do ar, houve uma redução nos valores de porcentagem de germinação dos grãos de pólen. Pois a liberação do pólen 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).

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. Quando os grãos de pólen não foram secados e possuíam umidade de 51,7 % a germinação foi de 70,67% (Tabela 3).



Tabela 3. Resultados do ensaio preliminar da tolerância dos grãos de polens à secagem com diferentes sais. UFLA, Lavras, MG, 2011.

| 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 pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Percebe-se que quando os grãos de pólen foram secados com NaCl, obteve-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 comparou os valores de germinação com os de viabilidade, por isso a necessidade de fazer uma correlação com algum outro teste. Observou-se que a secagem dos grãos de pólen de milho 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. Isto evidencia que os grãos de pólen perdem a viabilidade à medida que são dessecados. A dificuldade da armazenagem de grãos de pólen de milho fato é devido ao grão de pólen ser trinucleado, os grãos de pólen binucleado são mais tolerantes à secagem. Sousa (1988) afirmou que isso pode ocorrer porque a segunda divisão meiótica priva o grão de pólen de reservas que garantiam uma maior longevidade.

Conclusões

Maiores valores de germinação dos grãos de pólen são observados em meio de cultura contendo 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de sódio a 25°C e quando a coleta é realizada às 9 horas. Grãos de pólen de milho perdem a viabilidade na medida em que são dessecados.

Referências

- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, p. 117-122, 1969
- ALMEIDA, C.C.S.; AMORIM, E.P.; SERENO, M.J.C.M.; BARBOSA NETO, J.F.; VOLTZ, A.H. Efeito de desidratante e temperatura na estocagem de pólen de milho (*Zea mays* L.). In: XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Florianópolis, **Anais...** Florianópolis, SC, 2002.
- BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The Embryology of Angiosperms**. New Delhi: Skylark Printers, 1974. 264p.
- 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.
- 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.
- GOODMAN, M.M., SMITH, J.S.C. Botânica. In: PATERNIANI, E., VIEGAS, G.P. (Eds). Melhoramento e produção de milho. Campinas: **Fundação Cargill**, v.1, p. 41-78, 1987.
- HONG T.D., HONG, T.D.; ELLIS, R.H.; BUITINK, J.; WALTERS, C.; HOEKSTRA, F.A.; CRANE, J. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in airdry storage environments. **Annals of Botany**, London, v.83, p.167-173, 1999.



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 of Botany**, Ottawa, v.46, p.235-240, 1968.

PIO, L.A.S.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M.; RAMOS, JD.; ARAÚJO, AG. 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

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. Pollen: biology, biochemistry and management. **New York: Springer verlag**, 1974.172p.

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

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.