

Conservação de grão de pólen de *Urochloa brizantha* cv. BRS Ybaté



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura e Pecuária**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
54**

**Conservação de grão de pólen de
Urochloa brizantha cv. BRS Ybaté**

*Andrea Raposo
Rosângela Maria Simeão
Sanzio Barrios
Cacilda Borges do Vale*

**Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2023**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368 2000
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Gado de Corte

Presidente
Rodrigo Amorim Barbosa

Secretário-Executivo
Rodrigo Carvalho Alva

Membros
Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto Romeiro
de Oliveira Menezes, Luiz Orcício Fialho de
Oliveira, Marcelo Castro Pereira, Mariane de
Mendonça Vilela, Marta Pereira da Silva, Mateus
Figueiredo Santos, Vanessa Felipe de Souza

Supervisão editorial
Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto e tratamento das ilustrações
Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa
Rodrigo Alva / Andréa Raposo

1ª edição
Publicação digitalizada (2023)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Gado de Corte

Conservação de grão de pólen de *Urochloa brizantha* cv. BRS Ybaté /
Andrea Raposo ... [et al.]. - Brasília, DF: Embrapa Gado de Corte, 2023.
PDF (36 p.) : il. color. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-9715 ; 54).

1. *Urochloa brizantha*. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Polen. 4.
Calorimetria. 5. Armazenamento. 6. Capim. I. Raposo, Andrea. II. Simeão,
Rosângela Maria. III. Barrios, Sanzio. IV. Vale, Cacilda Borges do. V. Embrapa
Gado de Corte. VI. Série.

CDD (21. ed.) 633.2

Sumário

Introdução.....	8
Material e métodos	12
Coleta	12
Desidratação de grãos de pólen por meio de sais saturados	13
Avaliação da viabilidade de pólen	14
Análise estatística.....	15
Resultados.....	15
Discussão	22
Conclusão.....	26
Referências	26

Conservação de grão de pólen de *Urochloa brizantha* cv. BRS Ybaté

Andrea Raposo¹

Rosângela Maria Simeão²

Sanzio Barrios³

Cacilda Borges do Vale⁴

Resumo – As pastagens tropicais plantadas correspondem a aproximadamente 154 milhões de hectares no Brasil e cerca de 80% destas são de gramináceas do gênero *Urochloa* (sin. *Brachiaria*). Capim originário da África, chegou ao Brasil no século passado e, por volta dos anos 60, na região Centro Oeste. A partir dos anos 80, com a intensificação dos programas de melhoramento genético da Embrapa, foram sendo lançadas cultivares cada vez mais produtivas. A maioria dos seus acessos é poliploide e sua reprodução ocorre preferencialmente por apomixia. Nos programas de melhoramento das espécies apomíticas, os cruzamentos são realizados, normalmente, no nível tetraploide, usando-se um genitor sexual como receptor de pólen e um genitor apomítico como doador. Para que tal cruzamento ocorra, é necessário que se tenha sincronização do florescimento entre os genitores. A viabilidade do grão de pólen é primordial para essas espécies, não apenas para a fecundação dos núcleos polares, resultando na formação do endosperma e assim garantindo a viabilidade da semente, mas também no que diz respeito à sua dispersão, aptidão e a sobrevivência da próxima geração. Estudos que avaliem esta viabilidade após a conservação são fundamentais para os programas de melhoramento, já que poderão evitar a dependência da sincronização natural da floração em hibridações controladas. O objetivo do presente trabalho foi determinar as condições adequadas que proporcionem maior tempo de via-

¹ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas - USP, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

² Bióloga, doutora em Genética - UFPR, pós doutora em Seleção genômica - Dairy Forage Research Center do ARS/USDA, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

³ Engenheiro-Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas- USP, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

⁴ Engenheira-Agrônoma, doutora em Melhoramento de Plantas - University of Illinois, pesquisadora aposentada da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

bilidade e conservação dos grãos de pólen da cultivar BRS Ybaté (*Urochloa brizantha*). Grãos de pólen recém coletados foram desidratados em soluções saturadas (75%) de cloreto de lítio (LiCl) e sílica gel (SiO₂), durante 30 e 60 minutos à temperatura de 25°C. Em seguida, foram colocados em cápsulas de gelatina, estocados em tubos de polipropileno e armazenados em geladeira (4°C) (GE), freezer (-20°C) (FR) ou ultrafreezer (-80°C) (UF) por 30, 60, 90 ou 180 dias. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Foram capturadas imagens em fotomicroscópio óptico de pelo menos 20 campos de visão para cada tratamento e foram contadas cerca de 300 células ao acaso. O controle correspondeu aos grãos de pólen que não foram submetidos à desidratação nem ao armazenamento. A avaliação da viabilidade de pólen foi realizada utilizando-se a coloração com carmim propiônico 1%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, para cada tratamento, dentro de cada período de armazenamento. As análises estatísticas e a representação gráfica das correlações de Pearson entre todos os tratamentos e a análise multivariada de componentes principais (PCA) foram realizadas usando o software PAleontological STatistics versão 3. No presente estudo observou-se que grãos de pólen recém coletados, não desidratados e não conservados apresentaram 79% de viabilidade polínica. O tempo de armazenamento afetou a viabilidade dos grãos de pólen e a utilização de solução saturada de cloreto de lítio, por 30 minutos para dessecação proporcionou maior viabilidade polínica em todos os tempos de armazenamento. A maior viabilidade foi encontrada quando os grãos de pólen foram armazenados em geladeira (4°C) por 30 dias (77%). Após 60 e 90 dias, a utilização de cloreto de lítio, por 30 minutos, seguido pelo armazenamento no freezer (-20°C), possibilitou viabilidade polínica de 67% nos dois tempos de armazenamento. Após 180 dias, com esse mesmo tratamento para desidratação, observou-se 68% de viabilidade polínica no armazenamento em ultrafreezer (-80°C). O presente trabalho é pioneiro em lograr êxito em conservar pólen de *Urochloa* e verificar a viabilidade dos grãos de pólen conservados deste gênero.

Termos para indexação: viabilidade, conservação, grão de pólen, *Urochloa brizantha*, colorimetria.

Abstract – Planted tropical pastures correspond to approximately 154 million hectares in Brazil and about 80% of these are grasses of the genus *Urochloa* (sin. *Brachiaria*). This grass is originally from Africa, but arrived in Brazil in the last century and, around the 60s it was introduced to the Midwest region. From the 80s on, with the intensification of Embrapa's genetic improvement programs, increasingly productive cultivars were released. Most of its accessions are polyploid and its reproduction occurs preferentially by apomixis. In breeding programs for apomictic species, crosses are usually performed at the tetraploid level using a sexual parent as pollen recipient and an apomictic parent as donor. For such a crossing to occur it is necessary to have the synchronization of flowering between the parents. The viability of the pollen grain is paramount for these species, not only for the fertilization of the polar nuclei resulting in the formation of the endosperm and thus ensuring the viability of the seed, but also with regard to its dispersal, fitness and the survival of the next generation. Studies evaluating this viability after conservation are fundamental for breeding programs, since they may avoid the dependence of the natural synchronization of flowering on controlled hybridizations. The objective of the present work was to determine the appropriate conditions that provide longer viability and conservation of pollen grains of the cultivar BRS Ybaté (*Urochloa brizantha*). Newly collected pollen grains were dehydrated in saturated salts (75%) of lithium chloride (LiCl) and silica gel (SiO₂) for 30 and 60 minutes at a temperature of 25°C. Then, they were placed in gelatin capsules, stored in polypropylene tubes and stored in a refrigerator (4°C) (GE), freezer (-20°C) (FR) or ultrafreezer (-80°C) (UF) for 30,60, 90 or 180 days. The experiment was carried out in a completely randomized design. Optical photomicroscope images of at least 20 fields of view were captured for each treatment and about 300 cells were counted at random. The control corresponded to pollen grains that were not subjected to dehydration or storage. The evaluation of pollen viability was performed using 1% propionic carmine staining. The means were compared by Tukey's test at 5% probability for each treatment within each storage period. Statistical analyses and the graphical representation of Pearson's correlations between all treatments and multivariate principal component analysis (PCA) were performed using the software PAleontological STatistics version 3. In the present study, it was observed that freshly collected, non-dehydrated and non-conserved pollen grains presented 79% pollen viability. The storage time affected the viability of the pollen grains and the use of saturated lithium chloride solution for 30

minutes for desiccation provided greater pollen viability at all storage times. The highest viability was found when pollen grains were stored in a refrigerator (4°C) for 30 days (77%). After 60 and 90 days, the use of lithium chloride for 30 minutes, followed by storage in the freezer (-20°C) allowed pollen viability of 67% in both storage times. After 180 days, with this same treatment for dehydration, 68% of pollen viability was observed in ultrafreezer storage (-80°C). The present work is a pioneer in achieving success in conserving pollen of *Urochloa* and verifying the viability of the conserved pollen grains of this genus.

Index terms: viability, conservation, pollen grain, *Urochloa brizantha*, colorimetry.

Introdução

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 196,7 milhões de cabeças, e é um dos maiores produtores de carne bovina. Em 2021, a produção brasileira representou 13,66% de toda produção do planeta, e correspondeu a 9,2% das exportações do agronegócio nacional (ABIEC, 2022). De acordo com Gomes *et al.* (2017), estes dados refletem um elevado processo de desenvolvimento ocasionado pela adoção de novas tecnologias que elevou a produtividade e a qualidade do produto brasileiro.

A pecuária bovina é uma atividade importante na economia brasileira, promovendo a geração de empregos e movimentando a cadeia produtiva, sendo que a carne bovina é um dos principais produtos de exportação do país. As pastagens brasileiras tropicais cultivadas correspondem a aproximadamente 154 milhões de hectares (MAPBIOMAS, 2021). Sua qualidade pode influenciar diretamente na produtividade e eficiência da produção pecuária, além de impactar a sustentabilidade ambiental da atividade. Cerca de 80% destas pastagens são semeadas com gramíneas do gênero *Urochloa* (sin. *Brachiaria*). Esta planta, originária da África, chegou ao Brasil vinda das Guianas por volta 1952, quando o Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária Norte (IPEAN), localizado em Belém - PA, iniciou avaliações da sua utilização como forragem usando um acesso de *U. decumbens*. Porém, somente nos anos 60 com a introdução de *U. ruziziensis* e *U. brizantha* ocorreu sua expansão para todas as regiões do Brasil (Karia *et al.*, 2006). A partir dos anos 80, com a intensificação dos programas de melhoramento genético da Embrapa

Gado de Corte, foram sendo lançadas cultivares cada vez mais produtivas. A maioria dos acessos de *Urochloa* é poliploide e sua reprodução ocorre preferencialmente por apomixia, ou seja, a formação do embrião ocorre em um processo clonal derivado apenas de tecidos maternos (KARASAWA, 2009), não ocorrendo, portanto, a fusão de gametas e o embrião resultante possui o mesmo material genético da planta mãe.

O fato de possuir apenas genótipos apomíticos em uma coleção limita o avanço no programa de melhoramento (DINATO, 2016). A existência de poucos acessos sexuais, que foram poliploidizados artificialmente, permitiu as primeiras hibridações interespecíficas no programa de melhoramento deste gênero. Os cruzamentos são realizados usando-se um genitor sexual como receptor de pólen e um genitor apomítico como doador, desde que compatíveis quanto ao nível de ploidia e número básico de cromossomos. Para que tal cruzamento ocorra, é necessário que se tenha a sincronização do florescimento entre os genitores masculino e feminino. Portanto, estudos que avaliem a viabilidade de grãos de pólen após a conservação dos mesmos são fundamentais para os programas de melhoramento, já que têm como objetivo evitar a dependência da sincronização da floração em hibridações controladas, possibilitando a combinação entre alelos favoráveis (CARDOSO *et al.*, 2009).

A formação dos grãos de pólen se dá nas anteras onde ocorrem dois eventos: a microsporogênese, na qual a célula mãe do grão de pólen (microsporócito) passa pela meiose e, após a citocinese, dá origem a quatro grãos de pólen jovens. Cada um deles sofre uma mitose dando origem a duas células: núcleo vegetativo e germinativo. O segundo evento é a microgametogênese, onde somente o núcleo germinativo passa por uma segunda mitose originando duas células espermáticas (LORD; RUSSEL, 2002).

Na maioria das angiospermas e em todas as gimnospermas, o grão de pólen é disperso em estado imaturo sem a divisão do núcleo germinativo (SIDHU, 2019; FRANCHI *et al.*, 2011). Esse pólen é descrito como binucleado, e a finalização da divisão celular ocorre com o crescimento do tubo polínico. Em cerca de 30% das angiospermas, o pólen é disperso em desenvolvimento mais avançado, ou seja, após a segunda divisão mitótica, em que a célula germinativa dá origem a duas células espermáticas. Neste caso, o grão de pólen é classificado como trinucleado (IMPE *et al.*, 2020; PACINI; DOLFERUS, 2019; SIDHU, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2019; BREWBAKER, 1967).

O grão de pólen também é classificado como recalcitrante ou ortodoxo, dependendo da quantidade de água durante sua dispersão (FRANCHI *et al.*, 2011), sendo os binucleados frequentemente ortodoxos e dispersos com uma pausa parcial no seu desenvolvimento. Já os trinucleados são dispersos de forma recalcitrante, ou seja, com um teor maior de água. Nesse caso, o pólen já completou o processo de desenvolvimento e está pronto para polinizar (WILLIAMS; REESE, 2019; WILLIAMS; BROWN, 2018). De acordo com Dafni e Firmage (2000), o pólen trinucleado tem menor potencial de viabilidade do que o pólen binucleado, apresentando-se 30% mais hidratado e é metabolicamente mais ativo, possui uma exina mais delgada e diminuição do nível de reservas nutricionais após a segunda divisão mitótica (WILLIAMS; BROWN, 2018).

Na família Poaceae, a maioria das espécies possui pólen trinucleado (MCCORMICK, 1993; KAPIL; BHTNAGAR, 1991), que é menos resistente às intempéries ambientais, do que o binucleado, possuindo menor longevidade sob condições naturais, sendo mais sensível ao dessecamento (WILLIAMS; BROWN, 2018). Na abertura da flor, o grão de pólen é totalmente viável e, com o passar do tempo, sua viabilidade diminui gradualmente, reduzindo a eficiência da fertilização (SOUZA *et al.*; 2002).

A estimativa da viabilidade do grão de pólen permite inferir sobre a capacidade de germinação e de desenvolvimento dos mesmos (STANLEY; LINSKENS, 1974). Existem vários fatores que contribuem para esta viabilidade durante o armazenamento, além dos genéticos e fisiológicos, porém a umidade e a temperatura são os mais importantes (GANESHAN *et al.*, 2008). A diminuição da temperatura e da umidade promove a redução da atividade metabólica no interior do grão de pólen e a ação de microrganismos (GODDARD; MATTHEWS, 1981).

O controle da umidade no interior do grão de pólen é um dos principais fatores a ser observado para sua conservação a longo prazo, quando se utiliza baixas temperaturas: quanto menor a quantidade de água no interior da célula, menor a probabilidade da formação de cristais de gelo. Caso estes se formem ocorre o rompimento da membrana celular, destruindo a célula. De acordo com Sprague e Johnson (1977), para se manter o pólen viável sob conservação, sua umidade relativa deve estar em torno de 10%.

A utilização de agentes com propriedades higroscópicas em um ambiente fechado e com temperatura constante é ideal para que ocorra a dessecação

dos grãos de pólen, sendo que muitas substâncias são utilizadas para esta finalidade. Dentre elas tem-se a sílica gel (SiO_2), que é um produto sintético em forma de grânulos, formados por uma reação entre silicato de sódio e ácido sulfúrico. Estes removem a umidade ao seu redor, retendo o vapor de água do ar em sua superfície (JOSÉ *et al.*, 2009), e após a adsorção, podem ser reativados através do calor, fazendo com que a água retida evapore para serem utilizados novamente. As soluções salinas saturadas também são muito utilizadas para a dessecação, pois mantêm a umidade relativa constante na atmosfera ao seu redor, proporcionam pressão de vapor constante quando usadas em recipientes fechados, a uma determinada temperatura (HAY *et al.*, 2008). A solução saturada de cloreto de lítio (LiCl), de acordo com Connor e Towill (1993) possui umidade relativa em torno de 11 a 15%, dependendo da temperatura utilizada no momento da desidratação. Já a sílica gel (SiO_2) apresenta 10% umidade relativa quando em um ambiente fechado (ALMEIDA *et al.*; 2011; YOUNG, 1967; WINSTON; BATES; 1960).

Existem vários métodos para se determinar a viabilidade do grão de pólen, os colorimétricos, a germinação *in vitro*, a germinação *in vivo* e a verificação da porcentagem de frutificação efetiva (ALMEIDA *et al.*, 2011; EINHARDT *et al.*, 2006). Os métodos colorimétricos são mais atrativos por proporcionarem resultados mais rápidos e apresentarem baixo custo (TECHIO *et al.*, 2006). Vários corantes são utilizados para esta finalidade incluindo o uso deorceína acética, carmim acético e propiônico, coloração de Alexander, iodo de lugol, fucsina básica, 2,3,5- cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) e Sudão IV (MUNHOZ *et al.*, 2008; ALEXANDER, 1980). Estes corantes reagem com os componentes celulares dos grãos de pólen maduros, resultando em mudanças de coloração e assim permitem distinções entre grãos viáveis e inviáveis (ABDELGADIR *et al.*, 2012).

Vários trabalhos têm sido realizados utilizando-se corantes para determinar a viabilidade de grãos de pólen recém coletados em diversas espécies tais como: *Vochysia divergens* (ZORTÉA *et al.*, 2022), *Annona squamosa* (ARAÚJO *et al.*, 2021), *Paspalum rawitscheri* (DE FREITAS *et al.*, 2020), *Bixa orellana* (FURINI *et al.*, 2020a) *Chenopodium ambrosioides* (FURINI *et al.*, 2020b) *Zantedeschia* spp (LI *et al.*, 2020), *Castanea mollissima* e *Castanea henryi* (LUO *et al.*, 2020), *Solanum melongena* (VALADARES *et al.*, 2019), *Bauhinia forficata* (CAPITANI *et al.*, 2018), feijão fava (*Phaseolus lunatus*) (JESUS, *et al.*, 2018), *Costus spiralis* (SANTOS *et al.*, 2018), *Psidium guahava* (DA SILVA *et al.*, 2017) e em pólenes

sob diversas condições de armazenamento, *Fraxinus Excelsior* (BUCHNER *et al.*, 2022), cultivares de maçãs servias (CALI *et al.*, 2021), *Hippeastrum* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2019), *Ochroma pyramidale* (ZAMBRANO *et al.*, 2019), *Paspalum* (DINATO *et al.*, 2018), *Leonurus cardiaca* (SHEKARI *et al.*, 2016), *Nothofagus alpina* (GARCÍA-CRUZATTY *et al.*, 2015), *Zea mays* (ALMEIDA, *et al.*, 2011) e *Panicum virgatum* (GE *et al.*, 2011).

É possível estabelecer o período máximo de conservação da viabilidade do grão de pólen (WANG *et al.*, 2015), porém de acordo com Rocha *et al.* (2023), o método e período de armazenamento irão depender do objetivo do trabalho e da viabilidade polínica expressa durante o período de armazenamento.

A possibilidade de realizar cruzamentos entre espécies que possuem floração assincrônica permite aumento na diversidade genética e, contribui para o avanço no programa de melhoramento genético das espécies, especialmente na obtenção de híbridos intra e interespecíficos (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi determinar as condições adequadas que proporcionem maior tempo de viabilidade e conservação dos grãos de pólen de *U. brizantha* cv. Ybaté.

Material e métodos

Coleta

Para a realização deste trabalho, foi utilizada a espécie *U. brizantha* cv. Ybaté, que possui florescimento tardio em relação a outras espécies deste gênero. As inflorescências foram colhidas à tarde, no dia anterior à deiscência das anteras e colocadas em copos plásticos com água, dentro do laboratório de Citogenética Vegetal da Embrapa Gado de Corte, em cima de uma mesa forrada com papel pardo. Na manhã seguinte, após a deiscência das anteras, as inflorescências foram levemente agitadas, induzindo à liberação do pólen. Com o uso de um pincel de cerdas grossas, as amostras de grãos de pólen foram colocadas em placas de Petri.

Desidratação de grãos de pólen por meio de sais saturados

Grãos de pólen recém coletados foram desidratados em sais saturados (75%) de cloreto de lítio (LiCl) e sílica gel (SiO_2), de acordo com Dinato (2016), durante 30 e 60 minutos à temperatura de 25°C (Figura 1A). Em seguida, foram colocados em cápsulas de gelatina (Figuras 1B e C), estocadas em tubos de polipropileno (Figura 1D) e, posteriormente, armazenados em geladeira (4°C) (GE), freezer (-20°C) (FR) ou ultrafreezer (-80°C) (UF) por 30, 60, 90 ou 180 dias.

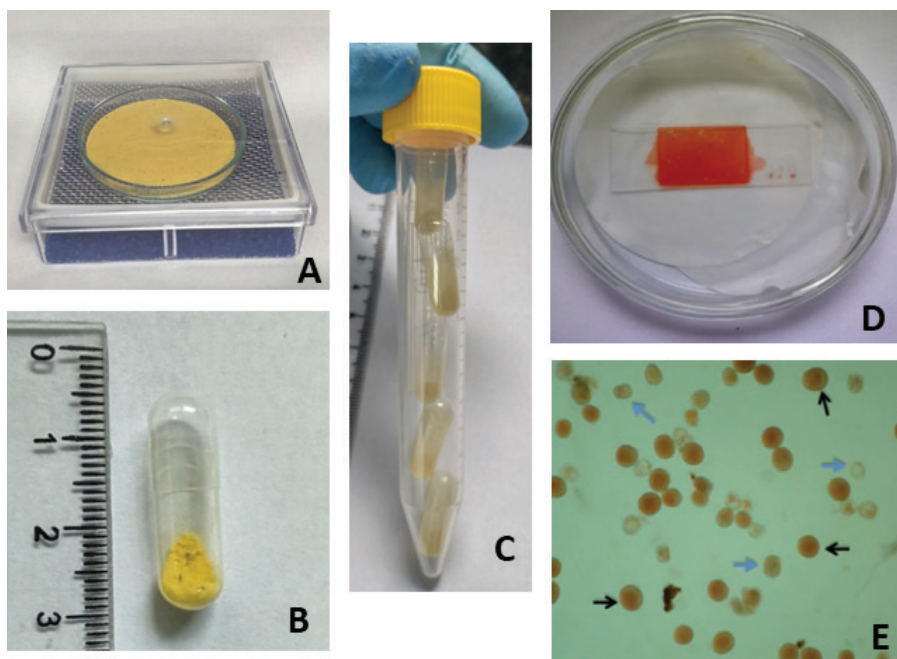


Figura 1. A) Grãos de pólen de *Urochloa brizantha* cv. Ybaté recém coletados sendo desidratados em sílica gel (SiO_2); B) Grãos de pólen desidratados encapsulados em cápsulas de gelatina, C) Grãos de pólen desidratados encapsulados e armazenados em tubo de polipropileno; D) grãos de pólen após o armazenando sendo corados em solução de carmim propiônico 1%; E) Visualização em fotomicroscópio óptico (seta preta: grãos de pólen viáveis, seta azul: grãos de pólen inviáveis).

O experimento foi realizado (sem repetições) em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com dois agentes de desidratação, dois tempos de exposição, três condições de armazenamento e quatro tempos de armazenamento (Tabela 1). Cada tratamento teve a contagem de aproximadamente 300 células ao acaso, em 20 campos aleatórios. O controle corresponde aos grãos de pólen que não foram submetidos à desidratação nem ao armazenamento, ou seja, que foram recém-colhidos na inflorescência.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para desidratação e armazenamento de grãos de pólen de *Urochloa brizantha* (cv. Ybaté).

	LiCl 30min	LiCl 60min	SiO ₂ 30min	SiO ₂ 60min
GE 30 dias	X	X	X	X
FR 30 dias	X	X	X	X
UF 30 dias	X	NA	X	X
GE 60 dias	X	X	X	X
FR 60 dias	X	X	X	X
UF 60 dias	X	X	X	X
GE 90 dias	X	X	X	X
FR 90 dias	X	X	X	X
UF 90 dias	X	X	NA	NA
GE 180 dias	X	X	X	X
FR 180 dias	X	X	X	X
UF 180 dias	X	NA	X	X

LiCl – cloreto de lítio; SiO₂ – sílica gel; GE – geladeira; FR – freezer; UF – ultrafreezer; NA - não avaliado.

Avaliação da viabilidade de pólen

Para a avaliação da viabilidade de pólen, as amostras foram colocadas em uma lâmina e, em seguida, foi realizada a coloração com solução de carmim propiônico 1%, colocando-se uma gota do corante sobre o material e colada uma lamínula. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma caixa de gerbox com papel filtro umedecido e armazenadas em estufa a 27°C por duas horas (Figura 1E).

As estimativas de viabilidade de pólen foram calculadas de acordo com Santos-Neto *et al.* (2006) onde:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{\text{número de grão de pólen corados}}{\text{número total de grãos de pólen}} \times 100$$

Foram capturadas imagens em fotomicroscópio óptico e foram considerados viáveis os grãos de pólen que se apresentavam bem desenvolvidos e inteiramente corados; e inviáveis quando os grãos de pólen que se apresentavam mal desenvolvidos ou parcialmente corados (Figura 1F).

Análise estatística

Com base nas porcentagens de viabilidade polínica de cada tratamento foi realizada a análise de variância. As médias, entre tratamentos, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, dentro de cada período de armazenamento. Todas as análises estatísticas, representação gráfica das correlações de Pearson entre todos os tratamentos e análise de componentes principais (PCA) foram realizadas usando o software PAleontological STatistics versão 3 (PAST 3) ($p < 0,05$) (HAMMER, 2017).

Resultados

Em análise exploratória dos dados, verificou-se que após o período de 180 dias de armazenamento, independente do sal e do tempo de exposição utilizados para a desidratação dos grãos de pólen e do local de armazenamento, a viabilidade, na maioria dos tratamentos, decresceu com o passar dos dias (Figura 2), sendo que os maiores desvios padrão foram observados no ultrafreezer após 90 e 180 dias (Figura 2).

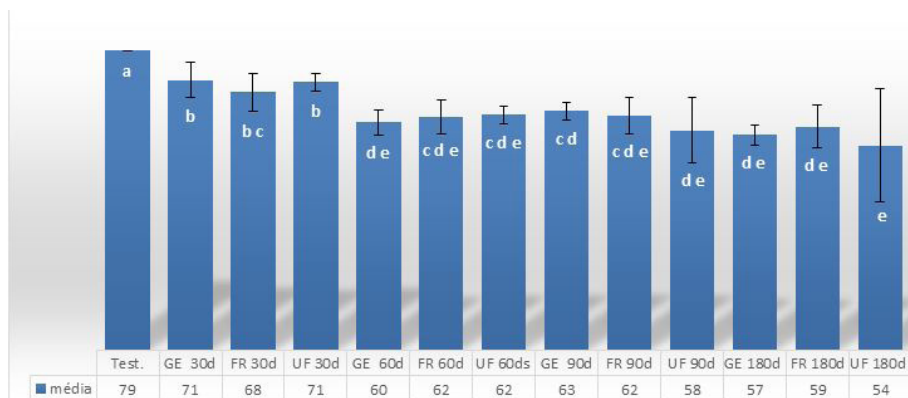


Figura 2. Dados exploratórios mostrando a porcentagem de grãos de pólen viáveis de *Urochloa brizantha* cv. Ybaté e seus respectivos desvios padrão após 30, 60, 90 e 180 dias de armazenamento. GE – geladeira (4°C); FR – freezer (-20°C); UF – ultrafreezer (-80°C). (Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade)

Nos tratamentos com tempo de armazenamento de 30 dias verificou-se que tanto a sílica gel como o cloreto de lítio utilizados por 30 e 60 minutos para desidratação dos grãos de pólen, seguidos pelo armazenamento nos diversos locais, possibilitaram taxas de viabilidade polínica superiores a 65% (Tabela 2). Estes sais apresentaram diferenças estatísticas significativas para o tempo de desidratação de 30 minutos em relação à testemunha e entre as condições de armazenamento. A maior viabilidade polínica (77%) foi evidenciada para o armazenamento por 30 dias, após dessecação em cloreto de lítio, por 30 minutos e armazenamento em geladeira.

Com 60 dias, os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas para os dois tempos de desidratação utilizados em relação à testemunha. Já para ambos os sais desidratantes, não foi observada significância estatística entre as condições de armazenamento (Tabela 3). Observou-se que a porcentagem de viabilidade polínica ficou entre 56 e 67% e que a utilização do cloreto de lítio durante 30 minutos para desidratação seguido por armazenamento no freezer (-20°C), possibilitou maior viabilidade polínica (67%) para este período, não diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 3).

Aos 90 dias de armazenamento foram observadas diferenças estatísticas significativas para os dois tempos de desidratação e sais utilizados em relação à testemunha, não sendo observada diferença estatística significativa entre as condições de armazenamento (Tabela 4). A porcentagem de viabilidade polínica variou de 52 e 67%, e o tratamento utilizando o cloreto de lítio durante 30 minutos para desidratação, seguido por armazenamento no freezer (-20°C), foi estatisticamente o melhor (Tabela 4).

Com 180 dias de armazenamento observaram-se diferenças estatísticas significativas tanto em relação a testemunha quanto ao modo de armazenamento, para ambos os tempos de desidratação, e para os dois sais utilizados. (Tabela 5). A utilização do cloreto de lítio durante 30 minutos para desidratação seguido por armazenamento no ultrafreezer (-80°C) possibilitou maior conservação da viabilidade polínica para este período (68%), sendo que esta não diferiu estatisticamente da testemunha.

Observando a Figura 3, onde se tem o ranking dos tratamentos, pode-se observar que a viabilidade do pólen recém-colhido foi de 79%, sendo precedido pelos diversos tratamentos com tempo de armazenamento de 30 dias. A utilização do cloreto de lítio durante 30 minutos para desidratação, seguido

por armazenamento no ultrafreezer (-80°C), por 180 dias, se destacou em sétimo lugar neste ranking (Figura 3). Este resultado é importante, pois demonstra a possibilidade de se obter boa viabilidade polínica, mesmo após longos períodos de armazenamento, permitindo cruzamentos entre espécies assincrônicas. Porém, por se tratar de um estudo inicial, este deve ser repetido para se ter a confirmação deste percentual de viabilidade.

Tabela 2. Viabilidade do pólen de *Urochloa brizantha* cv. Ybaté conservado, em porcentagem, após diferentes modos e tempos de desidratação, e diferentes condições de armazenamento por um período de 30 dias, em relação à testemunha não tratada e não armazenada.

Sal desidratante	Tempo (min)	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)	Ultrafreezer (-80°C)	Testemunha TA
Cloreto de Lítio (LiCl)	30	77aA	65bB	72aA	79a
	60	73aA	68aA	NA	79a
Média		75	66,5	-	
Sílica gel (SiO ₂)	30	67bB	74aA	72aA	79a
	60	68aA	NA	68aA	79a
Média		67,5	-	70	

*Tratamentos com letras iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) (letra minúscula em relação à testemunha; letra maiúscula em relação as condições de armazenamento). NA: não avaliado.

Tabela 3. Viabilidade do pólen *Urochloa brizantha* cv. Ybaté conservado, em porcentagem, após diferentes modos e tempos de desidratação, e diferentes condições de armazenamento por um período de 60 dias, em relação à testemunha não tratada e não armazenada.

Sal desidratante	Tempo (min)	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)	Ultrafreezer (-80°C)	Testemunha TA
Cloreto de Lítio (LiCl)	30	59bA	67aA	62bA	79a
	60	62bA	59bA	62bA	79a
Média		60,5	63	62	
Sílica gel (SiO ₂)	30	56bA	63bA	59bA	79a
	60	63bA	57bA	65bA	79a
Média		59,5	60	62	

*Tratamentos com letras iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) (letra minúscula em relação à testemunha; letra maiúscula em relação as condições de armazenamento). NA: não avaliado.

Tabela 4. Viabilidade do pólen *Urochloa brizantha* cv. Ybaté conservado, em porcentagem, após diferentes modos e tempos de desidratação, e diferentes condições de armazenamento por um período de 90 dias, em relação à testemunha não tratada e não armazenada.

Sal desidratante	Tempo (min)	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)	Ultrafreezer (-80°C)	Testemunha TA
Cloreto de Lítio (LiCl)	30	64bA	67aA	64bA	79a
	60	63bA	56bA	52bA	79a
Média		63,5	61,5	58	
Sílica gel (SiO ₂)	30	59bA	64bA	NA	79a
	60	63bA	60bA	NA	79a
Média		61	62	NA	

*Tratamentos com letras iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) (letra minúscula em relação à testemunha; letra maiúscula em relação as condições de armazenamento). NA: não avaliado.

Tabela 5. Viabilidade do pólen de *Urochloa brizantha* cv. Ybaté conservado, em porcentagem, após diferentes modos e tempos de desidratação, e diferentes condições de armazenamento por um período de 180 dias, em relação à testemunha não tratada e não armazenada.

Sal desidratante	Tempo (min)	Geladeira (4°C)	Freezer (-20°C)	Ultrafreezer (-80°C)	Testemunha TA
Cloreto de Lítio (LiCl)	30	53bB	61bA	68aA	79a
	60	58bA	53bB	NA	79a
Média		55,5	57	-	
Sílica gel (SiO ₂)	30	57bA	56bA	55bA	79a
	60	59bA	66bA	39bB	79a
Média		58	61	47	

*Tratamentos com letras iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) (letra minúscula em relação à testemunha; letra maiúscula em relação as condições de armazenamento). NA: não avaliado.

A matriz de correlação apresentada na Figura 4 mostra graficamente os resultados evidenciados para as combinações de tratamentos. Observa-se na figura que as correlações de maior magnitude (pelo traçado da linha interna) e que equivaleram a valores de correlação maiores do que 0,90 nas estimativas, ocorreram invariavelmente entre os tratamentos armazenados por 60 dias, independentemente do modo de armazenamento, do dessecante utilizado e do tempo de dessecação. As médias de viabilidade dos grãos de pólen armazenados por 30 dias foi de 63%, armazenados por 60 dias foi de 61,2%, por 90 dias, de 60,1% e por 180 dias, de 58,8%.

O número de dias de armazenamento é, em média, o fator determinante para a eficiência do método de conservação de pólen de *Urochloa* spp. e independe do dessecante utilizado, do tempo de dessecação e do modo de armazenamento. Tal resultado fica explícito no gráfico do PCA apresentado na Figura 5, no qual os dados médios de sobrevivência dos grãos de pólen foram inicialmente separados em uma tabela de dupla entrada, calculando-se a média do modo de armazenamento e o tempo (GE30dias, FR30dias, UF30dias...), em função do modo e o tempo de dessecação (LiCl30min, LiCl60min, SiO₂30min e SiO₂60min). No PCA evidencia-se que os dois primeiros componentes principais explicaram 62% e 19% da variação evidenciada entre os tratamentos. Ademais, observou-se que nos dois quadrantes à direita encontram-se os tratamentos que foram armazenados por 30 dias, com maior taxa de sobrevivência, independentemente do dessecante e do seu tempo de uso, bem como dos modos de armazenamento. O único resultado divergente foi aquele evidenciado para os grãos de pólen dessecados no tratamento com LiCl por 30 minutos e armazenados em ultrafreezer por 180 dias. Certamente esse resultado precisa ser novamente investigado.

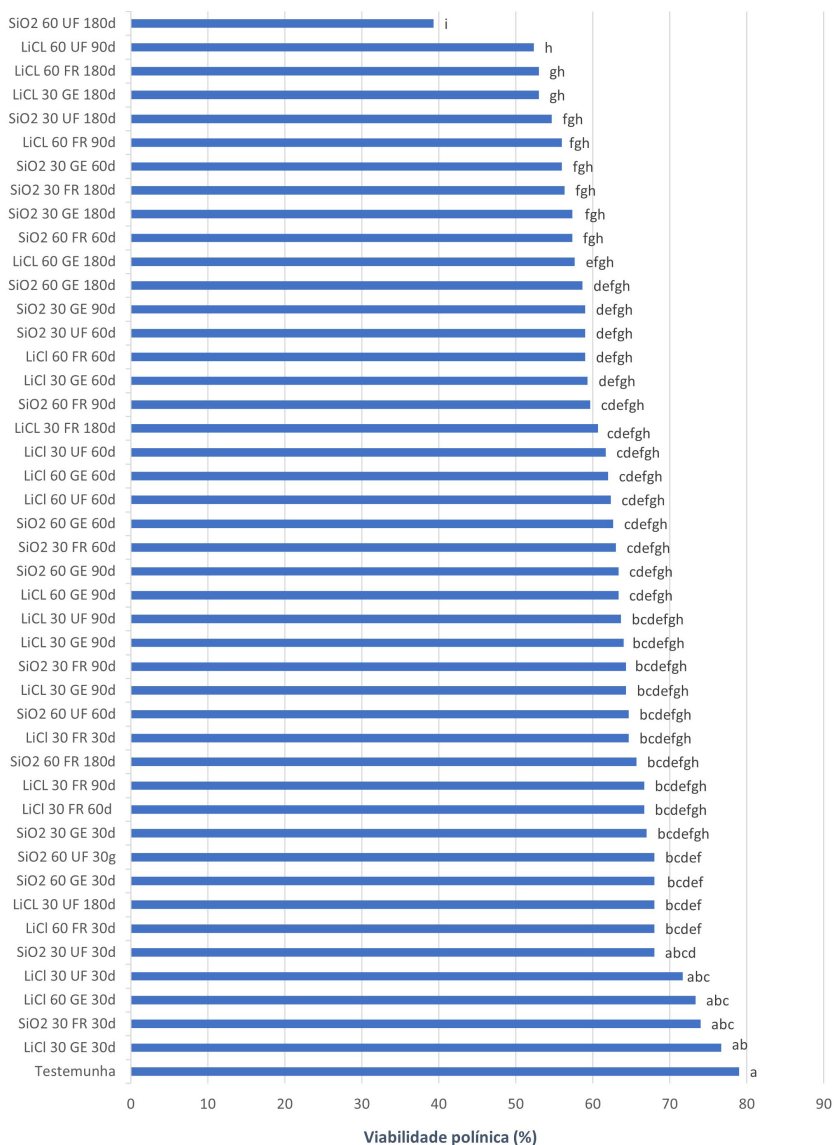


Figura 3. Porcentagem de viabilidade polínica de *U. brizantha* cv. Ybaté conservados em diferentes locais por 30, 60, 90 e 180 dias, separado por tempo de armazenamento. LiCl: cloreto de lítio; SiO₂: sílica gel; desidratação por 30 ou 60 minutos, respectivamente; armazenamento em GE – geladeira (4°C); FR – freezer (-20°C) ou UF – ultrafreezer (-80°C). (Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo Teste de Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade).

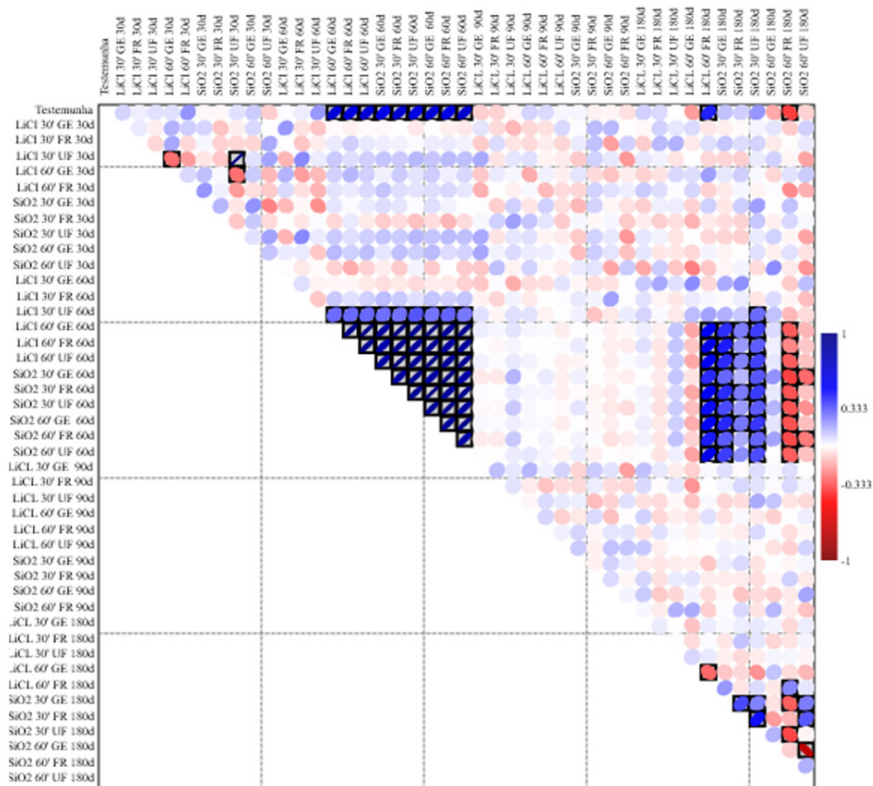


Figura 4. Matriz de correlação entre os tratamentos utilizados para conservação da viabilidade em grãos de pólen de *Urochloa brizantha* cv. Ybaté. Os contornos quadrados em preto em alguns quadrantes indicam as correlações significativas. As correlações podem variar de -1 a +1, num gradiente de cor vermelho (-1) a azul escuro (+1), ademais, o formato do símbolo colorido nos quadrantes também indica se a correlação foi altamente significativa, pelo símbolo estreito, seja positiva (azul) ou negativa (vermelho), ou com significância menor, com símbolo mais ovalado e informação idêntica quanto às cores, se positiva ou negativa.).

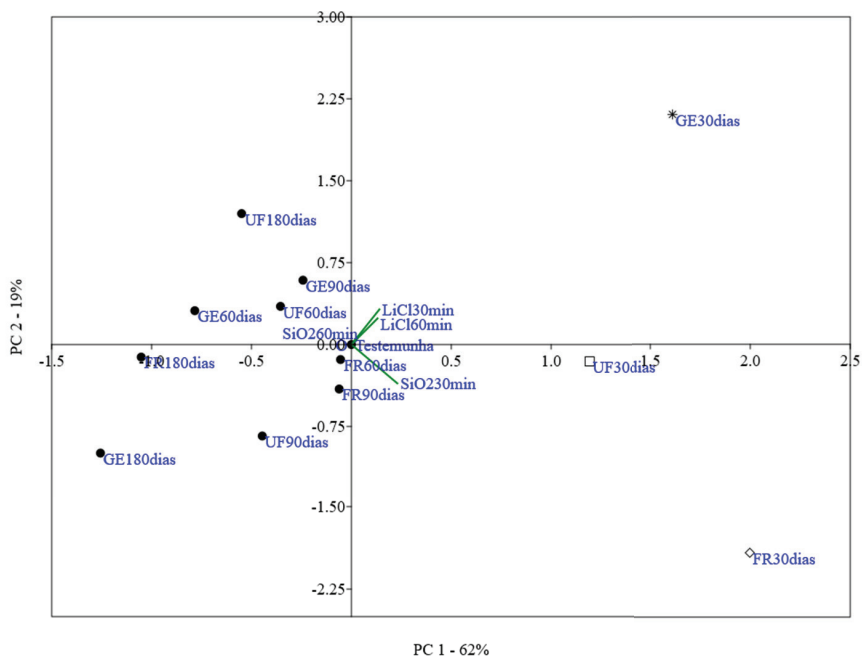


Figura 5. Biplot dos dois primeiros componentes principais dos tratamentos utilizados na conservação do pólen de *U. brizantha* cv. Ybaté, apresentados separadamente por modo e número de dias de armazenamento e método e tempo de dessecação. Os tratamentos com maior taxa de sobrevivência, apontados pelas setas verdes, são representados por símbolos: FR30dias (losango), UF30dias (quadrado) e GE30dias (asterisco), nos quadrantes do lado direito do gráfico.

Discussão

A viabilidade do grão de pólen é primordial para as espécies, no que diz respeito a sua dispersão, aptidão e à sobrevivência da próxima geração. Estudos que avaliem esta viabilidade após a conservação são fundamentais para os programas de melhoramento, já que poderão evitar a dependência da sincronização da floração em hibridações controladas.

Nas espécies do gênero *Urochloa* (sin. *Brachiaria*), a maioria dos indivíduos é poliploide e se reproduz por apomixia. Esta poliploidia pode influenciar na ocorrência de anormalidades meióticas, que podem interferir na viabilidade do pólen e, conseqüentemente, na produção de sementes (RAGALZI *et al.*, 2019b; RAGALZI *et al.*, 2021). Em *Urochloa*, diversos estudos já comprovaram que a poliploidia pode acarretar irregularidades meióticas (RAGALZI *et al.*, 2021; SALES *et al.*, 2021; RAGALZI *et al.*, 2019a; RAGALZI *et al.*, 2019b; SOUZA; VALLE, 2015). Baldissera *et al.* (2020), estudando híbridos sexuais e apomíticos de *U. decumbens*, relataram que a presença de anormalidades meióticas nas tétrades pode promover queda na viabilidade polínica nos indivíduos poliploides.

No presente estudo observou-se que grãos de pólen recém coletados e não conservados apresentaram 79% de viabilidade polínica, fato que pode indicar que para o genótipo em estudo a poliploidia não está interferindo na viabilidade do pólen. Souza *et al.* (2002), estudando maracujazeiro estimou que, valores abaixo de 30% são considerados como baixa viabilidade, entre 31 a 69% como média e acima de 70% alta.

Vários estudos têm sido realizados em espécies de *Urochloa* com grão de pólen frescos, ou seja, recém coletados. Araújo *et al.* (2007), estudando plantas sexuais diploides de *U. brizantha*, observaram entre 80 a 84% de viabilidade dos grãos de pólen. Já Simioni e Valle (2011), analisando tetraploides sexuais artificiais de *U. decumbens*, verificaram uma média de 63%. Souza (2013) avaliou híbridos intraespecíficos poliploides de *U. decumbens* e, encontrou taxas de pólenes inviáveis maiores que 80%. De Paula *et al.* (2014), em seus estudos com progênies de *U. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente verificaram que estas apresentaram viabilidade polínica entre 76,8% a 99,6%.

Lima *et al.* (2020), em estudos sobre o efeito do manejo quanto ao crescimento, em diferentes épocas de uniformização na cv BRS Paiaguás (*U. brizantha*), verificaram que plantas não manejadas apresentaram melhor quantidade e viabilidade de pólen, e que fatores ambientais, como precipitação e temperatura promovem alteração nesta viabilidade.

Ragalzi *et al.* (2019b) avaliaram o comportamento meiótico e a viabilidade polínica de oito híbridos sexuais poliploides de *Urochloa*, pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Gado de Corte. Observaram que a

viabilidade variou de 38,37% a 64,89% entre os híbridos estudados concluindo que a alta frequência de irregularidades na meiose afetou a viabilidade polínica e, como consequência, a produção de sementes puras.

Estudos visando a conservação polínica, além de permitirem o cruzamento de espécies com floração assíncrona, são importantes para o intercâmbio de germoplasma e a conservação do mesmo. No presente trabalho verificou-se uma queda gradual da viabilidade polínica após 180 dias, independente do sal, do tempo de exposição utilizado para a desidratação e do local de armazenamento (Figuras 2 e 3). Esta queda já era esperada, pois sabe-se que, com o passar do tempo, os grãos de pólen vão perdendo seu vigor, fato que ocorre devido a vários fatores extrínsecos ou intrínsecos, de forma variável dependendo da planta estudada (SOUZA et al., 2022; GANESHAN et al., 2008)

Damayanti et al. (2021), estudando *Aeschynanthus radicans*, uma espécie trepadeira, verificaram que com o armazenamento do pólen a -20°C ocorreu decréscimo da viabilidade polínica após 77 dias. Ge et al. (2011), estudando viabilidade e longevidade de grão de pólen em *Panicum virgatum*, verificaram que o aumento da temperatura e radiação ultravioleta B afetaram negativamente a viabilidade e longevidade do pólen desta espécie, enquanto a umidade relativa teve impacto limitado. Zambrano et al. (2019), estudando pólen da espécie madeireira *Ochroma pyramidale*, verificaram que sua viabilidade diminuiu rapidamente quando o armazenamento ocorre com alto teor de umidade, independentemente das temperaturas utilizadas.

A utilização de agentes que promovam a dessecação dos grãos de pólen se torna indispensável para a conservação dos mesmos, visto que estes vão permitir a maior viabilidade durante o armazenamento. De acordo com Benson (2008), a formação de cristais de gelo no interior das células por excesso de água promove injúrias físicas e mecânicas, levando-as à morte.

A Figura 3 mostra o ranking da porcentagem de viabilidade polínica envolvendo todos os tratamentos. Percebe-se que o cloreto de lítio por 30 minutos em um ambiente fechado parece ser o tratamento mais eficiente em todos os tempos de armazenamento. Estes dados corroboram os estudos realizados por Dinato et al. (2018) que, em um trabalho realizado com *Paspalum notatum*, observaram maiores valores de viabilidade polínica com a utilização de solução saturada de cloreto de lítio por 30 minutos, seguidos de armazena-

mento em nitrogênio líquido por 24 horas; e Dinato *et al.* (2020) verificaram que grãos de pólen de *P. malacophyllum* e *P. atratum* permaneceram viáveis após 12 meses quando desidratados com cloreto de lítio por 30 minutos e em sílica gel por 120 minutos seguidos por armazenamento em nitrogênio líquido.

No presente estudo verificou-se que após 180 dias de armazenamento, a viabilidade dos grãos de pólen que foram desidratados em cloreto de lítio durante 30 minutos, seguido pelo armazenamento em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C não apresentaram diferenças estatísticas com relação à testemunha, sendo este um resultado promissor, que será melhor investigado para que esta viabilidade polínica seja confirmada. De acordo com Godard e Matthews (1981), com a diminuição da temperatura e umidade ocorre redução na atividade metabólica no interior do grão de pólen e este fato proporciona maior longevidade. Vários estudos têm comprovado que armazenamento em baixas temperaturas proporcionam boas taxas de viabilidade polínica (ROCHA *et al.*, 2023; CALI *et al.*, 2021; DORDEVIC, *et al.*, 2022; DINATO, 2020).

Cali *et al.* (2021), estudando quatro cultivares de maçãs siberianas, verificaram que a viabilidade polínica foi mantida por 6 meses quando o pólen foi armazenado entre -20 e -80°C . Este longo período de viabilidade mostra que estas cultivares são adequadas para a maioria das aplicações do programa de melhoramento. Dordevic *et al.* (2022), em um estudo realizado para investigar o efeito de diferentes períodos de armazenamento e temperaturas sob a viabilidade polínica *in vitro* e *in vivo* em genótipos de ameixeira, verificaram que, ao final de 12 meses, a viabilidade dos pólenes armazenados a -20 , -80 e -196°C foi superior a 30%, e que estes resultados têm implicações direta no melhoramento da espécie. Rocha *et al.* (2023) verificaram que grãos de pólen de carnaúba (*Copernicia prumifera*) dessecados com sílica gel por 24 horas e armazenados em temperaturas entre 10°C e -4°C apresentaram menor perda de viabilidade do que os armazenados a 24°C , no decorrer de 170 dias.

O armazenamento adequado dos grãos de pólen é uma ferramenta fundamental, tanto para a preservação da variabilidade genética em programas de conservação *ex situ*, quanto para os programas de melhoramento genético, onde possibilita o cruzamento de espécies e/ou híbridos sem sincronia reprodutiva, de forma a permitir o acesso à variabilidade genética que seria impossível de ocorrer naturalmente, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genético.

O presente trabalho apresenta-se pioneiro por ser o primeiro a verificar a viabilidade polínica em grãos de pólen conservados de *Urochloa* spp., sendo apenas o começo para se ter um protocolo adequado de conservação de grãos de pólen deste gênero. Para tanto, é necessário intensificar as pesquisas focando em testes de germinação in vitro, in vivo, e por fim, a realização de cruzamentos intra e interespecíficos, para se verificar a capacidade dos grãos de pólen armazenados de gerar indivíduos oriundos de cruzamentos assistidos e o acompanhamento destes no campo, finalizando com a produção de sementes.

Conclusão

Com esse trabalho pode-se concluir que o tempo de armazenamento é o principal fator que afeta a viabilidade dos grãos de pólen.

A utilização de solução saturada de cloreto de lítio, por 30 minutos para dessecação dos grãos de pólen, proporcionou maior viabilidade polínica em todos os tempos de armazenamento.

O melhor tratamento para conservação polínica foi o que utilizou solução saturada de cloreto de lítio por 30 minutos e armazenamento em geladeira por 30 dias (77%).

O armazenamento dos grãos de pólen desidratados em solução saturada de cloreto de lítio, por 30 minutos, realizado em ultrafreezer à temperatura de (-80°C) permitiu manter a viabilidade acima de 65% aos 180 dias.

Referências

ABIEC. 2022. Perfil da Pecuária no Brasil – Beef Report 2022. Disponível em <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/> Acesso em 5 de fevereiro de 2023.

ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; STADEN, V. J. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany*, v. 79, n. 1, p.132-139. mar. 2012. DOI <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.10.005>

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology*, v. 55, n.1, p. 13-18. 1980. DOI: <https://doi.org/10.3109/10520298009067890>

ALMEIDA, C.; AMARAL, A. L. do; BARBOSA NETO, J. F.; SERENO, M. J. C. de M. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). *Revista*

Brasileira de Botânica, v. 34, n. 4, p. 493-497, dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042011000400003>

ALMEIDA, N. V. D.; SAZIKI, C. Y. N.; CARDOSO, J. C. Characterization of cultivars and low-temperature pollen grain storage in amaryllis (*Hippeastrum* sp.). **Revista Ceres**, v. 66, n. 6, p. 451-459. nov. dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-737X201966060006>

ARAÚJO, D. C. B.; CHAGAS, P. C.; CHAGAS, E. A.; MOURA, E. A.; DE OLIVEIRA, R. R.; TAVEIRA, D. L.; RIBEIRO, M. I.; GRIGIO, M. L. Flower stages, germination and viability of pollen grains of *Annona squamosa* L. in tropical conditions. **Acta Scientiarum Technology**, v. 43, e51013-e51013, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascitecnol.v43i1.51013>

ARAÚJO, A. C. G.; FALCÃO, R.; CARNEIRO, V. T. C. Seed abortion in the sexual counterpart of *Brachiaria brizantha* apomicts (Poaceae). **Sexual Plant Reproduction**, v. 20, n. 3, p.109-121, may. 2007. DOI 10.1007/s00497-007-0048-6

BALDISSERA, J. N. C.; MENDES, A. B. D.; COAN, M. M. D.; APARECIDA, C.; VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S. Selection based on meiotic behavior in *Urochloa decumbens* hybrids from non-shattered seed. **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, v. 8, n. 2, p. 133-140. may. 2020. DOI: [https://doi.org/10.17138/tgft\(8\)133-140](https://doi.org/10.17138/tgft(8)133-140)

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. *Plant cryopreservation: a practical guide*, Ed. REED, B. M. Corvallis, OR, USA. USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository. p.15-32, 2008. Disponível em <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-72276-4_2>

BREWBAKER, J. L. Distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in angiosperms. **American Journal of Botany**, v. 54, n. 9; p. 1069–1083, out. 1967. DOI <https://doi.org/10.2307/2440530>

BUCHNER, L.; EISEN, A.; SIKOPARIJA, B.; JOCHNER-OETTE, S. Pollen Viability of *Fraxinus excelsior* in Storage Experiments and Investigations on the Potential Effect of Long-Range Transport. **Forests**, v. 13, n. 4, 600, abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/f13040600>

CALI, D.; MILOJEVI, J.; BELI, M.; MILETI, R.; KORAC, S. Z. Impact of storage temperature on pollen viability and germinability of four Serbian autochthon apple cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v.12, article 709231, jul. 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.709231

CAPITANI, L. C.; ROVEDDER, A. P. M.; SILVA JÚNIOR J. C. C.; PECCATTI A. Pollen Viability and Autogamy Fitness in *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Floresta e Ambiente**, v. 25, n. 3, p. 1-8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.043316>

CARDOSO, R. D. L.; GRANDO, M. F.; BASSO, S. M. S.; SEGEREN, M. I.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. Caracterização citogenética, viabilidade de pólen e hibridação artificial em gérbera. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n.1, p.40-44, mar. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362009000100008>

CONNOR, F. K.; TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, v. 68, n. 1, p.77-84, apr. 1993.

DAMAYANTEU, F.; GARVITA, R. V.; WAWANGNINGRUM, H.; ERAHAYU, S. Flower development, pollen viability test and pollen storage of *Aeschynanthus* radicals. **Biodiversitas**, v.22, n. 4, p. mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220442>

DA SILVA, S. N.; SILVA, M. A.; DE SOUZA MARÇAL, T.; FERREIRA, A.; FONTES, M. M. P.; DA SILVA FERREIRA, M. F. Genetic parameters of pollen viability in guava (*Psidium guajava* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n.1, p. 1-8, jan. 2017. DOI: 10.21475/ajcs.2017.11.01.PNE91

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, n. 1-4, p. 113-132, 2000.

DE FREITAS, J. M. B.; KUHN, A. W.; FRESCURA, V. D. S.; ESSI, L.; TEDESCO, S. B. Differences in stomatal and pollen grain dimensions and pollen viability between *Paspalum rawitscheri* populations. **Ciência e Natura**, v. 42, e.46, p. 1-13, may. 2020. DOI: <https://doi.org/10.5902/2179460X40749>

DE PAULA, C. M. P.; TECHIO, V. H.; BENITES, F. R. G.; SOBRINHO, F. S. Viabilidade polínica intrainflorescência em acessos de *Brachiaria ruziziensis*. **Acta Scientiarum**, v. 36, n. 2, pg. 209-213, Apr. 2014.

DINATO, N. B.; SANTOS, I. R. I.; LEONARDECZ, E.; BURSON, B. L.; QUARÍN, C. L.; DE PAULA, A. F.; FÁVERO, A. P. Storage of bahiagrass pollen at different temperatures. **Crop Science**, v. 58, n. 6, p. 2391-2398, ago. 2018.

DINATO, N. B. Conservação a longo prazo de grãos de pólen de *Paspalum notatum* Fluggé visando o uso de espécies de florescimento assíncrono em programas de melhoramento genético. 114p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

DINATO, N. B.; SANTOS, I. R. I.; VIGNA, B. B. Z.; DE PAULA, A. F.; FÁVERO, A. P. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **CryoLetters**, v. 41, n. 3, p.115-127. 2020. Disponível em <<http://www.cryoletters.org/perspective-41-3-115-127-dinato.pdf>>

DORDEVIC, M.; VUJOVIC, T.; CEROVIC, R.; GLISIC, I.; MILOSEVIC, N.; MARIC, S.; RADICEVIC, S.; FOTIRIC AKSIC, M.; MELAND, M. *In Vitro* and *In Vivo* Performance of Plum (*Prunus domestica* L.) Pollen from the Anthers Stored at Distinct Temperatures for Different Periods. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 616, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070616>

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de Pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.

FRANCHI, G. G.; PIOTTO, B.; NEPI, M.; BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M.; PACINI, E. Pollen and seed desiccation tolerance in relation to degree of developmental arrest, dispersal and survival. **Journal Experimental Botany**, v. 62, n. 15, 5267–5281, nov. 2011. DOI: 10.1093/jxb/err154.

FURINI, T.; DE SOUZA PECEGUEIRO, M.; HERRMANN, F.; SILVA, J. C.; DE OLIVEIRA BARROS, J.; DE OLIVEIRA DOMINGUES, S. C.; KARSBURG, I. V. Métodos colorimétricos sob uso de reagentes sintéticos e alternativos para viabilidade polínica de *Bixa orellana* L. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, e330985817-e330985817, 2020a. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5817>

FURINI, T. DOMINGUES, S. C. O.; FERNANDOSCATOLA, L.; SCHMITT, J. P. M.; BARROS, J. O.; PECEGUEIRO, M. S.; KARSBURG, I. V. Estimativa de viabilidade polínica da *Chenopodium ambrosioides* L. através de métodos colorimétricos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 42386-42391. 2020b. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-014>

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. **Cryopreservation of pollen**. In: REED, B. M. (Ed.). *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, 2008. p. 443-447.

GARCÍA-CRUZATTY, L.; DROPELMANN, F.; RIVERO M. Effect of temperature and drying on the longevity of stored *Nothofagus alpina* pollen. **New Zealand Journal of Botany**, v. 53, n. 3, p.155-164. ago.2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/0028825X.2015.1045528>

- GE, Y.; FU, C.; BHANDARI, H.; BOUTON, J.; BRUMMER, E. C.; WANG, Z. Y. Pollen viability and longevity of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Crop Science**, v. 51, n. 6, p. 2698-2705, nov. 2011. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.01.0057>
- GODDARD, R. E.; MATTHEWS, F. R. Pollen testing. In: FRANKLIN, C. (Ed.) **Pollen management handbook**. Washington, EUA: USDA Forest Service, 1981. 98p. (Agriculture Handbook, 587).
- GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e qualidade da pecuária brasileira. Nota Técnica. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil. 2017.
- HAMMER, Ø. PALEontological STatistics Version 3.15. Reference manual. Natural History Museum. University of Oslo; 253 p. 2017.
- HAY, F.R.; ADAMS, J.; MANGER, K.; PROBERT, R. The use of non-saturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. **Seed Science and Technology**, v.36, n.3, p.737-746, out. 2008. DOI: <https://doi.org/10.15258/sst.2008.36.3.23>
- IMPE, D.; REITZ, J.; KOPNIC, C.; ROLLETSCHEK, H.; BORNER, A.; SENULA, A.; NAGEL, M.. Assessment of pollen viability for wheat. **Frontiers. Plant Science**, v.10, n.1, p. 1–13, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01588>
- JESUS, L. G. A.; TAVARES, L. R.; GOMES, M. F. C.; VALENTE, S. E. S.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A. C. A.; COSTA, M. F. Eficiência de testes colorimétricos para determinação da viabilidade do pólen em acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.8, n. 1, p. 59-64, mar. 2018. DOI <https://doi.org/10.21206/rbas.v8i1.43>
- JOSÉ, S.C.B.R.; SALOMÃO, A.N.; MUNDIM, R.C.; PÁDUA, J.G. Umidificação de sementes de girassol após ultrassecagem em sílica gel e câmara de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n. 3, p.16-26, 2009.
- KARASAWA, M.M.G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética – SBG, 2009. 113 p.
- KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAUJO, A. C. G. Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil. 2006. 56p. (Documentos/ Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 163).
- KAPIL, R. N.; BHATNAGAR, A. K. Embryological evidence in angiosperm classification and phylogeny. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 113, n. 2-3, p. 309-338. 1991.
- LI, Z.; G, Y.; ZHANG, Q.; WU, H. Identification of Pollen Vitality and Factors Influencing Storage Quality of *Zantedeschia* spp. **Chinese Journal of Tropical Crops**. v. 41, n. 1, p. 49-56, 2020. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2020.01.007
- LIMA, N. D.; VERZIGNASSI, J. R.; MAUAD, M.; COSTA, J. A. A.; LIBORIO, C. B.; SILVA, F. A. S.; VIEIRA, W. F. Florescimento, viabilidade e quantificação polínica em *Brachiaria brizantha* sob doses de boro e manejo de uniformização do crescimento. **Revista Agraria Academica**, v. 3, n. 1, p. 26-39, nov/dez. 2020. DOI: 10.32406/v3n62020/26-39/agrariacad.
- LORD, E. M.; RUSSELL, S. D. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 18, n. 1, p. 81-105, 2002. Disponível em <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.083438>
- LUO, S.; ZHANG, K.; ZHONG, W. P.; CHEN, P.; FAN, X. M.; YUAN, D. Y. Optimization of in vitro pollen germination and pollen viability tests for *Castanea mollissima* and *Castanea henryi*. **Scientia Horticulturae**, v. 271, 109481, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109481>

MAPBIOMAS. A *evolução* da pastagem nos últimos 36 anos. Destaques do mapeamento anual e qualidade de *pastagens* no Brasil entre 1985 a 2020 Coleção 6. https://mapbiomas-br-site.s3.amazonaws.com/Fact_Sheet_PASTAGEM_13.10.2021_ok_ALTA.pdf. 2021.

MCCORMICK, S. (1993). Male gametophyte development. **Plant Cell**, v. 5, n.1, p. 1265-1275, out, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1265>

MUNHOZ, M.; DA LUZ, C. F. P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; FERNANDA REINERT. Viabilidade polínica de Carica papaya L.: uma comparação Metodológica. **Brazilian Journal Botany**, v.31, n. 2, p. 209-214, 2008. DOI: 10.1590/S0100-84042008000200003

OLIVEIRA, M. S. P.; NAVEGANTES, P. C. A.; COSTA, L. R. J. Obtenção de pólen e polinização controlada em espécies do gênero Euterpe – Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 2019. 39 p. – (Documentos / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 450).

PACINI, E.; DOLFERUS, R. Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. **Frontiers in Plant Science**, v.10, article 679, may. 2019.

RAGALZI, C. M.; MENDES, A. B. D.; SIMEÃO, R. M.; VERZIGNASSI, J. R.; VALLE, C. B. DO; MACHADO, M. F. P. S. Microsporogenesis associated with seed yield in Urochloa sexual polyploid hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. e37652148-e37652148, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332021v21n4a57>

RAGALZI, C. M.; VALLE, C. B.; VERZIGNASSI, J. R.; MENDES, A. B. D.; MACHADO, M. F. P. S. Comportamento cromossômico na viabilidade polínica e na produção de sementes em híbridos sexuais de Brachiaria. In: 15ª Jornada Científica da Embrapa Gado de Corte, 2019, Campo Grande. Embrapa Gado de Corte - Resumo em anais de congresso (ALICE). Brasília: Embrapa, 2019a. v15. p. 18-19.

RAGALZI, C. M.; SANTOS, A. C. C.; SILVA, J. L.; SALES, G. L. M.; VALLE, C. B.; MENDES, A. B. D. Microsporogênese em híbridos sexuais de urochloa: eliminação de cromossomos através de micronúcleos e micrócitos. In: Anais Eletrônico do XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica. Anais. Maringá (PR) UNICESUMAR, 2019b. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/epcc2019/187950-MICROSPOROGENESE-EM-HIBRIDOS-SEXUAIS-DE-UROCHLOA--ELIMINACAO-DE-CROMOSSOMOS-ATRAVES-DE-MICRONUCLEOS-E-MICROCITOS>>. Acesso em: 09/05/2023

ROCHA, E. L. B.; SILVA, C.; DE CARVALHO, A. C.; DE FARIAS, D. T.; ARAUJO, P. C. D. Viabilidade e conservação de grãos de pólen da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Miller) HE More). **Avanços em Ciência Florestal**, v. 10, n. 1, p.1919-1927, mar. 2023.

SALES, G. L. M.; VIDAL, Í. J. A.; RAGALZI, C. M.; VOLPATO, N. S.; DA SILVA, J. L.; DO VALLE, C. B.; MENDES, A. B. D. Microsporogênese Em Híbridos Intraespecíficos Sexuais De U. Humidicola (Rendle) Morrone & Zuloaga [Syn. Brachiaria Humidicola (Rendle) Schweick.]. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 4, p. 37565-37575, abr. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n4-293

SANTOS, B. N. V.; MACEDO, W. A.; DAMASIO, J. F.; MELLO, V. S.; KARSBURG, I. V. Teste de coloração de grãos de pólen de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) para verificação de sua viabilidade. **Revista de Ciência Agroambiental**, v.16, n.2, p. 135-138, jan. 2018. DOI 10.5327/Z1677-606220191549.

SANTOS-NETO, O. D.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 4, n. 1, p.67-74, 2006.

- SHEKARI, A.; NAZERI, V.; SHOKRPOUR, M. Pollen viability and storage life in *Leonurus cardiaca* L. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 101-104, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.02.004>
- SIMIONI, C.; VALLE, C. B. Meiotic analysis in induced tetraploids of *Brachiaria decumbens* Stapf. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 43-49, mar. 2011.
- SIDHU, R. K. Pollen storage in vegetable crops: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n, 1S, p. 599-603, 2019. Disponível em: <<https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue1S/PartN/Sp-8-1-146-598.pdf>>
- SPRAGUE, J. R.; JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In Proceedings of 14 Southern Forest Tree Improvement Conference. Eastern Tree Seed, Macon, p.20-27. 1977
- SOUZA, C. G.; RAMOS, S. M. B.; NIETSCHKE, S.; POSSOBOM, C. C. F.; ALMEIDA, E. F. A.; PEREIRA, M. C. T. Viability of pollen grains and stigma receptivity in Desert Rose. **Ornamental Horticulture**, v. 28, n.1, p. 92-98.jan-mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v28i1.2402>
- SOUZA, V. F.; DO VALLE, C. B. Meiotic behavior of *Brachiaria decumbens* hybrids. **Genetics and Molecular Research**, n. 14, v. 4, p. 12855-12865, oct. 2015. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1040155/1/GenetocsandMolecularResearchv14n4p12855128652015.pdf>>
- SOUZA, V. F. **Microsporogênese e viabilidade polínica em híbridos de *Brachiaria decumbens* e seus genitores**. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. 64p. 2013.
- SOUZA, M. M. DE; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1209–1217, nov. 2002.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen: Biology Biochemistry and Management. Springer, Berlim. 1974 <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-65905-8>
- TECHIO, V. H.; DAVUDE, L. C.; PEDROSO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, v.28, n.1, p.7-12, jan./mar. 2006. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=187115870002>
- VALADARES, R. D. N.; LIMA, L. B. D.; NÓBREGA, D.A.; SILVA, J. A. D. S.; MENDES, A. Q.; COSTA, Í. J. N.; MENEZES, D. Pollen viability in eggplant using colorimetric and in vitro techniques. **Journal of Experimental Agriculture International**, v.32, n.1, p. 1-7, 2019. Disponível em: <https://journaljeai.com/index.php/JEAI/article/view/1311/2624>.
- WANG, L. W. U. J.; CHEN, J.; FU, D.; ZHANG, C.; CAI, C.; OU, L. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **Scientia Horticulturae**, v. 188, n. 4, p. 78-83. 2015. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.03.021.
- WILLIAMS, J. H.; BROWN, C. D. Pollen has higher water content when dispersed in a tricellular state than in a bicellular state. **Acta Botanica Brassilica**, v. 32, n.3, p.454-461, Sept. 2018. DOI: 10.1590/0102-33062018abb0129
- WILLIAMS, J. H.; REESE, J. B. (2019). "Chapter Twelve - Evolution of development of pollen performance. **Current Topics in Developmental Biology**, Ed. U. Grossniklaus (Cambridge: Academic Press), v. 131, p. 299–336, 2019. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.11.012

WINSTON, P. W.; BATES, D. H. Saturated Solutions for the Control of Humidity in Biological Research. **Ecology**, v. 41, p. 232-237, 1960. <http://dx.doi.org/10.2307/1931961>

YOUNG, J. F. Humidity and control in the laboratory using salt solutions. **Journal of Applied Chemistry**, London, v.17, p.170, Sep. 1967.

ZAMBRANO, I. J.; CRUZATTY, L. C. G.; OLAYA, J. C.; TORRES, R. V.; CANDÓ, M. C.

Condiciones óptimas para almacenamiento del polen de *Ochroma pyramidale*. **Bosque (Valdivia)**, v. 40, n. 2, p. 227-233, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002019000200227>

ZORTÉA, K. É. M.; ROSSI, A. A. B.; CORDEIRO, A. G. M.; SANDER, N. L.; CARDOSO, E. dos S.; SILVA, C. J. da . Morfologia polínica, índice meiótico e viabilidade polínica em indivíduos de *Vochysia divergens* Pohl. nativa da Amazônia e do Pantanal. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 11, n. 4, p. e51511427540, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i4.27540. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27540>. Acesso em: 9 mai. 2023.

Embrapa

Gado de Corte



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA
E PECUÁRIA

