Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 87
ISSN 1678-1961
Dezembro, 2014

Armazenamento de Pólen de Cana-de-açúcar para Cruzamentos entre Genitores Assíncronos

Embrapa

ISSN 1678-1961

Dezembro, 2014

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 87

Armazenamento de Pólen de Cana-de-açucar para Cruzamentos entre Genitores Assíncronos

Adriane Leite do Amaral
Tassiano Maxwell Marinho Câmara
João Messias dos Santos
Luiz Sérgio Costa Duarte Filho
Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE
2014

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250
49025-040 Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.cpatc.embrapa.br
www.embrapa.com.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*
Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Alexandre Nízio Maria, Ana da Silva Lédo, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Josué Francisco da Silva Junior, Julio Roberto de Araujo Amorim, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*
Normalização bibliográfica: *Lucidalva Ribeiro G. Pinheiro*
Editoração eletrônica: *Arthur Henrique Costa Godofredo*
Foto da capa: *Saulo Coelho Nunes*

1ª Edição (2014)
On-line (2014)

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 Tabuleiros Costeiros

Armazenamento de pólen de cana-de-açúcar entre genitores assíncronos / Adriane Leite do Amaral... [et. al.].- Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

31 p. (Boletim de Pesquisa / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1961, 87).

1. Cana-de-açúcar. 2. Cruzamento vegetal. 3. Reprodução vegetal. I. Amaral, Adriane Leite do. II. Titulo. III. Série.

CDD 641.336 1 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo 4
Abstract 6
Introdução 7
Material e Métodos 9
Resultados e Discussão 17
Conclusões 27
Agradecimentos 27
Referências 28

Armazenamento de Pólen de Cana-de-açúcar para Cruzamentos entre Genitores Assíncronos

Adriane Leite do Amaral[1]
Tassiano Maxwell Marinho Câmara[2]
João Messias dos Santos[3]
Luiz Sérgio Costa Duarte Filho[4]
Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa[5]

Resumo

A conservação do pólen é importante para pesquisas básicas, conservação de germoplasma e realização de cruzamentos entre genitores assíncronos. O método de conservação de pólen tem importância em programas de melhoramento quando define o período e a forma de armazenamento dos grãos de pólen, preservando a capacidade de germinar, fertilizar e produzir sementes. Pensando nisso, realizou-se uma pesquisa com o objetivo de conservar pólen e realizar cruzamentos entre variedades assíncronas. Foram avaliados métodos de armazenamento com controle de temperatura (geladeira (4°C), freezer (-18°C) e ultrafreezer (- 80°C) e desidratação em pré-armazenagem (sílica gel azul). A maior viabilidade polínica ao final de 90 dias (55,11%) foi obtida com o método que utiliza freezer e desidratação. Para validar este método de armazenamento foram realizados 23 cruzamentos, que geraram mais de 3 mil plantas. Esses resultados

[1] Engenheira-agrônoma, doutora em Melhoramento Genético, pesquisadora da Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros (UEP - Rio Largo), Rio Largo, AL.
[2] Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Unidade de Execução de Pesquisa da Embrapa Tabuleiros Costeiros (UEP - Rio Largo), Rio Largo, AL.
[3] Engenheiro-agrônomo, doutor em Biotecnologia e Melhoramento, professor da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).
[4] Engenheiro-agrônomo, doutorando em Química e Biotecnologia na Universidade Federal de Alagoas (UFAL).
[5] Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciências, professor da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

comprovam que é possível armazenar pólen de cana para realizar cruzamentos entre variedades assíncronas e que, devido à praticidade do método, este pode ser facilmente inserido à rotina dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., viabilidade polínica, florescimento.

Pollen Storage for Asynchronous Crossings in Sugarcane

Adriane Leite do Amaral
Tassiano Maxwell Marinho Câmara
João Messias dos Santos
Luiz Sérgio Costa Duarte Filho
Geraldo Veríssimo de Souza Barbosa

Abstract

The pollen conservation is important for basic research, germplasm conservation and crossings between asynchronous genitors. The conservation method is considered important for breeding programs because it defines the time and the manner of pollen grains storage, while maintaining the pollen ability to germinate, fertilize and produce seeds. The objective of this research was to store pollen and to make crossings between asynchronous flowering varieties. The pollen storage methods were evaluated with temperature control [refrigerator (4°C), freezer (-18°C) and Ultrafreezer (-80°C)] and were dehydrated in pre-storage (blue silica gel). The best result was of the highest pollen viability after 90 days (55.11%) was obtained from the freezer with the dehydration process. To validate the pollen stored method, an amount of 20 crossings were performed, which generated more than 3,000 plants. The results demonstrated that crossings between asynchronous sugarcane varieties with stored pollen are possible. Since this method is convenient, it can be easily inserted into the routine of sugarcane breeding programs

Index terms: *Saccharum spp., Pollinical viability and Flowering.*

Introdução

Uma das principais condições para o êxito na realização de cruzamentos em cana-de-açúcar é a sincronia no florescimento, onde estigmas receptivos, do genitor feminino, devem coincidir com a antese do genitor masculino. Na Estação de Floração e Cruzamentos de Cana-de-açúcar de Serra do Ouro, Murici, AL, pertencente à Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergécio/ Universidade Federal de Alagoas (RIDESA/UFAL), as condições edafoclimáticas são favoráveis ao florescimento da cana-de-açúcar que se concentra entre os meses de abril a julho. Contudo, registros de mais de 10 anos do censo de floração, revelam que as variedades seguem uma ordem escalonada, nas devidas proporções: inicialmente florescem as variedades de ciclo precoce (16%); depois as intermediárias (43%) e por fim as tardias (34%), sendo que algumas variedades são ainda relutantes ao florescimento (7%). Devido ao isolamento no tempo, uma parcela dos cruzamentos entre variedades que florescem em épocas distintas são inviáveis de serem realizados (RAMOS et al., 2009; ROCHA et al., 2008; SANTOS, 2005).

O desenvolvimento de protocolos para armazenamento, conservação e uso de pólen é uma alternativa para viabilizar cruzamentos entre plantas com florescimento não coincidente, chamadas de assíncronas. Algumas tentativas de armazenamento do pólen de cana-de-açúcar já foram realizadas (SARTORIS, 1942; KING, 1961; MOORE; NUSS 1987; YONGHUI; HELONG, 1993). Os resultados obtidos até o presente não são promissores e têm desestimulado a prática nos programas de melhoramento (KRISHNAMURTHI, 1977; ALELLYX APPLIED GENOMICS, 2008).

A dificuldade no armazenamento do pólen de cana-de-açúcar se justifica pela alta sensibilidade do mesmo a desidratação, exposição à luz e a variação da temperatura. Estudos têm mostrado que, sob a condição de ambiente controlado (26,5ºC e 67% de umidade relativa do ar) o pólen tem uma meia-vida de somente 12 minutos,

permanecendo viável por, no máximo, 35 minutos após deiscência (AUSTRÁLIA, 2008; MOORE, 1976; VENKATRAMAN, 1922).

As pesquisas com conservação de pólen de diversas espécies vegetais recomendam temperaturas com intervalo entre 4º e -196ºC e uma redução do teor de água do pólen (SPRAGUE;JOHNSON, 1977). O teor de umidade na amostra de pólen é considerado muito importante porque o excesso determina na formação de cristais de gelo que podem danificar os tecidos, assim como amostras de pólen extremamente secas, podem perder sua capacidade de germinação durante a armazenagem (YOGEESHA et al., 1999). A manipulação do teor de água dos grãos-de-pólen pode ser obtida por meio de sílica gel, sais saturados, dessecação a vácuo e por vapor de nitrogênio líquido (CONNOR;TOWILL, 1993).

Para avaliar a viabilidade dos grãos-de-pólen durante o armazenamento, pode-se utilizar métodos diretos, tais como a indução da germinação in vitro (PIO et al., 2007) e in vivo (FERREIRA et al., 2007), ou por método indireto baseado em análises citológicas, com emprego de coloração, que fornece resultados de forma rápida e com baixo custo (FRANÇA et al., 2009). Dentre os corantes mais utilizados, destacam-se o Iodeto de Potássio que é amplamente utilizado para sexagem nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil. Com praticidade e rapidez, as avaliações se resumem a contagem dos pólens corados e não corados, que correspondem a viáveis e inviáveis, respectivamente. Como referência, plantas que têm mais de 20% dos grãos-de-pólen viáveis são bons genitores masculinos para fins de cruzamentos (Mc INTYRE; JACKSON, 2001).

Nos programas de melhoramento genético de plantas, a conservação de grãos-de-pólen pode ser considerada uma ferramenta fundamental para realização de cruzamentos sem sincronia reprodutiva permitindo explorar aquela variabilidade genética que estava inacessível, além de facilitar intercâmbio e a conservação de germoplasma ex situ. Devido

à importância, esta pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes métodos de armazenamento de grãos-de-pólen visando à conservação e o uso em cruzamentos entre genitores assíncronos.

Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cana-de-açúcar localizado na Estação de Floração e Cruzamentos Serra do Ouro, na cidade de Murici-AL (09º 13' S, 35º 50' W) a uma altitude de 510 m acima do nível do mar e a 34 km de distância do litoral. A parceria entre a Embrapa Tabuleiros Costeiros e a Universidade Federal de Alagoas (UFAL), que compõe a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), viabilizou o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

O germoplasma utilizado incluiu 42 variedades de cana-de-açúcar (Tabela 1) classificadas quanto à época de florescimento, de acordo com o critério da RIDESA em Alagoas (precoce: março-abril; intermediário: maio-junho; tardio: julho-agosto) e identificadas quanto à procedência (4 países) e programa de melhoramento (9 programas) para estudos de viabilidade polínica e cruzamentos assíncronos.

Tabela 1. Características das variedades de cana-de-açúcar utilizadas em cruzamentos assíncronos com pólen conservado. Alagoas, 2009 e 2012.

Vaviedade	Genitor*	Florescimento**	Procedencia	Programa de Melhoramento
CO 975	F	**T**	ÍNDIA	ICAR
H 73852	F	**T**	EUA/HAWAII	USDA
RB 01465	F	**T**	BRASIL	RIDESA
RB 966927	F	**T**	BRASIL	RIDESA
CP 782114	F	I	EUA	USDA
RB 00410	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 011595	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 911225	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 915146	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 925345	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 92606	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 941531	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 943161	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 946022	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 952675	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 966922	F	I	BRASIL	RIDESA
RB 915141	F	I	BRASIL	RIDESA
SP 764092	F	I	BRASIL	COPERSUCAR

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Vaviedade	Genitor*	Florescimento**	Procedencia	Programa de Melhoramento
SP 891115	F	I	BRASIL	COPERSUCAR
VAT 90186	F	I	BRASIL	USINA TRIUNFO S/A
BH 1012	M	I	BARBADOS/HA-WAII	WICSCBS/SAC
CO 290	M	I	ÍNDIA	ICAR
F 150	M	P	EUA	USDA
IAC 5337	M	I	BRASIL	IAC
IAC 862210	M	P	BRASIL	IAC
MEX 5217	M	I	MEXICO	CNIAA
NCO 310	M	I	ÍNDIA	ICAR
PO 7987	M	I	BRASIL	USINA DA BARRA
RB 01478	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 04815	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 845222	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 845323	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 936001	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 945954	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 96502	M	P	BRASIL	RIDESA
RB 966928	M	I	BRASIL	RIDESA
RB 040816	M	I	BRASIL	RIDESA

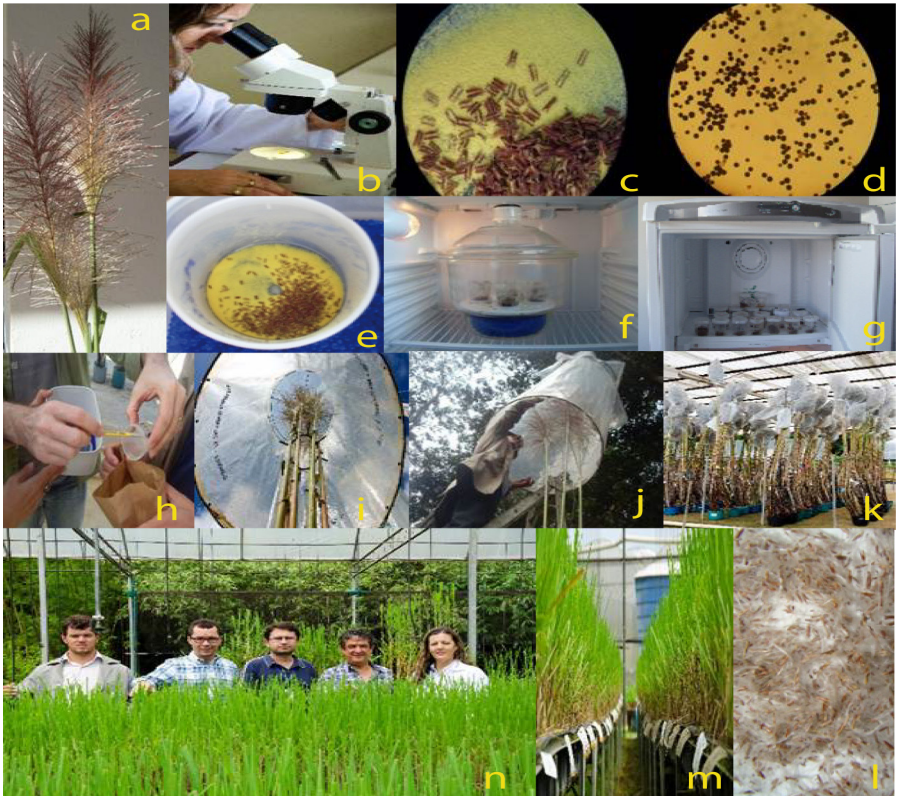
Continua...

Tabela 1. Continuação.

Vaviedade	Genitor*	Florescimento**	Procedencia	Programa de Melhoramento
RB 96502	M	P	BRASIL	RIDESA
SP 923285	M	P	BRASIL	COPERSUCAR
SP 813250	M	I	BRASIL	COPERSUCAR
TCP 803364	M	P	EUA	TEXAS A&M
US 851008	M	I	EUA	USDA
Total			9 PROG MELHOR	

*Genitores: Feminino(F) e Masculino(M); **Florescimento = precoce (P), intermediário (I) e tardio (T). ***Programas de melhoramento: **COPERSUCAR**: Central Cooperativa dos produtores de Açúcar e álcool do estado de São Paulo; **IAC**: Instituto Agronômico de Campinas; **RIDESA**: Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético; Usinas da Barra S.A. (SP) e Triunfo S.A.(AL); **TEXAS A&M** AgriLife Research and Extension Center e **USDA**: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos em Canal Point-FL.; **WICSCBS/SAC**: West Indies Central Sugar Cane Breeding Station/Sugar Association of the Caribbean; **ICAR**: Indian Council of Agricultural Research.

A pesquisa foi conduzida no ano 2009, quando foram testados vários métodos de conservação de pólen e, no ano 2012 quando foram realizados os cruzamentos assíncronos. As etapas da pesquisa foram sucessivas e compreenderam: a coleta do pólen, avaliação de viabilidade polínica pré e pós-conservação, desidratação, conservação e armazenagem de pólen, cruzamentos com pólen conservado e obtenção de plantas (Figura 1).



Fotos : Adriane Amaral (a,c,d,e,f,g,h,j,l); Saulo Coelho Nunes (b,i,j,k,m,n)

Figura 1. Síntese da metodologia de análise e conservação do pólen de *Saccharum* sp. para cruzamentos e obtenção de plantas: a) inflorescência de *Saccharum* sp.; b,c,d) análise da viabilidade polínica; e,f,g) desidratação e armazenagem de pólen; h,i,j) cruzamento com pólen conservado; k,l) produção de sementes; m,n) produção de plantas.

Coleta do pólen

Para a obtenção de pólen, inflorescências de variedades de cana-de-açúcar foram colhidas no BAG durante a estação de floração em Alagoas, de abril a junho. Para tanto, cerca de 30 panículas/variedade, que apresentavam anteras em processo de liberação do pólen (antese), foram coletadas nas primeiras horas da manhã (antes das 8 horas). As panículas foram embaladas individualmente em sacos de papel e de plástico, e acondicionadas em caixas de isopor com gelo, imediatamente ao corte, para preservação e transporte até o laboratório de análise da viabilidade.

De cada panícula, foram coletados grãos-de-pólen e algumas anteras, os quais foram imediatamente acondicionados em frascos plásticos com tampa rosca (80 mL). Para cada variedade foi extraída uma amostras de aproximadamente 4 gramas de pólen, contendo também algumas anteras devido à forma de coleta. Essa amostra foi dividida em duas, sendo uma para tratamento de desidratação em pré-armazenagem (2 gramas). Essas duas subamostras foram também divididas em quatro subamostras (0,5 gramas) para armazenamento e estocagem em diferentes métodos de conservação (geladeira, freezer e ultrafreezer).

Avaliações da viabilidade polínica

A viabilidade do pólen foi aferida em dois momentos: em pré e pós-conservação do pólen. Ou seja, com tempo máximo de até 30 minutos após a colheita da panícula no campo e em pós-armazenagem, com 7 dias, 30 dias e 90 dias. Para as avaliações de viabilidade foi utilizada a técnica de coloração citológica com solução de Lugol (1 g de Iodo, 2 g de iodeto de potássio em 100 mL de água destilada). Essa avaliação com Lugol permite diferenciar grãos-de-pólen corados (com coloração azulada resultante da reação do Lugol com as reservas de amido) daqueles descorados, considerados inviáveis ou malformados pela ausência ou deficiência de reserva de amido e defeitos e/ou rompimentos nas membranas. Para todos os períodos de armazenagem, (7, 30 e 90 dias), foram confeccionadas lâminas, com uma gota de solução de Lugol, com uma quantidade de pólen correspondente aquela

que adere a ponta de uma agulha histológica quando mergulhada na subamostra de pólen. Para avaliação de viabilidade, cada lâmina, observada sob microscópio estereoscópico (aumento 40X), foi dividida em quatro setores, correspondentes a quatro repetições, seguindo metodologia descrita em AMARAL et al. (2012). Cada setor foi fotografado com câmara digital (oito Mega Pixels), para posterior avaliação visual. A contagem dos grãos-de-pólen, corados e dos não corados permitiu o cálculo da porcentagem de viabilidade polínica utilizando a fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \left(\frac{\text{Número de grãos de pólen corados}}{\text{Número de grãos de pólen total}} \right) \times 100$$

Para análise estatística, foram utilizados dados de percentagens de viabilidade, num delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições em esquema fatorial (métodos(3) x desidratação(2) x variedades(6) x tempo(3)) com complementação da análise da variância pelo Teste de Duncan (5% de Probabilidade) e mediante análises pelo programa computacional SAS 9.2 (SAS Institute, 2013).

Desidratação em pré-conservação do pólen

No tratamento de desidratação em pré-armazenagem, para cada variedade, uma amostra de 2000 mg de pólen foi dividida em quatro frascos plásticos, com tampa rosca e volume de 80 mL, contendo aproximadamente 500 mg de pólen por frasco. Esses quatro frascos foram mantidos abertos e acondicionados em dissecador de vidro, contendo 200.000 mg de sílica gel azul. A desidratação transcorreu por um período de 60 minutos em Geladeira (4°C), em momento anterior a estocagem nos respectivos equipamentos de armazenagem (geladeira, freezer ou ultrafreezer). Essa desidratação em sílica gel azul tem por finalidade a redução do teor de água do pólen (AHLGREN e AHLGREN, 1978). Imediatamente à coleta, as amostras de pólen de cana-de-açúcar têm apresentado teores de água de 18% (pólen) a 46% (pólen mais anteras) dependendo da constituição da amostra. Após a desidratação com sílica gel azul, uma redução mínima de 30% no conteúdo de água das amostras tem sido observada.

Conservação do pólen

Diferentes equipamentos foram utilizados para conservar pólen, tais como geladeira (4°C), freezer (-18°C) e ultrafreezer (-80°C). Para a extração do pólen, panículas com flores em antese recém-colhidas do campo foram agitadas e friccionadas dentro de sacos de papel. Para cada método de armazenagem as subamostras foram ainda subdivididas em quatro frascos, sendo três frascos com 100 mg, para realizar as três avaliações de viabilidade em diferentes períodos de armazenamento (7 dias, 30 dias, 90 dias) e, um frasco de 200 mg, para realizar os cruzamentos artificiais.

Cruzamentos com pólen conservado

Os cruzamentos artificiais foram do tipo biparental e entre variedades assíncronas, que distam em mais de 15 dias na data de florescimento, fazendo uso de pólen conservado (Tabela 5). Para planejamento dos cruzamentos, um total de 22 variedades foi direcionado como machos e 20 como fêmeas (Tabela 1). As variedades escolhidas como machos foram preponderantemente de florescimento precoce-intermediário e as fêmeas de intermediário-tardio. A classificação dos genitores quanto à época de florescimento levou em consideração a informação de censos do florescimento do BAG/RIDESA-AL, realizados na última década (2004-2013). As variedades foram consideradas de florescimento precoce, intermediário ou tardio, quando floresceram respectivamente nos períodos de março-abril, maio-junho e a partir de julho.

Para os cruzamentos foram utilizados como genitor masculino aquelas amostras de pólen desidratado em sílica e armazenadas em freezer por períodos superiores a 15 dias. Como genitor feminino, foram coletadas no campo quatro panículas/variedade que apresentavam estigmas receptivos, plumosos e arroxeados. As panículas foram cortadas com colmos de 3 m de comprimento e mantidas, imersas na base em solução nutritiva de Mangelsdorf, com reposição diária de nutrientes para a realização dos cruzamentos (CESNICK; MIOCQUE, 2004). Imediatamente á coleta das fêmeas, as panículas foram castradas, ou

emasculadas, mediante imersão das inflorescências em água quente (52,5°C) por 4,5 minutos (MACHADO JÚNIOR et al., 1996). Após o processo de emasculação, as quatro panículas/variedade foram polinizadas com amostras de pólen armazenado, mediante uso de pincéis. Imediatamente à polinização, as panículas foram levadas para campânulas, alocadas em área de mata vizinha ao local de polinização, permanecendo nessas condições por dois dias para propiciar proteção e condições favoráveis de temperatura e umidade, para a ocorrência de fecundação. Depois da fecundação, foram esperados mais 15 dias, para ocorrência de desenvolvimento e maturação das sementes.

Sementes e plântulas

As sementes produzidas foram colhidas e mantidas em sala climatizada (21°C e 60% U.R.) até a semeadura. Uma amostra de 4 g sementes/variedade foi semeada em caixas com substrato (duas partes de areia para duas partes de terra). Cerca de 40 dias após a semeadura foram avaliados o número de plantas desenvolvidas a partir dos cruzamentos com pólen armazenado.

Resultados e Discussão

A viabilidade polínica média pós-conservação (46,07%) apresentou valor superior à viabilidade mínima (20,00%) que vem sendo adotada para designar uma planta como genitor masculino pelos programas de melhoramento de cana (Mc INTYRE; JACKSON, 2001) (Tabela 2). Esse resultado é importante visto que, quanto maior a quantidade de pólen viável na amostra pós-armazenamento, maiores as chances de êxito na produção de sementes oriundas de cruzamentos com pólen conservado.

Tabela 2. Resumo da Análise da variância para a viabilidade do pólen de cana-de-açúcar. Rio Largo, AL, 2009.

Fontes de variação	Viabilidade do pólen (%)		
	GL	QM	
Variedade (var.)	5	5287,99	**
Método (met.)	2	4650,12	**
Desidratação (des.)	1	1626,83	**
Tempo (temp.)	2	5539,22	**
var. x met.	9	1670,21	**
var. x des.	5	1138,06	**
var. x temp.	10	519,25	**
met. x des.	2	543,82	**
met. x temp.	4	919,74	**
des x temp.	2	318,64	**
var. x met. x des.	7	407,85	**
var. x met. x temp.	16	345,67	**
var. x des. x temp.	9	190,11	**
met. x des. x temp.	4	381,87	**
QM	207	583,48	**
QME	144	81,66	
R^2		91,12	
CV (%)		16,62	
Média geral	**46,07**		

** Significativos a 1% de probabilidade na análise da variância.

Todas as fontes de variação estudadas (variedades, métodos, desidratação e tempo de conservação) afetaram significativamente a viabilidade do pólen e, também houve diferenças significativas para as interações estudadas. As fontes de variação consideradas na análise da variância explicam mais de 91% (R^2) da viabilidade do pólen (Tabela 2). Os experimentos realizados com pólen de cana-de-açúcar, apesar de serem altamente suscetível às condições ambientais, ainda mantiveram uma boa precisão (CV = 16,62%), em comparação com outros estudos com pólen (CV = 4,21-7,38%) onde as influências do ambiente foram menores (MELLONI et al., 2013).

Com o presente estudo, ficou claro que é possível manter a viabilidade polínica de cana-de-açúcar por períodos de até 90 dias, fazendo uso de diferentes métodos de armazenamento do pólen (geladeira, freezer e ultrafreezer) utilizando ou não a desidratação com sílica gel azul. Entretanto, os melhores resultados de viabilidade polínica foram obtidos com o armazenamento no freezer e quando utilizado a pré-desidratação com sílica. Além disso, ficou evidente que com o passar do tempo de armazenagem decresce a viabilidade polínica, independentemente do método utilizado (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Viabilidade polínica e influência dos fatores variedades, métodos de conservação, desidratação e tempo de armazenagem. Rio Largo, AL, 2009.

Médias	Viabilidade do pólen (%)
PO 7987	61,19 A
NCO 310	50,82 B
MEX 5217	47,41 C
F1 50	47,02 C
CO 290	38,69 D
SP 813250	27,81 E
Médias métodos	
freezer	53,62 A
geladeira	42,44 B
ultrafreezer	41,01 B
Médias desidratação	
desidratado	47,93 A
natural	44,20 B
Médias tempo	
7d	53,36 A
30d	45,65 B
90d	39,94 C

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan com 5% de Probabilidade.

Tabela 4. Viabilidade polínica em diferentes métodos de conservação, tempos de armazenagem, desidratação e variedades de cana-de-açúcar. Rio Largo, AL, 2009.

Tempo	Variedades	Métodos de armazenamento de pólen de cana-de-açúcar											
		Geladeira				Freezer				Ultrafreezer			
		Natural		Desidratado		Natural		Desidratado		Natural		Desidratado	
7 dias	**PO 7987**	76,00	b	66,42	a	70,10	a	77,41	A	68,89	a	55,00	a
	NCO 310	79,70	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEX 5217	34,25	d	37,79	b	66,62	a	60,08	B	39,50	b	68,28	a
	F 150	52,70	c	48,10	b	48,05	b	55,25	B	67,38	a	53,50	a
	CO 290	-	-	52,00	b	39,75	b	56,75	B	-	-	-	-
	SP 813250	32,90	d	52,75	b	-	-	-	-	18,53	c	44,07	a
	Média	**53,71**		51,41		50,07		62,37		48,57		55,21	
30 dias	**PO 7987**	65,45	a	67,22	a	67,68	a	72,99	A	41,42	a	41,46	b
	NCO 310	54,60	b	50,78	b	61,10	a	64,25	A	-	-	-	-
	MEX 5217	38,62	c	30,23	c	65,79	a	74,32	A	42,31	a	30,76	bc
	F1 50	49,13	b	3,25	d	53,75	ab	67,08	A	50,98	a	56,40	a
	CO 290	-	-	25,00	c	42,66	bc	47,38	A	-	-	17,08	c
	SP 813250	16,07	d	35,39	c	31,85	c	-	-	15,25	b	37,05	b
	Média	**44,37**		35,31		53,80		65,20		37,49		36,55	

Continua...

Tabela 4. Continuação.

Tempo	Variedades	Métodos de armazenamento de pólen de cana-de-açúcar											
		Geladeira				Freezer				Ultrafreezer			
		Natural		Desidratado		Natural		Desidratado		Natural		Desidratado	
90 dias	**PO 7987**	61,36	a	65,55	a	59,00	a	66,80	A	60,83	a	24,88	c
	NCO 310	-	-	49,63	b	29,35	c	47,86	B	-	-	-	-
	MEX 5217	43,60	b	30,00	c	57,73	a	70,88	A	35,68	c	26,93	bc
	F1 50	8,32	cd	-	-	42,50	b	48,50	B	49,80	b	44,60	a
	CO 290	20,09	c	32,20	c	27,65	c	48,85	B	-	-	36,30	ab
	SP 813250	1,45	d	-	-	20,36	c	47,83	B	19,26	d	20,50	c
	Média	**29,96**		44,34		39,43		55,11		41,39		30,64	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna e para cada tempo, não são diferentes pelo Teste de Duncan com 5% de Probabilidade.

A viabilidade média do pólen caiu de 61,73% no momento da coleta para 53% nos primeiros sete dias e para 39% nos 90 dias de armazenamento. De 7 a 90 dias a redução foi de 25%. Essa redução de viabilidade polínica não deve ser considerada prejudicial quando se parte de valores elevados e superiores a 60% na coleta do pólen, característica da estação de floração de cana (abril-junho) na Serra do Ouro, AL. Sob o ponto de vista prático, 90 dias de armazenamento é mais do que suficiente para dar flexibilidade na realização dos cruzamentos dentro de uma única estação de floração de cana-de-açúcar.

Apesar da complexidade de interpretação das análises com interações múltiplas (Tabela 2), é possível identificar consistência na superioridade de algumas variedades no armazenamento do pólen (Tabela 4). Resultados de viabilidade polínica superiores a 50% foram obtidos com as variedades PO 7987 e NCO 310 em geladeira; com as variedades PO 7987 e MEX 5217 em freezer; e com as variedades PO 7987, MEX 5217 e F1 50 em ultrafreezer. Isto evidencia que algumas variedades apresentam grãos-de-pólen com maior resistência ao armazenamento a frio, independente do tempo e do método de armazenamento (PO 7987) e que outras apresentam uma resposta específica à intensidade do frio. A variedade MEX 5217 apresentou maior viabilidade no armazenamento em -18°C enquanto que F1 50 em temperaturas ainda mais baixas de -80°C. Segundo alguns autores a melhor forma de conservação foi detectada na forma desidratada, principalmente em função da redução na formação intracelular de cristais de gelo em baixas temperaturas, comparativamente ao pólen com umidade natural (BARNABÁS; RAJKI, 1976; SPRAGUE; JHONSON, 1977).

Para a realização de cruzamentos assíncronos em cana-de-açúcar foi utilizado apenas o método de conservação de pólen em Freezer, com pré-desidratação em sílica, porque este apresentou a maior viabilidade polínica pós-conservação (Tabela 4). Durante os anos de 2009 e 2012 foram realizadas as fases de experimentação e de validação da pesquisa, respectivamente. Em 2009, foram realizados estudos com

números reduzidos, sendo apenas sete genótipos e três cruzamentos; enquanto em 2012, com números maiores, sendo 40 genótipos e 20 cruzamentos (Tabela 5). No total, foram realizados 23 cruzamentos assíncronos devido ao êxito na conservação de pólen. Na prática e para a maioria dos cruzamentos planejados, foram necessários apenas 15 dias de armazenamento de pólen. De forma geral, as taxas de viabilidade polínica média se mantiveram superiores a 60%, em pré e pós-armazenagem, sendo esta condição favorável à realização dos cruzamentos. Com os cruzamentos, um total de 3.544 plantas foi gerado, sendo 133 plantas da primeira fase, em 2009, com três cruzamentos realizados, e 3.411 plantas da segunda fase, em 2012, com um total de 20 cruzamentos realizados (Tabela 5).

Diante da praticidade e simplicidade do método proposto, recomenda-se o armazenamento de pólen em freezer com pré-desidratação em sílica gel azul como alternativa para realização de cruzamentos assíncronos em cana-de-açúcar.

Tabela 5. Plântulas de cana-de-açúcar geradas de cruzamentos assíncronos realizados com grãos de pólen armazenados em freezer aos 15 e 60 dias nos anos de 2009 e 2012. Rio Largo, AL, 2012.

	Genitores		Viabilidade no armazenamento			
	Fêmea	Macho	Pré	Pós	Tempo (dia)	Plantas
	RB 011595	NCO 310	63	50	60	2
2009	RB 966927	PO 7987	82	70	60	2
	RB 01465 e H7 3852	MEX 5217	46	65	30	69
Média			**63,67**	**61,67**		
	RB 00410	RB 945954	64,84	65,2	15	33
	RB 966922	RB 845222	84,68	76,38	15	14
	RB 943161	RB 04815	-	-	15	34
	RB 941531	RB 845323	83,36	80,04	15	10
	RB 915141	RB 96502	74,1	59,6	15	7
	RB 925345	RB 01478	79,6	82,3	15	3
	VAT 90186	RB 945954	64,8	65,2	15	496
	RB952675	IAC 862210	68,58	87,39	15	110
	RB946022	RB 936001	79,8	80,6	15	131

Continua...

Tabela 5. Continuação.

	Genitores		Viabilidade no armazenamento			
	Fêmea	Macho	Pré	Pós	Tempo (dia)	Plantas
2012	SP 764092	TCP 803364	82,37	-	15	160
	SP 891115	SP 923285	24,97	54,8	15	526
	SP 891115	RB 96502	74,14	59,56		
	RB 966927	F 150	55,33	44,43	30	4
	RB 00410	RB 040816	59,59	52,71	15	56
	RB 915146	US 851008	62,21	77,44	15	10
	SP 76-4092	BH 1012	56,42	30,27	15	163
	RB 911225	NCO 310	68,87	68,64	15	701
	RB 92606	NCO 310	68,87	68,64	15	472
	RB 966927	MEX 5217	61,36	53,52	15	81
	CO 975	RB 966928	-	-	15	30
	CP 782114	IAC 5337	-	-	15	370
Média			**67,38**	**65,1**		
GERAL			**65,45**	**62,46**		**3.544**

Conclusões

A melhor forma de conservação do pólen de cana-de-açúcar é obtida com armazenagem em freezer (-18°C) e pré-desidratação em sílica.

A conservação do pólen permite realizar cruzamentos entre variedades assíncronas de cana-de-açúcar para a produção de sementes e de plantas em programas de melhoramento genético.

Agradecimentos

À Embrapa e à RIDESA, pelo suporte financeiro.

Aos técnicos agrícolas da UEP Rio Largo e do CECA-UFAL/ RIDESA-UFAL.

Aos funcionários da Estação de Floração e Cruzamentos da Serra do Ouro/RIDESA-UFAL.

De uma forma muito especial, ao apoio recebido do Prof. Pesquisador Sênior Antônio Maria Cardoso Rocha da RIDESA-UFAL.

Ao técnico em agropecuária Edimundo Leobino Silva, pela dedicação ao projeto de pesquisa e ao programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar da RIDESA/UFAL.

Referências

ALELLYX APPLIED GENOMICS. **Informações relevantes sobre a cana-de-açúcar para a regulamentação de variedades transgênicas**. Economia, origem, distribuição geográfica, botânica, genética, melhoramento, produtos e sub-produtos e impactos na saúde humana e no meio ambiente. Campinas, 2008. 43 p. (Alellyx Applied Genomics. White Paper Sugarcane-Allelyx).

AHLGREN, C. E.; AHLGREN, I. F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5 needle species. **Foresty Science**, v. 24, p. 100-102, 1978.

AMARAL, A. L. do; SANTOS, J. M. dos; CAMARA, T. M. M.; BARBOSA, G. V. de S. M**etodologia de conservação de pólen de cana-de-açúcar**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 11p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 127). Disponível em: <http://wwwcpatcembrapabr/publicacoes _2012/cot_127pdf>. Acesso em: 17 abr. 2014.

AUSTRALIA GOVERNMENT. **The Biology and Ecology of Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrids).** Australian: Government Office of the gene Technology regulatory. 2008. 36p. Disponível em: <http:wwwogtrgovau/internet/ogtr/publishingnsf/4/ / biologysugarcanertf>. Acesso em: 11 jun. 2011.

BARNABÁS, B.; RAJKI, E. Storage of maize (Zea mays L) pollen at -196 ºC in liquid nitrogen. **Euphytica,** v. 5, p. 747-752, 1976.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, DF, 2004. 307 p.

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

FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. R.; ALVIM, P. A.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, E.D.L. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, p. 159-173. 2007.

FRANÇA, L.V.; NASCIMENTO, W.M.; CARMONA, M.; FREITAS, R.A. Viability of eggplant pollen. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 320-327, 2009.

KING, JR. The freeze-drying of pollens. **Economic Botany**, v. 15, p. 91-98, 1961.

KRISHNAMURTHI, M. The sugarcane pollen. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 16., 1997, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: ISSCT, 1997. p. 157-164.

MACHADO JÚNIOR, G. R.; WALKER, D. I.; BRESSIANI, J. A.; SILVA, G. J. A. Emasculation of sugarcane tassels using hot water. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 22., 1996, Cartagena. **Proceedings...** Cartagena, 1996. Disponível em: <http://www.issct.org/pdf/proceedings/1995/1996%20Machado%20Emasculation%20of%20Sugarcane%20Tassels%20Using%20Hot%20Water.pdf>. Acesso em: 14 set. 2014.

Mc INTYRE, C. L.; JACKSON, P. A. Low level of selfing found in a sample of crosses in Australian sugarcane breeding programs. **Euphytica,** v. 117, p. 245-249, 2001.

MELLONI, M. L. G.; SCARPARI, M. S.; MENDONÇA, J. R.; PERECIN, D.; LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R. Comparison of two staining methods for pollen viability studies in sugarcane. **Sugar Technology,** v. 15, p. 103-107, 2013.

MOORE, P. H.; NUSS K. J. Flowering and flower synchronization. **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987.

350 p.

MOORE, P. H. Studies on sugarcane pollen. **Phyton Revista Internacional de Botánica Experimental,** Argentina, v. 5, p.71-80. 1976.

PIO, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; RUFINI, J. C. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 147-153, 2007.

RAMOS, R. P.; BARBOSA, G. V. S.; SOUZA, J. L.; FERREIRA JUNIOR, R. A.; ABREU, M. L. Influência da temperatura do ar no período de florescimento de genótipos de cana-de-açúcar na Serra do ouro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 16., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBA: UFV: CNPMS, 2009. p. 1-5. Disponível em: <http://www. sbagro.org.br/anais_congresso_2009/cba2009/ord_area.html>. Aceso em: 11 jun. 2011.

ROCHA, A. M. C.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S. Quatro décadas de Contribuição da Serra do Ouro para a Agroindústria da cana-de-açúcar do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL (STAB), 9., 2008, Maceió. **Anais...** Maceió: STAB, 2008. p. 532-536.

SANTOS, J. M. **Avaliação do florescimento de genótipos de cana-de-açúcar na Serra do Ouro de 1998 a 2004.** 2005. 54f. Monografia (Graduação) - Universidade Federal Alagoas, Maceió.

SARTORIS, G. B. Longevity of Sugarcane and Corn Pollen - a Method for Long-Distance Shipment of Sugarcane Pollen by Airplane. **American Journal of Botany**, n. 5, v. 29, p. 395-400, 1942.

SAS Institute. **SAS User´s guide**: statistics version 9.2. North Carolina, USA: SAS Institute, Cary, 2013.

SPRAGUE, J. R.; JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT

CONFERENCE, 14., 1997, Baton Rouge, Lousiana. **Anais...** US Forest Service: Florida, v. 14, 1977. p. 20-22.

VENKATRAMAN, R. S. T. S. Germination and preservation of sugarcane pollen. **Agricultural Journal of India**, v. 17, p. 127-132, 1922.

YONGHUI, L.; HELONG, X. U. Studies on the sugarcane pollen storage at low temperature Sugarcane and Canesugar. **Industrial Crops Research Institute**, China, v. 4, p. 9-12, 1993.

YOGEESHA, H, S.; NAGARAJA, A.; SHARMA, S.P. Pollination studies in hybrid tomato seed production. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, p. 115-122, 1999.

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL

BRASIL

PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA