

Revista

RG

NEWS

V.2

N.2

2016

Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos

Revista **RG News**

Publicação oficial, virtual, da
Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos

COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA

Editor Chefe:

Renato Ferraz de Arruda Veiga

Conselho Editorial Técnico Científico:

Área Animal: Afrânio Gonçalves Gazolla

Área Micro-organismos: Maira Halfen Teixeira Liberal

Área Vegetal: Manoel Abílio de Queiróz

DIRETORIA DA SBRG

Presidente:

Marcos Aparecido Gimenes

Diretor Financeiro:

Alexandre Floriani Ramos

Diretora de Eventos:

Rosa Lia Barbieri

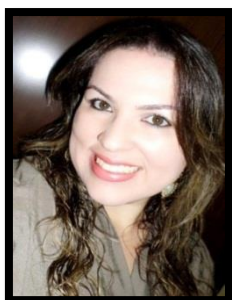
Diretor Científico e de Divulgação:

Miguel Luiz Menezes Freitas

Secretária Executiva:

Tammy Aparecida Manabe Kiihl

12) Importância da Criopreservação de Grãos de Pólen em Gramíneas Forrageiras



Naiana Barbosa Dinato

Licenciada em Ciências Biológicas, ULBRA – GO. Me. em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – UFScar – SP. Doutoranda em Genética Evolutiva e Biologia Molecular - UFSCar – SP.



Alessandra Pereira Fávero

Eng. Agr., UnB – DF. Me. em Ciências Biológicas – AC: Genética, UNESP/Botucatu – SP. Dr. em Agronomia – AC: Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP – SP. Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste. É credenciada no Programa de Pós-Graduação em Genética Molecular e Biologia Evolutiva (PPGGEV) da Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR, como orientadora de mestrado e doutorado. Ministra a disciplina "Recursos Genéticos" para alunos de pós-graduação do PPGGEV-UFSCAR. Especialista em Arachis e Paspalum.



Izulmé Rita Imaculada dos Santos

Bióloga, UFU – MG. Me. em Botânica, USP – SP. Dr. em Fisiologia do Estresse Vegetal, CSU (Colorado State University) – CO. Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), especialista em criopreservação de recursos fitogenéticos.



Tiago Maretti Gonçalves

Licenciado em Ciências Biológicas, UNIFAL – MG. Me. em Genética e Melhoramento, UEM – PR. Doutorando em Genética Evolutiva e Biologia Molecular - UFSCar – SP.

Introdução

No Brasil, a atividade com maior expressão no uso da terra é a pecuária, com o maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em 180 milhões de cabeças (PAULINO *et al.*, 2008). Este rebanho tem a pastagem como base alimentar (99% de sua dieta), (BÜRGI&

PAGOTO, 2002) movimentando um mercado anual de mais de 100 bilhões de dólares, representando 30% do PIB do agronegócio e aproximadamente 7% do PIB brasileiro (ABIEC, 2015). Segundo dados do Censo Agropecuário do IBGE (2007), aproximadamente 20% do território brasileiro e 70% de sua área agricultável é composto por áreas pastoris, somando mais de 170 milhões de hectares direcionados apenas para pastagens. Este número é maior até mesmo que os 99,9 milhões de hectares ocupados com matas e florestas e os 76,7 milhões de hectares usados para lavoura.

Como característica das áreas destinadas à pastagem, destaca-se a monocultura de gramíneas de origem africana, estabelecidas após o desmatamento de floresta ou em substituição a outros tipos de vegetação nativa (MOREIRA, ARAUJO & FRANÇA, 2006). As principais espécies utilizadas são dos gêneros *Andropogon* L., *Brachiaria* (Trin.) Griseb., e *Panicum* L. (BATISTA & GODOY, 2000), sendo que cerca de 85% da área de pastagens é ocupada com o gênero *Brachiaria* (MACEDO, 2006).

Como alternativa de cultivo com espécies nativas, a família *Poaceae* (R.Br.) Barnh. apresenta notável importância para o Brasil, pois engloba diversos gêneros com um alto valor forrageiro. Dentro desta família temos o gênero *Paspalum*, considerado como o mais importante dentro das Américas (ALISCIONI, 2002; BARRETO, 1974; CHASE, 1929; GOMES, 1995), sendo diversas espécies nativas do Brasil com um alto valor forrageiro. Compreende cerca de 330 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, basicamente no continente americano (ZULOAGA & MORRONE, 2005). Ocorrem em todo o Brasil, no leste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (QUARÍN, VALLS & URBANI, 1997). Apesar de o Brasil estar entre os países com maior diversidade genética de *Paspalum* disponível, sendo considerada sua ocorrência extremamente relevante na flora nativa dos Pampas do Rio Grande do Sul, o seu uso como forrageira em monocultivo é ainda raro. As poucas variedades de *Paspalum* disponíveis no mercado mundial foram obtidas por meio da seleção de germoplasma nativo (BURTON; GATES & GASH, 1997). Com o objetivo de conservar e utilizar espécies do gênero, a Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos - SP, abriga o Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG), que conta com mais de 300 acessos de 49 espécies distintas, distribuídas em 17 grupos informais. Neste banco há diversas espécies com grande potencial como forrageira (BATISTA & GODOY, 2000; BATISTA; GODOY & REGITANO NETO, 1999) ou como cobertura vegetal (CASTRO *et al.*, 2015).

Assim, com a demanda que há por plantas forrageiras, o interesse e necessidade por pesquisas sobre materiais potenciais e melhoramento genético tem se intensificado significativamente no Brasil e em toda a América do Sul. No Brasil, é relativamente recente a pesquisa em melhoramento genético de forrageiras, especialmente quando se compara com o melhoramento de forrageiras subtropicais como: alfafa, azevém e trevo. As pesquisas com melhoramento de forrageiras tropicais são realizadas principalmente em instituições públicas, com o objetivo de selecionar cultivares mais produtivas e melhor adaptadas às condições dos diversos ecossistemas sul americanos (SCHULTZE-KRAFT, 1980). Primeiramente, os programas de melhoramento visavam à seleção de genótipos *per se*, e mais recentemente ainda,

são realizados cruzamentos e obtenção de novas cultivares de forrageiras híbridas no Brasil como por exemplo, *Panicum maximum* Jacq. cv. BRS Tamani (BRS TAMANI, 2015).

No entanto há vários desafios a serem enfrentados, que limitam as pesquisas sobremaneira; como diferentes ploídias e falta de sincronismo fenológico.

Então, não raro, antes de iniciar programas de melhoramento genético de forrageiras, é necessário acumular conhecimento básico dos aspectos biológico das espécies, para a obtenção de indivíduos sexuais tetraplóides e o cruzamento destes com acessos apomíticos, tendo assim a possibilidade de unir características de interesse como: alta produção, baixa estacionalidade, e alta qualidade bromatológica; atividades estas que estão longe de serem triviais. Uma ferramenta aplicável à falta de sincronização de florescimento entre os potenciais genitores é a criopreservação, na qual busca-se o armazenamento de grão de pólen, visando conservar a viabilidade dos gametas masculinos por diferentes períodos (FERREIRA *et al.*, 2007). Neste método, coloca-se o pólen em nitrogênio líquido (-196°C) ou em sua fase de vapor (-150°C). A capacidade de sobrevivência dos tecidos vegetais à criopreservação depende de sua tolerância à desidratação e à temperatura (SANTOS, 2000). O sucesso da criopreservação independe do tempo de armazenamento, mas depende da umidade e da temperatura (DEAN, 1965; GANESHAN, 1986; LINSKENS, 1964). Contudo, há poucos relatos na bibliografia de estudos de conservação em longo prazo utilizando criopreservação de grãos de pólen de gramíneas. Encontrou-se trabalhos apenas com milho (KERHOAS, GAY & DUMAS, 1987; BARNABAS *et al.*, 1988; ALVIM, 2008, DAVIDE *et al.*, 2009) e *Paspalum* (DINATO, 2016), contudo acredita-se no grande potencial de adaptação de metodologias utilizadas com sucesso nestes gêneros que podem ser também utilizadas para outros gêneros de gramíneas.

Para que o estudo da criopreservação de pólen seja eficiente, é necessário conhecer a fenologia reprodutiva das espécies de interesse. Esses estudos avaliam a relação entre a frequência, duração e regularidade das fenofases das plantas, relacionando-as com os fatores abióticos, (temperatura, umidade, precipitação e fotoperíodo bióticos, endógenos e filogenéticos (WILLIAMS-LINERA & MEAVE, 2002). A floração é a primeira fenofase reprodutiva expressa pela planta, por isso, presume-se que a indução do período reprodutivo ocorra primeiro nesse ponto. (IMAIZUMI & KAY, 2006). Segundo Almeida (1995) há três padrões fenológicos em gramíneas do cerrado: as precoces de ciclo curto (ciclo reprodutivo muito curto, de novembro a janeiro); as precoces de ciclo longo (reprodução entre novembro e agosto) e tardias (com período reprodutivo do meio ao final da estação chuvosa). *Paspalum atratum* Swallencv. Pojuca tem comportamento fenológico reprodutivo tardio, na região central do Brasil, com o florescimento ocorrendo entre os meses de fevereiro e março, com a colheita das sementes nos meses de março e abril (KARIA & ANDRADE, 2001). Pizarro & Carvalho (1992), avaliaram 42 genótipos de *Paspalum* spp., e encontraram uma grande irregularidade quanto à época de florescimento desses genótipos. Eles observaram que 60% dos genótipos apresentaram comportamento precoce (florescimento menor que 30 dias), 32% comportamento intermediário (florescimento entre 30 e 60 dias) e 8% apresentaram comportamento tardio (florescimento após 60 dias).

Assim como em *Paspalum*, em *Megathyrsus* (Pilg.)B.K.Simon & S.W.L. Jacobs spp. (syn. *Panicum* spp.) e *Urochloa* P.Beav. spp. (syn. *Brachiaria* spp.) também ocorre florescimento em distintas épocas. No BAG *Panicum*, localizado na Embrapa Gado de Corte, a coleção tem 47% dos genótipos com comportamento de florescimento tardio e 43% que floresce o ano todo (JANK *et al.*, 2008).

Estudos de Conservação de Grãos de Pólen

O desenvolvimento de tecnologias de conservação de grãos de pólen, não só de gramíneas, mas de várias espécies de outras famílias, pode ser de grande importância no aumento da eficiência dos programas de melhoramento e na promoção do intercâmbio e conservação de germoplasma (EINHARDT, CORREA & RASEIRA, 2006; HANNA, 1994), com o objetivo de manutenção da diversidade genética (CONNOR & TOWILL, 1993). Além disso, uma das possibilidades da utilização dos grãos de pólen conservados é no auxílio dos agentes polinizadores, pouco eficientes ou inexistentes, e também para sincronia artificial entre a dispersão de pólen e a receptividade floral, que pode ser de dias ou de meses, uma vez que o pólen pode ser utilizado a qualquer momento (TIGHE, 2004).

Dafni (1992) afirma que avaliar a viabilidade dos grãos de pólen, é o primeiro passo para verificar as chances de germinação no estigma da flor, fator fundamental à fertilização (DAMASCENO Jr. *et al.*, 2008).

Para o sucesso do armazenamento do pólen, fatores como umidade e temperatura de armazenamento devem ser controlados, já que o metabolismo do pólen e a contaminação por microrganismos estão diretamente relacionados a esses fatores. A temperatura é o principal fator externo a ser considerado, pois ela influencia negativamente na longevidade do pólen. Logo, a limpeza e a aplicação de baixas temperaturas e baixos teores de umidade normalmente encontram-se ligados à redução do metabolismo do pólen, o que permite maior longevidade do mesmo (SOUSA, 1996).

Além da temperatura ideal, o sucesso da conservação do pólen, depende de outros fatores, como umidade relativa do ambiente de armazenamento e do grau de umidade do pólen e independe da duração do período de armazenamento (DEAN, 1965; LINSKENS, 1964), porém não há um acordo sobre qual é o nível de umidade mais favorável para o armazenamento do pólen até mesmo dentro da mesma cultura (GEORGIEVA & KURELEVA, 1994). Para armazenar o grão de pólen, é necessário desidratá-lo para que o mesmo possa ser melhor conservado, não ocorrendo o estouro dos grãos de pólen pela cristalização da água no interior dos tecidos. Caso haja formação desses cristais, ocorre o rompimento da membrana celular, destruindo o pólen (ALMEIDA *et al.*, 2011). Esse teor de umidade considerado ótimo reduz o metabolismo do pólen a praticamente zero, permitindo, teoricamente, a manutenção de sua viabilidade por um período indefinido (SOUSA, 1996), porém quando úmido, o grão de pólen pode formar cristais de gelo durante o armazenamento, inviabilizando-os por danificar seus tecidos. Contudo, a dessecação demasiada do pólen pode reduzir sua capacidade germinativa por perder água de constituição (FRANÇA, 2008).

Barnabas *et al.* (1988) afirmam que a capacidade de fertilização de grãos de pólen de milho após armazenamento em nitrogênio líquido foi mais elevada nas amostras com teor de água de 13%, enquanto Kerhoas *et al.* (1987) asseguram que, se o pólen de milho conter menos de 15% de água, a sua viabilidade cai drasticamente.

Portanto, geralmente é aceita hipótese de que a redução da umidade do grão de pólen permite o sucesso no armazenamento em longo prazo, porém a qualidade do pólen parecer estar relacionada com a capacidade de tolerar o processo de desidratação (GUILLUY *et al.*, 1990). O baixo teor de umidade do pólen de 8 a 10% quando armazenado, propicia boa longevidade, pelo fato de evitar a formação de cristais de gelo no processo de congelamento, independentemente do método de armazenamento (SPRAGUE & JOHNSON, 1977). Já Yates *et al.* (1991) afirmam que para obter sucesso na conservação é necessário que o teor de água esteja entre 7% a 20% para o armazenamento em temperaturas entre - 5°C a - 196°C.

O teor de água no grão de pólen pode ser ajustado de acordo com soluções salinas saturadas conhecidas e dentre estas destacam-se: cloreto de magnésio hexa hidratado (MgCl₂.6H₂O); cloreto de sódio (NaCl); cloreto de lítio hidratado (LiCl.H₂O); (CONNOR& TOWILL, 1993; HONG *et al.*, 1999), sílica gel, dessecação a vácuo ou vapor de nitrogênio líquido (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Trabalhos já foram descritos, utilizando armazenamento de grãos de pólen obtendo resultados de sucesso e outros não. Alvim (2008) obteve 72% de germinação de milho conservados a baixas temperaturas, de 4°C - 196 °C, com umidade de 29%. Davide *et al.* (2009) analisaram a conservação de pólen de milho na temperatura de -10 °C e os resultados mostraram a baixa viabilidade na germinação do tubo polínico. Nesse sentido, os resultados mostraram que a temperatura de estocagem de 4 °C, com pólen desidratado com sílica gel azul proporcionam maior viabilidade de pólen, podendo este método ser empregado em programas de melhoramento para permitir cruzamentos entre genótipos com assincronia de florescimento.

Já em *Paspalum notatum* Flügge, Dinato (2016) observou que a criopreservação se apresentou adequada para a manutenção da viabilidade de grãos de pólen quando desidratados com cloreto de lítio por 30 minutos (70,06%) ou sílica gel azul por 120 minutos (66%). Em ambos os tratamentos, a viabilidade de pólen foi igual à da testemunha (pólen fresco) (68,52%).

A conservação de pólen também tem sido estudada em muitas outras famílias. Pólens de cactos do gênero *Hylocereu* (Berger) Britton & Rose, armazenados a 4, -18, -70 e -196°C por um período de três e nove meses teve sua viabilidade reduzida quando mantido a uma temperatura de 4°C, enquanto que o pólen congelado manteve seu índice de germinação semelhante ao do pólen fresco (METZ, NERD, & MIZRAHI, 2000). Casali, Pádua & Braz (1984) afirmam que a redução da temperatura no armazenamento prolonga a viabilidade do grão de pólen de *Capsicum* L., enquanto que Gomez *et al.* (2000), analisando pólen de amendoeiras durante oito semanas de armazenamento a temperaturas de 4 e 22°C, verificaram que a capacidade de germinação diminuiu drasticamente na temperatura de 22°C após a segunda semana, mas manteve 50% de viabilidade quando conservado a 4°C. Luza & Polito (1985), trabalhando com grãos de pólen

de plantas de noz europeia, concluíram que o aumento da temperatura e da umidade relativa no ambiente de armazenamento diminuíram drasticamente a viabilidade polínica.

Esses trabalhos demonstram que a criopreservação (armazenamento em nitrogênio líquido - NL a -196 ° C) é um método eficiente para conservação de pólen, já que este pode ficar armazenado por período de tempo indeterminado. Os outros métodos de conservação somente adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico, de acordo com o material e a espécie em questão. Entretanto, cada espécie se comporta diferentemente frente aos referidos processos, por isso é primordial que mais pesquisas e metodologias referentes a esta técnica sejam desenvolvidas (SOUSA, SCHEMBERG & AGUIAR, 2010).

Para o melhorista de plantas, a criopreservação de pólen é um aspecto importante, pois ele não necessita esperar pelo crescimento e florescimento da planta para obter o parental masculino, uma vez que a criopreservação de pólen permite: o cruzamento entre plantas que florescem em épocas diferentes; o cruzamento entre plantas que crescem em locais diferentes e distantes; menor transmissão de doenças que podem ter como vetores os próprios polinizadores e conservação do germoplasma por longos períodos de tempo (BAJAJ, 1995). Além disso, há vários benefícios principalmente para espécies que tenham longo período vegetativo, ou que floresçam poucas vezes ao ano, ou ainda para algumas plantas que são propagadas vegetativamente. Melhoristas de plantas podem ter armazenado pólen em NL como forma de aperfeiçoamento dos programas de melhoramento genético. A conservação de pólen deve, por essas razões, ser integrada aos BAGs. Para que o material genético do genitor feminino não seja perdido, a conservação de pólen deve ser uma alternativa adicional para a conservação de germoplasma e não um substituto para o armazenamento de sementes ou clones (TOWILL, 2000).

A criopreservação de pólen é um método simples e eficaz de armazenamento de pólen em longo prazo, pois o mesmo pode ser mantido em NL por muitos anos sem perda de suas capacidades essenciais para polinizar, fertilizar e frutificar quando utilizado em melhoramento de plantas, polinização controlada, ou para a conservação dos recursos genéticos vegetais (AKIHAMA, OMURA & KOSAKI (1979); TOWILL (1985)).

Bibliografia

- ABIEC. 5 razões para valorizar a pecuária bovina do Brasil. <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1378>, 2015. Acessado em 03/08/2016.
- AKIHAMA, T.; OMURA, M. & KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**. v. 13, n. 4, p. 238-241, 1979.
- ALISCIONI, S. S. Contribución a la filogenia del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae.) **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 89, n. 4, p. 504-523, 2002.
- ALMEIDA, C.; AMARAL, A. D.; NETO, J.; SERENO, M. D. M. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 493-497, 2011.
- ALMEIDA, S. P. de. Grupos fenológicos da comunidade de gramíneas perenes de um campo cerrado no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 1067-1073, 1995.

- ALVIM, P. de O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj, Y. P. S. **Cryopreservation of plant germplasm: I. Biotechnology in agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, 1995. p. 03-28.
- BARNABAS, B.; KOVACS, G.; ABRANYI, A.; PFAHLER, P. Effect of pollen storage by drying and deep-freezing on the expression of different agronomic traits in maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 39, n. 3, p. 221-225, 1988.
- BARRETO, I. L. **O Gênero Paspalum (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258 f. Tese (Livre Docência em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1974.
- BATISTA, L. A. R. & GODOY, R. Caracterização preliminar e seleção de germoplasma do gênero *Paspalum* para produção de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 23-32, 2000.
- BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. & REGITANO NETO, A. Recursos Genéticos de Forrageiras do Gênero *Paspalum* na Embrapa Pecuária Sudeste In: SIMPÓSIO DE RECURSO GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 1999, Brasília. **Resumos...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- BRS TAMANI, forrageira híbrida de *Panicum maximum*. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 2015. Folder
- BÜRGI, R. & PAGOTTO, D. S. Aspectos mercadológicos dos sistemas de produção animal em pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM: Inovações tecnológicas no manejo de pastagens, 19, 2002, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 217-231.
- BURTON, G. W.; GATES, R. N. & GASH, G. J. O. Response of Pensacola Bahiagrass to rates of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers. **Soil and Crop Science Society of Florida**, n.56, p. 31-35, 1997.
- CASALI, V. W. D.; PÁDUA, J. G. & BRAZ, L. T. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, ano 10, 1984, n.113, p.19.
- CASTRO, A.; TANIGUCHI, C.; SOUZA, F.H.D.de; SILVA, T.; CAFE, F.; ARAGAO, F.; LOGES, V. Evaluation of native Brazilian *Paspalum* germplasm as lawn for landscaping purpose. **Acta Horticulturae**, v. 1104, p. 505-509, 2015.
- CHASE, A. C. L. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the U.S. National Herbarium**, v. 28, p. 1-310, 1929.
- CONNOR, F. K. & TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, Wageningen, v. 68; p. 77-84, 1993.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: IRL Press Ltd, 1992. 250p.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F. da. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Ceres**. Viçosa, v. 5, n. 55, p. 433-438, 2008.
- DAVIDE, L.M.C, PEREIRA, R.C., ABREU, G.B., SOUZA, J.C. & PINHO, E.V.R.V. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** 8:199-206, 2009.
- DEAN, C. E. Effects of temperature and humidity on the longevity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen in storage. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 125-127, 1965.
- 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. São Carlos: UFSCar. 114p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2016.
- EINHARDT, P. M.: CORREA, E. R. & RASEIRA, M. C. comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de Pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, 2006.
- FERREIRA, C. A.; PINHO, E. V. de R. V.; ALVIM, P. de O.; ANDRADE, V. de; SILVA, T. T. de A. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.
- FRANÇA, L. V. **Secagem e conservação de grãos de pólen de berinjela**. 2008. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade de Brasília. Brasília, 2008.

- GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196°C). **Tropical Agricultural**, Surrey, v. 63, n. 1, p. 46-48, 1986.
- GEORGIEVA, L. D. & KURELEVA, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 72, p. 87-94, 1994.
- GOMES, M. J. I. R. **Estudos taxonômicos no gênero *Paspalum* L., grupos *Virgata* e *Quadrifaria*, no Brasil**. 1995. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP., 1995.
- GUILLOY, C. M.; GAUDE, T.; DIGONNET-KERHOAS, C.; CHABOUD, A.; HEIZMANN, P.; DUMAS, C. New data and concepts in angiosperm fertilization. In: **Mechanism of Fertilization: Plants to Humans**. Berlin Heidelberg: Springer, p. 253-270, 1990.
- HONG, T. D.; ELLIS, R. H.; BUITINK, J.; WALTERS, C.; HOEKSTRA, F. A.; CRANE, J. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in air-dry storage environments. **Annals of Botany**, v. 83, n. 2, p. 167-173, 1999.
- IBGE. **Censo Agropecuário 2006**: Resultados Preliminares. Rio de Janeiro, 2007. 146p.
- IMAIZUMI, T. & KAY, S. A. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. **Trends in plant science**, v. 11, n. 11, p. 550-558, 2006.
- JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; VALLE, C.B. do; RESENDE, M. D. V.; CHIARI, L.; CANCADO, L.J.; SIMIONI, C. **Melhoramento Genético de *Panicum maximum* Jacq.** In: Resende, R.M.S.; Valle, C.B. do; Jank, L. (Org.). Melhoramento de forrageiras tropicais. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 55-87, 2008.
- KARIA, C. T. & ANDRADE, R. P. de. **Cultivo do capim Pojuca**. Embrapa Cerrados, 2001.
- KERHOAS, C.; GAY, G. & DUMAS, C. A multidisciplinary approach to the study of the plasma membrane of *Zea mays* pollen during controlled dehydration. **Planta**, v. 171, n. 1, p. 1-10, 1987.
- LINSKENS, H. F. Pollen physiology. **Annual Review Plant Physiology**, v. 15, n. 1, p. 225-226, 1964.
- LUZA, J. G. & POLITO, V. S. *In vitro* pollen germination and storage of English walnut pollen. **Scientia Horticulture**, Davis, v. 27, n. 3-4, p. 303-316, 1985.
- MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa, R. A. (Ed.) **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 35-65, 2006.
- METZ, C.; NERD, A. & MIZRAHI, Y. Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 2, p. 199-201, 2000.
- MOREIRA, J. N.; ARAÚJO, G. G. L. & FRANÇA, C. A. Potencial de produção de leite em pastagens nativas e cultivadas no semi-árido. In: Simpósio Nordeste de Alimentação de Ruminantes, 10, 2006, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2006, p. 61-79.
- PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; VALENTE, E. E. L.; BARROS, L. V. Nutrição de bovinos em pastejo. In: Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem, 4, 2008, Viçosa, **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p. 131-170.
- PIZARRO, E. A. & CARVALHO, M. A. Cerrado: introducción y evaluación agronomica de forrajeras tropicales. **Reunión de Sábanas**, v. 117, 1992.
- QUARÍN, C. L.; VALLS, J. F. M. & URBANI, M. I. Cytological and reproductive behavior of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. **Tropical Grasslands**, v. 31, p. 114-116, 1997.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conversação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.
- SCHULTZE-KRAFT, R. Recolección de plantas nativas com potencial forrajero. In: SIMPÓSIO SOBRE PLANTAS FORRAGEIRAS, 1979, Campo Grande (MS). **Anais...** Brasília: EMBRAPA/CENARGEN/BID, 1980, p. 61-72 (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 1).
- SOUSA, V. A. de. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1996.

- SOUSA, V. A.; SCHEMBERG, E. A. & AGUIAR, A. V. Germinação in vitro do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham) **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 86, p. 147-151, 2010.
- SPRAGUE, J. R. & JOHNSON, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14, 1977. **Proceedings...** Macon: Eastern Tree Seed, 1977. p. 20-27.
- TIGHE, M. E. **Manual de recolección y manejo de polen de pinus tropicales y subtropicales procedentes de rodales naturales**. 1. ed, Carolina del Norte Estados Unidos: CAMOCORE, 2004. 20p.
- TOWILL, L. E. Germplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. ed. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 337-353.
- TOWILL, L. E. Low temperature and freeze-/vacuum-drying preservation of pollen. **Cryopreservation of plant cells and organs**, p. 171-198, 1985.
- WILLIAMS-LINERA, G. & MEAVE, J. Patrones fenológicos. In: Ecología y conservación de bosques neotropicales, R. M. Guariguata y G. H. Kattan (eds.). **Libro Universitario Regional, San José**, p. 591-624, 2002.
- YATES, I. E.; SPARKS, D.; CONNOR, K.; TOWILL, L. Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. **Journal of the American Society Hort. Sci.**, v. 116, n. 3, p. 430-434, 1991.
- ZULOAGA, F. O. & MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América Del Sur Austral** (Argentina, Bolivia, Sur Del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Missouri: Botanical Garden Press. 2005. 297 p.