

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Naiana Barbosa Dinato**

**CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum notatum*  
FLÜGGÉ VISANDO O USO DE ESPÉCIES DE FLORESCIMENTO ASSÍNCRONO  
EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO**

**São Carlos  
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA  
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Naiana Barbosa Dinato**

**CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum notatum*  
FLÜGGÉ VISANDO O USO DE ESPÉCIES DE FLORESCIMENTO ASSÍNCRONO  
EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Profa. Dr.<sup>a</sup> Alessandra Pereira Fávero

**São Carlos  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D583c Dinato, Naiana Barbosa  
Conservação a longo prazo de grãos de pólen de  
Paspalum notatum Flüggé visando o uso de espécies de  
florescimento assíncrono em programas de melhoramento  
genético / Naiana Barbosa Dinato. -- São Carlos :  
UFSCar, 2016.  
114 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Forrageiras. 2. Criopreservação. 3. Solução  
salina saturada. 4. Nitrogênio líquido. I. Título.



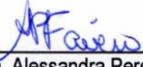
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

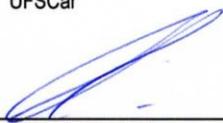
**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiana Barbosa Dinato, realizada em 26/02/2016:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Alessandra Pereira Fávero  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Alberto Acuña  
UNNE

Ao meu **pai**, Gilberto, meu herói, meu espelho e exemplo de sabedoria;  
A minha **mãe**, Eliete, minha estrela guia, minha vida;  
A minha **irmã**, Tatiana, minha amiga, conselheira, meu anjinho;  
A minha **avó**, Hilda, meu orgulho e exemplo de vida;  
Ao imenso amor, carinho, compreensão e apoio dado por eles,  
em todos os momentos de minha vida, dedico.

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar e acima de tudo a **Deus** pelo dom da vida e por estar sempre comigo em todos os momentos; por me dar sabedoria para lidar com as situações, prudência em meus atos e me guiar, proporcionando-me a conclusão de mais uma etapa de minha vida que se concretiza nesse trabalho.

À minha **mãe** Eliete Aparecida Barbosa Dinato e ao meu **pai** Gilberto Luiz Dinato, minha vida, por todo amor e carinho que sempre dedicaram a mim, sempre me incentivando, pelos esforços, pelo apoio na formação moral e intelectual dos seus filhos, vocês foram fundamentais nesta conquista, pois confiaram e acreditaram no meu potencial, sempre com muito amor e compreensão. Amo muito vocês!

À minha **irmã** Tatiana Barbosa Dinato, pelo apoio, pelo companheirismo e carinho que sempre tivemos, por sempre estar ao meu lado vibrando a cada conquista, pelos conselhos, por me ensinar a crescer a cada dia e me mostrar o melhor caminho a seguir, e pela colaboração no término deste trabalho. Minha menina, você a razão de minha vida, amo-te eternamente.

Aos meus **avós**, Hilda dos Santos Barbosa e João Batista Dinato, pelos ensinamentos e pelas orações, pelo apoio em todas as minhas conquistas, pelos conselhos nos momentos difíceis e pela força para vencer os obstáculos, principalmente a distância.

A todos os **familiares** que sempre torceram por mim, apoiando e incentivando.

À minha **orientadora-mãe** Alessandra Pereira Fávero, pela dedicação, despertando em mim sabedoria, estendendo a mão quando necessitei de palavras de conforto e amizade, estimulando e motivando para que eu continuasse nessa caminhada, pelo apoio e ensinamentos a mim transmitidos como também pela sua contribuição para meu crescimento profissional e pessoal, pelas horas de alegria na sala de aula, com aulas descontraídas e estimulantes, durante essa jornada você me mostrou em cada momento, compreensão, luta,

paciência e inteligência, carregarei para sempre na bagagem da vida o ensinamento adquirido, o meu sincero obrigada.

Ao **Dr. Camilo Quarín**, pela sua contribuição neste estudo e pelos ensinamentos e amizade construídos, pelas valiosas sugestões, obrigada pela colaboração no desenvolvimento do projeto.

À **Dra. Izulmé Rita Imaculada Santos**, pelo apoio e treinamento prestados, pela amizade e a oportunidade de crescimento intelectual.

A todos os meus colegas e companheiros de estrada, em especial aos meus **amigos da graduação**, Cristiane Bolina, Francielle Queiroz, Gefferson Silva, Camila Marcos, Fernanda Marques, e minha **amiga** Tatiane Campos, pela amizade sincera, pela alegria e motivação transmitida a cada desafio enfrentado por mim, pelo companheirismo, por me ensinarem a ser melhor a cada dia e por voar junto comigo em meus sonhos e medos, sempre buscando uma maneira de ajudar, incentivando a continuar nessa jornada.

Aos **colegas** de São Carlos, Nahyda, Mônica, Nádia, Ailton, Tiago, Gabrielle, Rodrigo, Jéssica, Camila pela grande ajuda durante a fase de coleta de material deste estudo, pelo companheirismo e pela bela amizade construída e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Aos **amigos** Jhonne Pedott e Naiane Godoy, pela amizade sincera, pelos conselhos, pelo apoio e por estarem sempre comigo quando precisei, pois, sem vocês, tudo teria sido bem mais difícil!!

A todos os **professores** que contribuíram para o meu conhecimento e minha formação, sempre preocupando de deixar algo além do saber.

Ao **Laboratório** de Citogenética da UFSCar, em especial ao professor Dr. Marcelo de Bello Cioffi pelo apoio na fase final desse trabalho.

Aos **funcionários** da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo apoio e atenção e pela ajuda durante a condução do experimento, em especial ao, Natal Silvestre, Emar José Fagundes (Mineiro), Carlos Henrique Garcia, Márcio Dias Rabelo, Gilberto Cesar Agostinho e Dr. Wilson Malagó Jr., pela ajuda na utilização dos laboratórios e da casa de vegetação.

Só existe uma maneira de retribuir todo esse carinho e dedicação oferecido durante esses anos, sendo para vocês, o que são para mim! Obrigada por tudo, carregarei no coração, a lembrança de cada momento compartilhado, de cada sorriso e lágrimas derramadas, hoje fica a certeza que existem pessoas que jamais serão esquecidas, essas são vocês!!!

À Universidade Federal de São Carlos UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular PPGGEv pela oportunidade de realização deste mestrado em especial à secretária Ivanildes Menezes pelo apoio e dedicação nas horas que mais precisei.

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

À **banca**, por aprimorar esse trabalho, fornecendo subsídios para a melhoria deste.

E a **todos** aqueles que de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão deste trabalho e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu agradecimento.

**MUITO OBRIGADA!**

# CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum notatum* FLÜGGÉ VISANDO O USO DE ESPÉCIES DE FLORESCIMENTO ASSÍNCRONO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

## Resumo

*Paspalum* é o mais importante gênero da família Poaceae nas Américas, com cerca de 330 espécies e ocorre em todo Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai. No Brasil, a exceção do Bioma Pampa, o uso deste gênero como forrageira plantada ainda é muito pequeno. As espécies pertencentes ao grupo informal Plicatula são consideradas entre as mais promissoras pela qualidade forrageira. A grande maioria dos acessos de *Paspalum* é tetraplóide e apomítico. São raros os citotipos de espécies do grupo Plicatula sexuais. Para agregar características localizadas em acessos distintos, é necessário cruzar espécies sexuais já em nível tetraplóide com genótipos apomíticos promissores e selecionar os que tem melhores características agrônomicas. Para isso, há a necessidade de sincronização de florescimento entre os genitores. Uma ferramenta interessante para isso é a criopreservação de pólen. A espécie *P. notatum*, conhecida popularmente como grama-batatais, do grupo informal Notata, é muito usada nos Estados Unidos para produção de forragem. Já foram observados acessos diplóides e tetraplóides dessa espécie, sendo fácil a obtenção de grande quantidade de pólen. A proposta desse trabalho foi estudar a criopreservação de pólen de *P. notatum*, como um modelo, para futuramente conservar e sincronizar o florescimento de outras espécies com características de interesse para o melhoramento. Os grãos de pólen de *P. notatum* foram coletados em campo na Embrapa Pecuária Sudeste. Foram testados quatro agentes de desidratação (LiCl, MgCl<sub>2</sub>, NaOH e sílica gel) e um tratamento sem desidratação, todos por três tempos distintos (30, 60 e 120 minutos). Após descongelamento lento, os grãos de pólen foram avaliados quanto à viabilidade por coloração com solução de tetrazólio 0,25% e por germinação *in vivo* via fluorescência. A viabilidade de grãos de pólen recém-colhidos também foi avaliada como controle. Para efeitos de comparação, foram armazenados grãos de pólen em condições de freezer e geladeira, por um período de 10, 60, 120 e 180 dias. Os dados demonstraram que a desidratação de pólen de *Paspalum notatum* com cloreto de lítio por 30 minutos e sílica gel por 120 minutos foi adequado no armazenamento em nitrogênio líquido e em freezer, pois a viabilidade permaneceu igual aos grãos de pólen recém-colhidos

(testemunha). A conservação de pólen em geladeira sem desidratação por até 10 dias pode ser uma alternativa em situações de armazenamento a curto prazo. A conservação de pólen em freezer por até 60 dias também pode ser uma alternativa, já que além dos tratamentos citados acima, resultados de desidratação com cloreto de magnésio desidratado por 30 e 60 minutos e hidróxido de sódio desidratado por 60 e 120 minutos também foram estatisticamente iguais a testemunha. O uso do corante de tetrazólio e da técnica de germinação *in vivo* foram eficientes para a avaliação da viabilidade de grãos de pólen após o armazenamento de nitrogênio líquido. O uso do corante de tetrazólio também foi eficiente para a avaliação dos grãos de pólen após o armazenamento em freezer e em geladeira.

**Palavras-chave:** forrageiras, criopreservação, solução salina saturada, nitrogênio líquido

**LONG-TERM PRESERVATION OF POLLEN GRAINS of *Paspalum notatum*  
FLÜGGÉ AIMING THE USE OF ASYNCHRONOUS FLOWERING SPECIES IN  
GENETIC BREEDING PROGRAMS**

**Abstract**

*Paspalum* is the most important genus of Poaceae family in the Americas, with about 330 species and occurs throughout Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina and Uruguay. In Brazil, except for the Pampa Biome, the use of species of this genus as a cultivated forage is still very small. Species of the informal group Plicatula are among the most promising *Paspalum* genotypes for forage quality. The majority of *Paspalum* accessions is tetraploid and apomictic. The sexual cytotypes are rare in the Plicatula group. To add features located in different accessions, it is necessary to cross sexual species in tetraploid level with apomictic genotypes that are interesting to breeding programs and select those that have better agronomic characteristics. For the occurrence of hybridization, the flowering synchronization between parents is essential. An interesting tool for this is the cryopreservation of pollen. *P. notatum*, popularly known as bahiagrass, is a species from Notata group and is widely used in the United States as forage. Diploid and tetraploid accessions are observed in this species and, it is easy to obtain large amounts of pollen. The purpose of this study was to evaluate the cryopreservation of pollen of *P. notatum*, as a model for future conservation and synchronization of flowering of other species that are interesting for breeding program. The *P. notatum* pollen grains were collected in the field at Embrapa Southeast Livestock. Four dehydrating agents were tested (LiCl, MgCl<sub>2</sub>, NaOH and Silica gel) with three distinct periods of exposition (30, 60 and 120 minutes). After slow thawing, pollen grains were evaluated for viability by staining with tetrazolium solution 0.25% and in vivo germination by fluorescence. The viability of fresh pollen grains was also evaluated as a control. For comparison, pollen grains were stored in freezer and refrigerator conditions for a period of 10, 60, 120 and 180 days. The data showed that the dehydration of *Paspalum notatum* pollen with lithium chloride during 30 minutes and silica gel during 120 minutes was adequate for the conservation in liquid nitrogen and freezer as the viability of pollen after this treatment remained equal to the control. The pollen preservation in the refrigerator without dehydration since 10 days may be an alternative for short-term storage situations. Dehydration results with dehydrated magnesium chloride for 30 and 60 minutes and dehydrated sodium hydroxide for 60 and 120

minutes were also statistically similar to the control. The use of the tetrazolium solution and *in vivo* germination were an effective technique to evaluate the viability of pollen grains after liquid nitrogen conservation. The use of tetrazolium was also efficient for the evaluation of pollen grains after storage in freezer and refrigerator.

**ketwords:** forage crop, cryopreservation, saturated salt solution, liquid nitrogen

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Grão de pólen ocorrente nos Campos do Sul do Brasil. A: <i>Paspalum notatum</i> ; Escala: 10 $\mu\text{m}$ .....	39
<b>Figura 2.</b> Formação do trifenilformazan a partir da reação química do sal de tetrazólio com hidrogênio.....	61
<b>Figura 3.</b> Inflorescências colocadas em copo plástico com água cobertas com saquinho de papel. ....	65
<b>Figura 4.</b> Inflorescências agitadas para liberação de grãos de pólen.....	66
<b>Figura 5.</b> Grãos de pólen de <i>Paspalum notatum</i> .....	66
<b>Figura 6.</b> Dissolução do sal (hidróxido de sódio) em água destilada (5 ml) .....	67
<b>Figura 7.</b> Caixa gerbox com placas de petri contendo o sal saturado e os grãos de pólen para a desidratação .....	67
<b>Figura 8.</b> A: Grãos de pólen armazenados em cápsula gelatinosa. B: detalhe da cápsula gelatinosa.....	68
<b>Figura 9.</b> Grãos de pólen armazenados em tanque com nitrogênio líquido .....	70
<b>Figura 10.</b> Médias de grãos de pólen viável (%) de <i>Paspalum notatum</i> e respectivos desvios padrão após 13 tratamentos de desidratação seguidos de conservação em nitrogênio líquido por 24h. H = hidratado, T=testemunha.....	75
<b>Figura 11.</b> Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio após a criopreservação. A: tratamento com LiCl por 30 minutos; B: tratamento com Sílica por 120 minutos; C: Testemunha. D: Pólen sem desidratação no NL. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis.....	76
<b>Figura 12.</b> Médias de grãos de pólen viável (%) de <i>Paspalum notatum</i> e respectivos desvios padrão após 13 tratamentos de desidratação seguidos de conservação em freezer por quatro períodos distintos (10, 60, 120, 180 dias). H = hidratado, T=testemunha.....	79
<b>Figura 13.</b> Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em freezer – melhores tratamentos. A: tratamento com NaOH por 120 minutos armazenado por 10 dias; B: tratamento com Sílica por 120 minutos armazenado por 10 dias; C: tratamento	

com LiCl por 30 minutos armazenado por 10 dias; D: tratamento com MgCl<sub>2</sub> por 30 minutos armazenado por 60 dias. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis..... 80

**Figura 14.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em freezer – piores tratamentos. A: Pólen tratado com NaOH por 120 minutos armazenado por 180 dias; B: pólen sem desidratação armazenado por 180 dias; C: pólen tratado com sílica por 30 minutos armazenado por 180 dias. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis..... 81

**Figura 15.** Médias de grãos de pólen viável (%) de *Paspalum notatum* e respectivos desvios padrão após 13 tratamentos de desidratação seguidos de conservação em geladeira por quatro períodos distintos (10, 60, 120, 180 dias). H = hidratado, T=testemunha..... 83

**Figura 16.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em geladeira – melhores tratamentos. A: pólen sem desidratação, armazenado por 10 dias; B: pólen tratado com LiCl por 30 minutos armazenado por 10 dias; C: pólen sem tratamento de desidratação, armazenado por 60 dias D: testemunha. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis..... 84

**Figura 17.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em geladeira – piores tratamentos. A: Pólen tratado com NaOH por 120 minutos armazenados por 120 dias; B: Pólen tratado com MgCl<sub>2</sub> por 120 minutos armazenado por 180 dias. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis..... 84

**Figura 18.** Imagens dos grãos de pólen submetidos a germinação *in vivo* após conservação em nitrogênio líquido. Pólen com tubo polínico são viáveis e sem tubo polínico são inviáveis. A: pólen tratado com Sílica por 120 minutos armazenado em nitrogênio líquido, por 1 dia, objetiva de 20x; B: testemunha objetiva de 10x C: Pólen sem desidratação armazenado NL; D: Pólen tratado com LiCl por 120 minutos armazenado no NL; E: Pólen tratado com MgCl<sub>2</sub> por 120 minutos, armazenado no NL. Seta branca: pólen com tubos polínicos e viáveis. Seta vermelha: grãos de pólen sem tubo polínico e inviáveis. .... 88

**Figura 19.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e com germinação *in vivo* – melhores tratamentos. A: germinação de grão de pólen tratado com Sílica gel por 120 minutos armazenado no NL; B: viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio tratado com Sílica por 120 minutos armazenado em NL; C: testemunha na avaliação da germinação *in vivo*; D: testemunha na avaliação por coloração com tetrazólio. Seta branca e azul: viáveis. .... 90

**Figura 20.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e com germinação *in vivo* – piores tratamentos. A: germinação de grão de pólen sem tratamento de desidratação armazenado no NL; B: viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio sem tratamento de desidratação armazenado em NL; C: germinação de grão de pólen tratado com LiCl por 120 minutos, armazenados no NL; D: viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio tratado com LiCl por 120 minutos, armazenado em NL. Seta vermelha: inviáveis.....91

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Tratamentos utilizados para desidratação de grãos de pólen de <i>P. notatum</i> para conservação em geladeira, freezer e criotanque.....	69
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de grãos de pólen viáveis por coloração de <i>Paspalum notatum</i> após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após 24 horas de armazenamento em nitrogênio líquido (NL). C1: pólen recém colhido sem desidratação e não submetido ao NL (testemunha); C2: pólen hidratado submetido ao NL.....	75
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de grãos de pólen viáveis de <i>Paspalum notatum</i> após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em freezer por 10, 60, 120 e 180 dias. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado.....	78
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de grãos de pólen viáveis de <i>Paspalum notatum</i> após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em geladeira por 10, 60, 120 e 180 dias. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado.....	82
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de grãos de pólen viáveis de <i>Paspalum notatum</i> após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em geladeira e freezer por um período de 10, 60, 120 e 180 dias, e em nitrogênio líquido por um período de 1d (24h). C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado nos três locais citados.....	86
<b>Tabela 6.</b> Porcentagem de grãos de pólen viáveis via técnica de germinação <i>in vivo</i> de <i>Paspalum notatum</i> após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em nitrogênio líquido por um período de 24h. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado.....	87
<b>Tabela 7.</b> Porcentagem de grãos de pólen viáveis de <i>Paspalum notatum</i> via técnica de germinação <i>in vivo</i> (g) e coloração com tetrazólio (c) após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em em nitrogênio líquido por um período de 24h. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado.....	89

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

DMSO – Dimetil sulfóxido

EMC – Teor de umidade de equilíbrio

F.A.A. – 1: formaldeído, 1: Ácido Acético glacial, 8: Álcool etílico 80%

FCR – Fluocromático

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IIHR – Indian Institute for Horticultural Research

NBPGR – National Bureau for Plant Genetic Resources

NCGRP – National Center for Genetic Resources Preservation

NL – Nitrogênio líquido

PIB – Produto Interno Bruto

SAS – Statistical Analysis System

SI – Sistemas de autoincompatibilidade

Syn. – Sinônimo

TCT – Trifenil cloreto de tetrazólio

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	23
3.1 A importância agropecuária das gramíneas .....	23
3.2 O gênero <i>Paspalum</i> .....	25
3.3 <i>Paspalum notatum</i> .....	27
3.4 Definição de apomixia .....	30
3.5 A fenologia reprodutiva .....	35
3.6 Características morfológicas de grãos de pólen da família Poaceae .....	38
3.7 Conservação de grãos de pólen em diversas culturas .....	39
3.8 Criopreservação em culturas vegetais .....	49
3.9 Métodos de desidratação de grãos de pólen.....	56
3.10 Estudos de viabilidade de grãos de pólen pelo método de coloração .....	59
3.10.1 Tetrazólio.....	61
3.11 Germinação <i>in vivo</i> via fluorescência.....	62
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	65
4.1 Coleta e armazenamento de grãos de pólen.....	65
4.2 Desidratação de grãos de pólen por meio de sais saturados .....	66
4.3 Criopreservação .....	70
4.4 Avaliação da viabilidade de pólen após conservação pelo método de coloração...	70
4.5 Viabilidade de pólen por germinação <i>in vivo</i> via fluorescência .....	71

4.6 Análise estatística .....	72
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
5.1 Criopreservação .....	73
5.2 Conservação de grãos de pólen em freezer.....	76
5.3 Conservação de grãos de pólen em geladeira .....	81
5.4 Análise conjunta de todos os tratamentos em todos os ambientes .....	84
5.5 Germinação <i>in vivo</i> via fluorescência.....	87
5.6 Comparação da técnica de coloração com tetrazólio e germinação <i>in vivo</i> .....	89
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com as estimativas da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - ABIEC, em 2015, a quantidade de carne bovina exportada pelo Brasil foi aproximadamente de 1,3 milhão de toneladas. Logo, o agronegócio da pecuária bovina tem expressiva contribuição no PIB da agropecuária brasileira. A produção pecuária se baseia principalmente no uso de pastagens, dado a grande extensão territorial e o clima favorável.

A pecuária brasileira ocupa aproximadamente 120 milhões de hectares do território nacional (MACEDO, 2006). Atualmente, a adoção de cultivares forrageiras tropicais pelos produtores se resumem a um número reduzido de cultivares, principalmente pertencentes ao gênero *Urochloa* (Syn. *Brachiaria*), na sua maioria de origem africana, ocupando 80% da área plantada com pastagem (MACEDO, 2006).

Além disso, todos os cultivares existentes são apomíticos logo, a variabilidade dentro do cultivar é muito pequena dado ao sistema reprodutivo. Todos estes fatores tornam o sistema altamente vulnerável a pragas já existentes e futuras. Isto pode ser exemplificado com a situação da infestação de pastagens de *Brachiaria decumbens* Stapf. Prain. na região Centro-Oeste com cigarrinha-das-pastagens (COSENZA, 1982) e a observação da “Síndrome da Morte Súbita” em pastagens de *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf. na Região Norte e Centro-Oeste (DIAS FILHO, 2011).

Dentro da biodiversidade brasileira, destaca-se, o gênero *Paspalum*. Sendo nativo, as espécies deste gênero oferecem menores riscos de provocar desequilíbrio ecológico com a introdução de doenças e pragas desconhecidas quando utilizadas em culturas extensivas como gramados e pastagens.

*Paspalum* é o gênero mais importante dentro da família Poaceae nas Américas (ALISCIONI, 2002; BARRETO, 1974; CHASE, 1929; GOMES, 1995). Dentro do gênero, há diversas espécies nativas do Brasil com um alto valor forrageiro. Esta realidade fundamenta o interesse por introduzir espécies deste gênero ao cultivo e melhorá-las geneticamente para explorar ainda mais seu potencial em monocultivos extensivos. O gênero compreende cerca de 330 espécies distribuídas em regiões

tropicais, subtropicais e temperadas basicamente no continente americano (ZULOAGA; MORRONE, 2005). Ocorre em todo Brasil, no leste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (QUARÍN et al., 1997). No Uruguai, Paraguai, Argentina e Brasil ocorrem cerca de três quartos das espécies conhecidas, em diferentes condições ecológicas, e nas mais variadas formações vegetais (BARRETO, 1974).

Apesar de o Brasil estar entre os países com maior diversidade genética de *Paspalum* disponível, o uso desta é ainda muito pequeno como forrageira. As poucas variedades de *Paspalum* disponíveis no mercado foram obtidas através da seleção de germoplasma nativo. Já em outros países, como nos Estados Unidos, diversas espécies de *Paspalum* nativas do Brasil, como *Paspalum notatum* Flüggé, *P. dilatatum* Poir., *P. plicatulum* Michx. e *P. guenoarum* Arechav., são utilizadas, com sucesso (ACUÑA et al., 2011). A grama pensacola (*Paspalum notatum* cv Pensacola), cuja origem é no sul do continente americano, é utilizada principalmente na região Sul do Brasil como forrageira cultivada e, atualmente está bastante difundida no sul dos Estados Unidos, principalmente na Flórida. Nesse país, se semeia muitos milhões de hectares de *Paspalum* principalmente *P. notatum* (BURTON et al., 1997).

São Paulo é o estado brasileiro com o maior número de espécies de *Paspalum* catalogadas (Projeto Flora Fanerogâmica). 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. Diversos trabalhos publicados desenvolvidos na Embrapa Pecuária Sudeste mostram o grande potencial forrageiro das espécies conservadas no Banco de Germoplasma (BATISTA; GODOY, 1992a, 1992b, 2000; BATISTA et al., 1995, 1999). Um desses grupos, o Grupo Plicatula, caracterizado por possuir antécio castanho-escuro a atropureo e brilhante e lema inferior com ondulações transversais (CHASE, 1929), se destaca por abrigar diversas espécies de grande potencial forrageiro, como *Paspalum atratum* Swallen, *P. plicatulum*, *P. guenoarum*, *P. glaucescens* Hack. e outras. Dos 332 acessos do BAG, 240 são do grupo Plicatula. Este grupo é considerado complexo, com mais de 30 espécies, sendo que muitas das espécies são difíceis de diferenciação devido a gradações morfológicas (AGUILLERA et al., 2011). Algumas cultivares foram lançadas em diversos países como Austrália, Argentina e Estados Unidos sendo estes ecótipos de espécies do Grupo Plicatula como *P. plicatulum*, *P. nicorae* Parodi, *P. atratum* e *P. guenoarum* (EVERS; BURSON, 2004).

A grande maioria dos acessos de *Paspalum* é tetraplóide com 40 cromossomos e de comportamento apomítico. A apomixia é um caráter muito interessante em um programa de melhoramento, pois, apesar do genótipo ter vários caracteres em heterozigose, a apomixia possibilita a multiplicação de sementes e a obtenção de progênes uniformes. Contudo, possuir apenas genótipos apomíticos em uma coleção limita o avanço do programa de melhoramento, pois ficam impossibilitados os cruzamentos intra e interespecíficos. São raros os citotipos de espécies do grupo Plicatula com 20 cromossomos e sexuais, a maioria são tetraploides e apomíticos (AGUILLERA et al., 2011). Alguns citotipos de algumas espécies foram descobertos como possuidores de 20 cromossomos, como *P. compressifolium* Swallen (QUARÍN et al., 1996), *P. glaucescens* (PRITCHARD, 1962), *P. plicatulum* (ESPINOZA; QUARÍN, 1997), *P. lenticulare* Kunth. (ESPINOZA et al., 2001), *P. wrightii* Hitchc. & Chase (MARTÍNEZ; QUARÍN, 1999). A descoberta de citotipos diplóides e sexuais e a otimização de protocolos de poliploidização dos mesmos viabilizou os cruzamentos intra e interespecíficos no gênero *Paspalum* em alguns grupos no mundo (AGUILERA et al., 2011; GATES et al., 2004). Para que seja possível agregar características de interesse localizadas em acessos distintos, é necessário cruzar os acessos ao nível tetraplóide e selecionar os melhores ao longo do programa de melhoramento. No gênero *Paspalum*, os acessos sexuais possuem 20 cromossomos, fazendo-se necessária a poliploidização e posteriormente o cruzamento destes acessos com plantas apomíticas. Quatro espécies tiveram acessos tetraploidizados até o momento: *P. notatum* (FORBES; BURTON, 1961 citado por AGUILLERA et al., 2011), *P. hexastachyum* Parodi (QUARÍN; HANNA, 1980), *P. simplex* Morong (CÁCERES et al., 1999) e *P. plicatulum* (SARTOR et al., 2009). Dentro de outros programas de melhoramento das espécies forrageiras tropicais, *Brachiaria* spp., e *Megathyrsus maximum* (Jacq.) (Syn. *Panicum maximum*), há uma tendência relativamente recente na redução de lançamento de cultivares baseados em ecótipos e início de desenvolvimento de híbridos para lançamento dos mesmos no mercado (JANK et al., 2008; VALLE et al., 2008).

Contudo, a obtenção de indivíduos sexuais tetraplóides e cruzá-los com os acessos apomíticos visando unir características de interesse como alta produção, baixa estacionalidade, alta qualidade bromatológica, algumas vezes não é tão simples. Há a necessidade primeira de sincronização de florescimento entre os genitores. Há diversas espécies do grupo Plicatula, como por exemplo, *P. guenoarum* ou *P.*

*plicatum* que florescem, nas condições de São Carlos, entre janeiro a março. Porém, há espécies como *P. atratum* que possui o florescimento mais tardio, como abril-maio. À princípio, as duas espécies citadas acima possuem a capacidade de se cruzar quando há uma espécie sexual do grupo *Plicatula* sendo utilizada como espécie-ponte. Porém não há sincronia de florescimento. Uma ferramenta aplicável a essa situação, é o armazenamento de grão de pólen, visando preservar a viabilidade dos gametas masculinos por diferentes períodos, sob condições artificiais (FERREIRA et al., 2007).

A espécie *P. notatum*, conhecida popularmente como grama-batatais, tem sido amplamente utilizada em programa de melhoramento nos Estados Unidos e na Argentina (ACUÑA et al., 2011) para produção de forragem. Já foram observados acessos diplóides e tetraplóides dessa espécie (QUARÍN, 1999), sendo de fácil obtenção de grande quantidade de pólen e de hibridações intraespecíficas. Por isso, foi escolhida como modelo para estudo de conservação de grãos de pólen, para posteriormente, testar a mesma técnica em outras espécies do mesmo gênero.

A viabilidade do pólen pode ser influenciada por fatores fisiológicos, genéticos e físicos do grão de pólen e pelas condições de armazenamento, como temperatura e umidade. A longevidade do grão de pólen está relacionada também ao teor de água do mesmo, pois essa taxa influencia na conservação e armazenamento do pólen. Portanto, é necessário reduzir o teor de água, o que contribui também à redução da atividade metabólica e ação microbiana (STANLEY; LINSKEN, 1974).

Um dos métodos de conservação que se mostra eficaz para grão de pólen é a criopreservação, que é a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a – 196°C ou em sua fase de vapor a – 150°C. A capacidade de sobrevivência dos tecidos vegetais à criopreservação depende de sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido - 196°C (SANTOS, 2000). O sucesso da criopreservação independe do tempo de armazenamento, depende da umidade e da temperatura (DEAN, 1965; GANESHAN, 1986; LINSKENS, 1964). Contudo, não há relatos na bibliografia de estudos de conservação a longo prazo utilizando criopreservação de grãos de pólen em *Paspalum*.

Diversos trabalhos já foram publicados utilizando com sucesso o cloreto de tetrazólio (GAALICHE et al., 2013; LANSAC et al., 1994) e a germinação *in vitro* (GRASSO, 2012) na identificação da viabilidade de grãos de pólen. Apesar das técnicas de coloração e germinação *in vitro* darem uma aproximação segura da viabilidade dos

grãos de pólen, a forma mais garantida de que o pólen realmente se mantém viável ainda é fazendo-o germinar.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi estudar a criopreservação de pólen de *Paspalum notatum*, como um modelo, para futuramente conservar e utilizar esta e outras espécies do gênero *Paspalum* em cruzamentos intra e interespecíficos viabilizando avanços no programa de melhoramento genético de *Paspalum*. Para confirmar a real necessidade de conservação em nitrogênio líquido, metodologia foi também avaliada em condições de geladeira e freezer, para situações de curto e médio prazo.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) Identificar os melhores agentes de desidratação de pólen e os tempos de desidratação mais adequados para a conservação em nitrogênio líquido, comparando com outras formas de conservação a curto e médio prazo (geladeira e freezer)
- b) Comparar testes de viabilidade de pólen por coloração com solução de tetrazólio após a retirada de amostras conservadas em nitrogênio líquido, geladeira e freezer e por germinação *in vivo* após a retirada de amostras conservadas em nitrogênio líquido.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A importância agropecuária das gramíneas

Nas quatro últimas décadas, o setor agropecuário exerceu papel determinante na abertura de novas fronteiras no processo de desenvolvimento do Brasil, especificamente no bioma dos Cerrados. Na área agrícola, o cultivo de grãos e a pecuária se destacaram neste processo, obtendo melhorias significativas com a implantação de pastagens cultivadas com forrageiras tropicais (GONÇALVEZ; FRANCHINI, 2007).

De acordo com Paulino et al. (2008), a atividade com maior expressão no uso da terra no Brasil é a pecuária, com um rebanho estimado em 180 milhões de cabeças, constituindo o maior rebanho bovino comercial do mundo, para os quais a pastagem é a base alimentar (BÜRGI; PAGOTO, 2002), perfazendo 99% da dieta consumida por estes animais.

Segundo dados estatísticos do Censo Agropecuário realizado pelo 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.

Sendo assim, o interesse em pesquisas sobre plantas forrageiras tem aumentado consideravelmente na América do Sul, já que um dos principais fatores limitantes à produtividade pecuária é a falta de alimentação adequada para o gado (BATISTA; GODOY, 2000). Assim, pesquisas têm sido implementadas com o objetivo de selecionar cultivares mais produtivas e que estejam melhor adaptadas às condições dos diversos ecossistemas sul americanos (SCHULTZE-KRAFT, 1980).

Como característica das áreas destinadas a pastagem, podemos destacar a monocultura de gramíneas, estabelecida após o desmatamento de floresta ou em substituição a outros tipos de vegetação nativa (MOREIRA et al., 2006), implementada através do intercâmbio de germoplasma exótico, principalmente do continente africano, de onde foram introduzidas espécies dos gêneros *Andropogon*, *Brachiaria*, *Panicum* e espécies nativas da própria região, como o gênero *Paspalum* (BATISTA; GODOY, 2000).

Apesar de a pastagem ser o alimento mais abundante e barato no Brasil, existem poucas espécies gramíneas forrageiras nativas lançadas no mercado, o que levou a introdução de espécies oriundas de outros países, delimitando a eficiência do processo produtivo e tornando a pecuária nacional vulnerável a qualquer alteração brusca no ecossistema. Essa vulnerabilidade tem causado um grande impacto negativo na sustentabilidade econômica das agroindústrias, principalmente as de carne e leite, gerando prejuízos em escala nacional (BATISTA; GODOY, 1998).

Atualmente, a susceptibilidade aos ataques de pragas e/ou doenças em espécies forrageiras limita a capacidade produtiva da pecuária brasileira. Isto se deve ao fato de que a pecuária brasileira é sustentada por um número muito restrito de espécies forrageiras lançadas e adotadas (STRAPASSON et al., 2000). Quando um único genótipo apresenta grande expansão, o que vem acontecendo frequentemente com gramíneas forrageiras apomíticas ou propagadas por via vegetativa, o perigo se torna mais elevado (BATISTA; GODOY, 2000).

Este problema pode ser evitado com a utilização de espécies nativas, como as do gênero *Paspalum*, representando menores riscos em relação ao desequilíbrio biológico, devido à grande diversidade genética existente. Este gênero compreende mais de 400 espécies tropicais e subtropicais e é caracterizada por sua adaptabilidade a diferentes ecossistemas (STRAPASSON et al., 2000), as espécies apresentam boa resistência à seca, suporta queimadas e tolera baixas temperaturas, são recomendadas para formação de pastagens, gramados, controle da erosão, conservação de taludes, formação de piquetes para criação de cavalos, bezerros entre outros (TORACIO et al., 2013).

A importância do gênero *Paspalum* é evidenciada de acordo com alguns dos grupos botânicos desse gênero, como Notata e Dilatata, devido seu intenso cultivo em determinadas regiões do País, como a grama pensacola (*P. notatum* var. *saurae* cv. Pensacola) no Sul e a grama batatais (*P. notatum* Flüggé) na Região Centro-Sul. As espécies desse gênero vegetam bem em solos arenosos e pobres como do Cerrado, intensificando a pouca exigência dessas em relação a fertilidade do solo, isso pode ser observado através da invasão das pastagens e outras gramíneas em solos degradados. Além disso, elas apresentam excelente resistência ao pisoteio, fogo e cortes contínuos (BATISTA; GODOY, 1998).

### 3.2 O gênero *Paspalum*

O gênero *Paspalum* possui de 300 (BARRETO, 1974) a 400 (CHASE, 1929) espécies, que vivem em diversos locais, vegetando em condições de clima quente, tropical, subtropical e temperado. De origem americana e abundantes no Brasil, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai, estima-se a ocorrência de 210 espécies no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2015). Este gênero pertence à tribo *Paniceae* R.Br. s.s., subfamília *Panicoideae* e família *Poaceae* (BARRETO, 1974). A tribo *Paniceae* inclui 84 gêneros e aproximadamente 1500 espécies de gramíneas (MORRONE et al., 2012; SORENG et al., 2015). Apresentam características relevantes, como inflorescência em panícula, racemo ou espiga, além de espiguetas plano convexas, com lema II e gluma II adaxiais à ráquis, e o ápice da lamina foliar geralmente agudo (BOLDRINI et al., 2005).

*Paspalum* é um dos mais importantes gêneros da tribo, já que possui um elevado número de espécies com ampla distribuição geográfica e importância econômica. São plantas anuais ou perenes, de regiões tropicais, subtropicais e algumas de clima temperado encontradas principalmente na América, com poucas espécies no Velho Mundo. Apresentam características que o diferencia dos demais gêneros, como plantas cespitosas, estoloníferas ou rizomatosas, língulas membranáceas, lâminas lanceoladas, linear a filiformes, planas a conduplicadas de pilosidade variável, as inflorescências são compostas por um a inúmeros racemos espiciformes unilaterais, solitários, em pares ou em panículas racemosas. As raquis dos racemos são tríquetras a planas, estreitas ou amplamente aladas, as espiguetas estão solitárias ou em pares, são pilosas, orbiculares a elipsóides ou ovóides, dorsoventralmente comprimidas, planoconvexas a côncavo-convexas. Há a ausência ou presença mínima de gluma inferior (rudimentar), gluma superior está presente, tão larga quanto a espiguetas ou menor, por vezes, ausente; presença de lema inferior tão larga quanto a espiguetas; pálea inferior presente ou ausente; flor inferior neutra, às vezes estaminada; antécio superior fértil de consistência variável, membranáceo a crustáceo, de coloração palha a castanho-escuro ou negro na maturidade, liso ou papiloso; lema, com margens geralmente enroladas na pálea com o dorso do fruto voltado para o ráquis do racemo (ZULOAGA; MORRONE, 2005). Este gênero tem ocupado um lugar de destaque entre as gramíneas brasileiras, pois, além de englobar o maior número de espécies nativas, também reúne o maior número de espécies com bom potencial forrageiro (VALLS, 1987). As espécies de *Paspalum* apresentam uma maior resistência ao frio, produção de forragem anual e de

proteína bruta, quando comparadas a outras gramíneas nativas do Rio Grande do Sul (DALL' AGNOL et al., 2006).

Suas espécies ocupam praticamente todas as comunidades herbáceas nos diferentes ecossistemas do país, sendo dominantes e responsáveis pela produção da maior parcela da forragem disponível em muitas dessas formações vegetais (VALLS, 1987). Segundo Barreto (1974), no Rio Grande do Sul, as espécies de *Paspalum* fazem parte de todas as formações campestres e estão distribuídas por todas as regiões fisiográficas.

Devido à grande diversidade e adaptabilidade das espécies do gênero *Paspalum* aos diferentes ecossistemas, tem se evidenciado, nos últimos anos, a importância destas espécies para a pecuária, principalmente nos países ao sul do Continente Americano. Este é a região sugerida por diversos pesquisadores (BATISTA; GODOY, 1992c; BURTON, 1962; 1967) como o centro de origem e diversificação genética da maioria das espécies deste gênero. Como exemplo de sua importância podemos citar o trabalho de Valls (2000), que evidencia a qualidade produtiva da forragem e ainda, a resistência à secas e inundações.

O *Paspalum* é conhecido e caracterizado há muito tempo, antes mesmo dos estudos de Darwin e até da edição das obras de Linnaeus, figuras de *Paspalum* já haviam sido publicadas: em 1700, *Paspalum boscianum* Flüggé, e em 1707, *P. virgatum* L. As primeiras plantas conhecidas do continente americano foram do gênero *Paspalum* e estima-se que cerca de 75% de todas as espécies conhecidas desse gênero ocorrem no Brasil. Espalhadas por todo território nacional e, conseqüentemente, expostas a diferentes condições ecológicas, fazem parte de diversas formações vegetais, sendo praticamente impossível encontrar uma formação vegetal brasileira sem nenhuma espécie de *Paspalum*. Deste modo, encontram-se espécies hidromórficas nos grandes rios amazônicos, xerófilas no Cerrado, esciófilas nos estratos inferiores das formações selváticas, heliófilas nos campos de todo país, psamófilas na composição das primeiras etapas de sucessão vegetal litorânea e casmófilas como representantes das xeroseres (BARRETO, 1974).

Quando nativas do ecossistema brasileiro, as espécies deste gênero retratam menor risco de provocar algum desequilíbrio ecológico quando comparadas a espécies exóticas. A grande variabilidade genética disponível neste gênero favorece projetos de melhoramento, nos quais pode-se evidenciar a obtenção dos cultivares mais adaptados a determinado nicho ecológico (BATISTA; REGITANO NETO, 2000).

Na região sul do Brasil, por exemplo, espécies dos grupos Dilatata, Livida, Notata e Plicatula, apresentaram melhores características agrônômicas (BARRETO, 1974), por produzirem, geralmente, forragem tenra e succulenta, muito procurada pelos animais.

### 3.3 *Paspalum notatum*

O *Paspalum notatum* é uma das espécies mais presentes em pastagens naturais, por isso é considerada uma gramínea de suma importância que deve ser melhor estudada em aspectos de sistemas de manejo e doses de adubação (PRATES, 1970). De acordo com Trenholm et al. (2001), *Paspalum notatum* var. *notatum* ‘grama-batatais’ é a espécie nativa mais cultivada, usada principalmente ao longo das estradas, ela forma um sistema radicular extenso e profundo que sustenta melhor que outras gramíneas, em solos arenosos inférteis e não requer grande utilização de água ou fertilizante, minimizando assim os custos. Constitui a maior cobertura herbácea das pastagens nativas, produzindo forragem da primavera ao outono. As plantas de *P. notatum* são perenes, herbáceas, rizomatosas e possuem de 10 a 20 cm de comprimento, com colmo comprimido, achatado, de forma bem peculiar. As folhas apresentam bainha glabra, de coloração verde-viva na face superior e mais pálida na inferior, lígula com um anel de pelos curtos e hialinos, e lâmina lanceolada, de ápice acuminado (MAEDA; PEREIRA, 1997). As plantas possuem estolões superficiais, resistentes, firmemente no chão, de entrenós curtos, enraizados e cobertos amplamente pela bainha das folhas, sobreposta e apertada. A epiderme adaxial do lema superior e da pálea inferior é composta de células retangulares compridas, geralmente três vezes mais longa do que larga. Em *P. notatum*, estas células podem ser duas vezes mais largas do que longas ou quadradas. As inflorescências são formadas por dois racemos conjugados. As ráquis dos racemos são tríquetras, glabras, com espiguetas solitárias, plano-convexas, pilosas ou glabras, apresentam gluma superior e lema inferior com 5 a 7 nervuras, antécio superior endurecido e glabro (ZULOAGA; MORRONE, 2005). É uma espécie bem adaptada ao pastejo, que resiste ao pisoteio, já que seus rizomas são protegidos pela bainha, além de emitir novas folhas a partir da estimulação das temperaturas de primavera (MARASCHIN, 2001).

De acordo com Maeda e Pereira (1997), no ápice das hastes florais desenvolvem-se dois densos ráceros espiciformes opostos, de 2,5 a 12 cm de

comprimento, que formam as clássicas "forquilhas". As raques, com aproximadamente 1 mm de espessura, são retas ou ligeiramente onduladas, com marcas negras (de onde vem o nome "*notatum*", do latim marcado). As espiguetas, dispostas em duas fileiras de um mesmo lado da raque, são solitárias e ovaladas, compreendendo de 2,5 a 2,8 mm de comprimento. As glumas e glumelas são verdes, nervadas, glabras e lustrosas. Na floração aparecem os estigmas, de coloração negra, sobressaindo das glumas verdes.

As cariopses de *P. notatum* são ovóides medindo de 2,0 a 3,5 mm de comprimento por 1,5 a 2,5 mm de largura, comprimidas nas duas faces, de coloração branco-amarelada e superfície reluzente. Elas são protegidas pelo lema e mais internamente pela pálea (envolvida quase completamente pelo lema), e externamente pela gluma (SHIPPINDALL et al., 1955).

A sua propagação vegetativa inicialmente é lenta, estendendo os estolões, formando um espesso gramado rasteiro, solidamente fixado ao solo, produzindo uma estrutura de pastagem difícil de ser invadida por outras espécies e predominantemente dominante (BOLDRINI, 1993).

Essa espécie é conhecida popularmente por diferentes denominações comuns, como grama-forquilha no Rio Grande do Sul, *gramilla blanca* no Uruguai e Argentina, *bahiagrass* nos Estados Unidos, *cana-mazo* em Cuba, e grama-batatais e grama-de-são-sebastião em São Paulo, o que revela sua importância e ampla utilização (MARASCHIN, 2001). Destaca-se entre as gramíneas utilizadas na alimentação animal devido ao bom valor nutricional, alta produção forrageira e excelente produção de sementes, quando há boa disponibilidade de água e nutrientes, pode produzir acima de 14 t/ha de matéria seca de forragem (COSTA, 1997).

De acordo com Steiner (2005), as gramíneas de *P. notatum* podem ser utilizadas para fins ornamentais em gramados e jardins, parques e quadras de esportes além do valor agrônomo como forrageira. Utilizada principalmente no combate à erosão, dado que suas raízes se entrelaçam e retêm o solo, a grama-batatais é largamente cultivada em terrenos acidentados, taludes e ao longo de canais e rodovias. Também é utilizada em campos de futebol e para paisagismo, devido à sua beleza e resistência ao pisoteio (MAEDA; PEREIRA, 1997).

Barreto (1974), afirma que *P. notatum* é uma espécie polimorfa, comum a todas as pastagens naturais dos países de clima quente e temperado da América. A diferença entre essas formas está relacionada com alguns caracteres importantes, dentre as quais podemos citar: aspecto, vigor, dimensões e pilosidade das folhas, altura dos

colmos floríferos, número e comprimento dos racemos, dimensões e coloração das espiguetas.

Assim, esta importante característica de distribuição do *P. notatum* em “ecótipos” (PRATES, 1970), leva à apresentação de pequenas variações morfológicas em resposta à adaptação em diferentes condições ecológicas. O estado do Rio Grande do Sul abriga uma dezena de biótipos de *P. notatum*, distintas morfológicamente, porém todas tetraplóides e provavelmente apomíticas, alguns dos quais se estendem mais ao norte do país, onde predomina a forma com folhas mais largas, conhecida como grama-batatais. Suas variedades são, geralmente, alopátricas ou ocupam nichos distintos nos campos naturais (VALLS; POZZOBON, 1987).

A grama-pensacola, que constitui a base da exploração no campo de rebanhos ovinos e bovinos na região sul do Brasil, vem se difundindo como espécie forrageira em todo o continente americano, principalmente em estados do sudeste dos Estados Unidos, onde se semeia 2,5 milhões de hectares de *Paspalum* principalmente *P. notatum* (BURTON, 1997). Também se destaca por possuir grande tolerância ao pisoteio intenso e frequente, além de sua baixa altura e ausência de estruturas vegetais contundentes e de princípios anti-nutricionais (HADDAD et al., 1999).

Esta gramínea, quando comparada com os biótipos nativos de *P. notatum*, constitui-se numa forrageira de excelente aceitação, sob o ponto de vista de produção e valor forrageiro, em virtude da facilidade de estabelecimento da cultura através de sementes, forma de crescimento perfeitamente adaptada ao pastoreio e às inegáveis qualidades de aceitabilidade e valor forrageiro (BARRETO, 1974). Entretanto, praticamente todos os estudos que compararam a cultivar Pensacola com os biótipos nativos de *P. notatum*, demonstraram que o mesmo apresenta produção de matéria seca inferior, apontando para a necessidade de explorar o potencial produtivo destes materiais nativos tetraplóides (FACHINETTO, 2010).

O *P. notatum* Flüggé, é uma espécie amplamente utilizada no Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai, e é responsável por 20 a 40% da cobertura herbácea da maioria das pastagens naturais do Rio Grande do Sul (BARRETO, 1974). É uma das espécies tetraplóides de gramíneas nativas de maior importância como espécie forrageira tropical, apresentando boa qualidade de forragem e alta resistência ao pastejo e pisoteio dos animais (POZZOBON; VALLS, 1997).

Quarín et al. (1984) indicam que, mesmo sendo tetraplóides, estas plantas são apomíticas facultativas com alta expressão sexual, uma vez que são consideradas tetraplóides naturais como apomíticas obrigatórias, esta alta proporção de plantas sexuais expande seu potencial de uso em programas de hibridização, com o uso de mães sexuais, polinizadas com pólen de plantas apomíticas.

No entanto, seus biótipos devem ser estudados para que os valores de produção quantitativa e qualitativa da forragem, de cada subtipo, sejam definitivamente determinados, a fim de verificar a viabilidade de utilização de novas forrageiras capazes de solucionar problemas de nutrição animal em cada região (SOARES, 1977).

Devido ao bom valor forrageiro e à rapidez de estabelecimento de uma densa cobertura do solo, os diversos ecótipos de *P. notatum* têm sido incorporados a experimentos de cunho agrônomico e a cultivares comerciais da espécie (VALLS, 1987).

### **3.4 Definição de apomixia**

O termo apomixia (do grego *apo* - longe e *mixis* - mistura) significa no sentido mais amplo “longe do ato de mistura”, e é empregado em seu senso restrito, ou seja, como sinônimo de agamospermia (formação de sementes sem fecundação) (DALL’ AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2005). A apomixia, um método geneticamente controlado de reprodução das plantas, consiste na formação de sementes assexuadamente, na qual a fertilização e a meiose podem não estar envolvidas. É um processo que acontece apenas na parte feminina da flor, o ovário, mais especificamente no óvulo. Na reprodução sexual, as divisões meióticas promovem uma redução no número de cromossomos para formar um gametófito reduzido. Os embriões são formados após a fertilização com a fusão dos gametas masculino e feminino desse modo, carregam uma cópia do conjunto de cromossomos de cada genitor (CARNEIRO; DUSI, 2002).

No desenvolvimento apomítico, a meiose, característica da reprodução sexual, não ocorre ou não é funcional, ou seja, o embrião desenvolve-se no ovário a partir de uma célula somática do óvulo, ocorrendo a formação de sementes férteis, sem haver a união do gameta feminino com o masculino, como ocorre na reprodução sexual. À vista disso, a oosfera contém o mesmo número de cromossomos somáticos maternos, não ocorre fusão de gametas durante a fertilização e o desenvolvimento do embrião é

autônomo, gerando, contudo, uma planta idêntica à planta-mãe (CARNEIRO; DUSI, 2002). Para Koltunow (1993), uma importante diferença entre o embrião apomítico e o zigótico é o fato de que o primeiro é derivado somente das células do tecido do óvulo materno enquanto o segundo é derivado da fusão de um gameta masculino com um gameta feminino.

Há dois tipos principais de apomixia, a apomixia gametofítica e a esporofítica. A gametofítica, é a mais largamente distribuída e ocorre em plantas de interesse econômico, principalmente em gramíneas forrageiras dos gêneros *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Panicum*, *Paspalum*, *Poa*. Nesse tipo de apomixia, há a formação de um saco embrionário não reduzido (diplóide), que pode ocorrer por dois processos diferentes: aposporia e diplosporia. Na apomixia esporofítica, também conhecida como embrionia adventícia, comum em espécies de *Citrus* e *Mangifera*, não ocorre a formação de sacos embrionários, porém os embriões diplóides, desenvolvem-se diretamente a partir de células do óvulo (ASKER; JERLING, 1992).

A aposporia ocorre quando as células somáticas do óvulo denominadas células iniciais apospóricas ou apósoros dão origem, por divisões mitóticas, a um saco embrionário não reduzido. Estes possuem oito núcleos como em *Hieracium* ou 4 núcleos como em *Panicum* (ASKER; JERLING, 1992). Geralmente o processo sexual é interrompido, mas, nem sempre, há a possibilidade de ocorrência da sexualidade e da apomixia em um mesmo óvulo, entretanto, processos apospóricos e sexuais podem coexistir num mesmo óvulo, o que não é possível em apomíticos diplospóricos. É comum também a ocorrência de vários sacos embrionários apospóricos em um só óvulo em decorrência do aparecimento de diversos apósoros. O endosperma pode desenvolver-se autonomamente, ou seja, somente a partir dos núcleos polares, sem a ocorrência de fertilização do núcleo polar pelo núcleo espermático ou pela união de um núcleo masculino com os núcleos polares, caracterizando, então, a pseudogamia (CARNEIRO; DUSI, 2002; HANNA; BASHAW, 1987).

A diplosporia acontece quando a célula mãe do megásporo não entra em meiose, ou esta é incompleta, e, por mitoses, dá origem a um saco embrionário não reduzido (DALL'AGNOL; SCHIFINO-WITTMANN, 2005). Os sacos embrionários formados possuem núcleos e são morfológicamente semelhantes ao saco meiótico. Diante disso, o processo sexual é completamente comprometido, e, num mesmo óvulo, apenas pode ocorrer um modo de reprodução (CARNEIRO; DUSI, 2002). Na embrionia adventícia ou esporofítica, as células somáticas não reduzidas do nucelo ou

do tegumento interno do óvulo originam um embrião diretamente (NOGLER, 1984). A formação do embrião adventício ocorre lado a lado com a formação do embrião pela via sexual, sem que haja formação do saco embrionário e célula-ovo, típica dos gêneros *Citrus* e *Mangifera* (ASKER; JERLING, 1992).

A apomixia, é descrita para cerca de 15% das famílias das angiospermas sendo que, 75% das espécies apomíticas estão nas famílias Gramineae (Poaceae), Asteraceae e Rosaceae. O primeiro registro sobre a apomixia, foi de 1841, quando uma planta feminina de *Alchornea* (Euphorbiaceae) cultivada isoladamente no Jardim Botânico de Kew formou sementes. Mendel em seus trabalhos, realizou “cruzamentos” em uma espécie apomítica do gênero *Hieracium* (Compositae), obviamente sem obter os resultados esperados (ASKER; JERLING, 1992). Na década de 40, a clássica monografia de Gustafson, definiu e esclareceu vários aspectos sobre a apomixia, intensificando o estudo sobre o assunto, a partir de então, começou-se a estudar a apomixia com outras abordagens, incluindo genética, significado evolutivo, ecológico e outros. Mais tarde, por volta da década de 70, o interesse pela apomixia foi aguçado novamente, principalmente com acúmulo de dados sobre a herança da apomixia (ASKER, 1979).

As espécies apomíticas são na sua quase totalidade perenes e muitas vezes possuem propagação vegetativa através de estolões ou rizomas. Desta maneira, no campo, através da combinação de apomixia e divisão vegetativa, plantas apomíticas podem formar grandes populações clonais e estas podem persistir por longos períodos de tempo. Apomixia pode levar à formação e manutenção de variedades ou biótipos morfológicamente distintos, mas ainda férteis entre eles, onde a taxonomia de tais complexos agâmicos pode ser uma tarefa difícil e controversa (DICKINSON, 1998; HORANDL, 1998).

Os complexos agâmicos têm sido descritos como unidades em que ecótipos sexuais e homólogos de apomixia são encontrados em diferentes níveis de ploidia, na maioria dos casos diplóides e tetraplóides, respectivamente, porém existem alguns apomíticos com níveis mais elevados de ploidia (SAVIDAN, 2000). Na natureza, estes complexos podem definir uma variedade de populações em relação ao sistema genético dos seus membros, deste modo, é possível encontrar populações puras compostas exclusivamente por indivíduos com apenas um nível de ploidia, ou populações mistas, onde os indivíduos com diferentes níveis de ploidia coexistem (SARTOR et al., 2013). Ambos os tipos de populações têm sido descritos para

diferentes grupos assexuais como *Taraxacum* (NIJS; MENKEN, 1996), *Capillipedium Dichantium–Bothriochloa* (DE WET; HARLAN, 1970), *Panicum maximum* (PERNÈS, 1975), *Tripsacum* (MORENO- PEREZ et al., 2009), *Ranunculus auricomus* L. (COSENDI; HÖRANDL, 2010; HÖRANDL et al., 1997; HÖRANDL; GREILHUBER, 2002) e *Paspalum* (DAURELIO et al., 2004; NORMANN et al., 1989; URBANI et al., 2002;).

Algumas espécies de gramíneas apomíticas, apresentam alto valor agrônômico e econômico, essas plantas podem ser usadas apenas na fecundação de plantas sexuais, ou seja, como doadoras de pólen, uma vez que a diferença de ploidia entre plantas sexuais e apomíticas impedem o cruzamento entre elas (CARNEIRO; DUSI, 2002). A apomixia tem um papel importante como ferramenta no programa de melhoramento de plantas, pois apresentam uma oportunidade única de clonagem de plantas através da semente (HANNA; BASHAW, 1987).

Segundo Koltunow (1993), as principais vantagens da apomixia é proporcionar a imediata fixação de qualquer genótipo superior selecionado no processo de melhoramento, permitindo que este, origine plantas idênticas à original, independente do seu vigor híbrido e do grau de heterozigose. Sendo assim, há maiores oportunidades de desenvolvimento de combinações gênicas superiores e de incorporação de características desejáveis, uma vez que não há a necessidade de realizar teste de progênie para verificar a estabilidade do genótipo, desta forma, o mesmo estaria pronto para entrar em testes de competição (WEILER, 2013).

Desta forma, as plantas originadas de sementes apomíticas, serão clones, e terão o mesmo genótipo da planta-mãe, exceto para raras mutações, sendo assim, a variabilidade intrapopulacional de culturas apomíticas é menor, comparada a outras culturas com outros modos de reprodução (WEILER, 2013). A maioria dos apomíticos naturais são classificados como facultativa, porque eles têm a capacidade de reproduzir, tanto sexualmente quanto assexuadamente. Para compreender as diferentes vias de formação das sementes apomítica, é instrutivo examinar primeiro a sequência de eventos necessários para a formação das sementes sexuais (HAND; KOLTUNOW, 2014).

De acordo com Ozias-Akins e Van Dijk (2007), o controle genético da apomixia permaneceu indefinido por muitos anos principalmente devido as interações entre genes epistáticos, modificadores de expressão, poliploidia, aneuploidia, distorções da segregação, supressão de recombinação, entre outros que parecem ter se acumulado

durante a evolução da apomixia. Porém, os estudos realizados por Martinez et al. (2001), afirmam que o controle genético da aposporia em espécies autotetraplóides de *Paspalum notatum*, é determinada por um único locus dominante e de segregação mendeliana. Porém, no controle da expressão da apomixia provavelmente há um efeito letal pleiotrópico do gene principal ou alternativamente, há uma letalidade parcial de fatores ligados ao gene apospórico que podem ser responsáveis por uma distorção na segregação.

De acordo com Quarín (1992), cerca de 80% das espécies de *Paspalum* são poliplóides, e ocorre a predominância do tipo tetraplóide. É comum na tribo Paniceae, em especial do gênero *Paspalum* a ocorrência de apomixia e a simultaneidade de citótipos diplóides e tetraplóides da mesma espécie, na natureza, sendo os diplóides sexuais alógamos e os tetraplóides apomíticos, ou com algum potencial para a sexualidade, em casos de apomixia facultativa (QUARÍN et al.,1996).

Stein et al. (2004), afirma que a apomixia em *Paspalum notatum* é definida pela completa degeneração dos produtos da meiose, seguida pela formação do saco embrionário a partir das células nucleares (aposporia) e desenvolvimento de embriões a partir de célula ovo não reduzida. No entanto, há necessidade de fertilização por um dos núcleos generativos do grão de pólen dos núcleos centrais do saco embrionário, para o desenvolvimento do endosperma, o que é chamado de pseudogamia. Devido à grande importância, principalmente para a área subtropical, o grupo Notata é composto de espécies diplóides, tetraplóides e hexaplóides, com ocorrência de apomixia e de sexualidade, com várias espécies apresentando mais de um nível de ploidia, as sementes apomíticas serão idênticas à planta-mãe, mas o endosperma terá contribuições genéticas materna e paterna (VALLS; POZZOBON, 1987).

De acordo com Burton e Forbes (1960), é necessário viabilizar cruzamentos por meio de plantas sexuais compatíveis para que a diversidade genética conservada pela apomixia seja plenamente explorada, gerando assim novas combinações gênicas e selecionando indivíduos que solucionem os problemas relacionados a estas espécies, possibilitando o registro e proteção da cultivar desenvolvida.

Sendo assim, o interesse nesse modo de reprodução foi despertado devido ao avanço da biotecnologia e a possibilidade de se transferir genes entre plantas, independentemente da compatibilidade sexual. Dessa forma, haverá uma aplicação

direta na combinação da apomixia com a reprodução sexual na produção de sementes, trazendo vantagens no uso de sementes apomíticas em culturas onde a apomixia não ocorre (ASKER; JERLING, 1992; HANNA; BASHAW, 1987).

### **3.5 A fenologia reprodutiva**

A fenologia é o ramo da ecologia responsável por estudar a ocorrência de eventos biológicos periódicos, bem como suas causas e correlações às forças seletivas bióticas e abióticas (LIETH, 1974). Ela contribui sobremaneira no entendimento da regeneração e reprodução das plantas, da organização temporal dos recursos dentro das comunidades, das interações planta-animal e da evolução da história de vida dos animais que dependem de plantas para alimentação, como herbívoros, polinizadores e dispersores (MORELLATO; LEITÃO FILHO, 1996). Essa ciência, estuda as manifestações rítmicas e os eventos naturais que ocorrem em plantas e animais em resposta a estímulos endógenos ou ambientais (RATHCKE, LACEY, 1985). A sobrevivência e o sucesso reprodutivo das espécies, populações e comunidades, podem ser afetados pelos eventos fenológicos, assim, além dos fatores abióticos, como temperatura, umidade, precipitação e fotoperíodo, os fatores bióticos, como herbivoria, competição, polinização e dispersão, podem servir como agentes seletivos nos padrões fenológicos (SAKAI et al., 2005).

Deste modo, os estudos fenológicos contribuem para a compreensão da dinâmica das comunidades vegetais, colaborando no entendimento da regeneração e da biologia reprodutiva das plantas, da organização temporal e espacial dos recursos vegetativos numa comunidade ou população, das interações e da coevolução entre plantas e animais (TALORA; MORELLATO, 2000). 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) e fatores bióticos, endógenos e de restrição filogenética (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 nessa fenofase. Para isso é necessário um mecanismo para a planta reconhecer quando iniciar esse período (IMAIZUMI; KAV, 2006). Esse reconhecimento pode ser feito pela interação

fisiológica-ambiental ou por fatores abióticos como precipitação, temperatura e fotoperíodo (BENDIX et al., 2006).

O estudo da fenologia em gramíneas é muito simples, tanto para compreender suas respostas funcionais às condições ambientais, quanto para realizar o manejo das diferentes espécies conforme à sua manutenção, incremento ou eventual eliminação do pasto nativo, pois elas apresentam comportamento influenciado pelas condições climáticas e/ou pelo grau de desenvolvimento do perfilho (ALMEIDA, 1995). Desta maneira, o conhecimento pode ser aplicado em diversas áreas de atuação, permitindo criar estratégias de coletas de sementes e disponibilidade de frutos, que influenciará a quantidade e qualidade da dispersão das sementes (MARIOT et al., 2003).

De acordo com Almeida (1995), as gramíneas no cerrado apresentam uma ordem de fenologia reprodutiva dentro da estação chuvosa. Para esse autor há três padrões fenológicos identificados: precoces de ciclo curto (ciclo reprodutivo muito curto, de novembro a janeiro); precoces de ciclo longo (reprodução entre novembro e agosto) e tardias (com período reprodutivo do meio ao final da estação chuvosa).

Segundo Veenendaal et al. (1996), espécies anuais e perenes com estolões curtos têm a produção de frutos concentrada no início da estação chuvosa, enquanto as perenes cespitosas e perenes com longos estolões, frutificam-se no fim da estação chuvosa. Trabalhos realizados por Ramos (2010) constataram que as espécies rizomatosas, apresentam comportamento semelhante, com o pico de produção de frutos e dispersão de propágulos, no meio e, preferencialmente, no fim da estação chuvosa, enquanto que as espécies precoces, frutificaram e dispersaram seus propágulos no meio da estação chuvosa.

A exposição à luz, o dano foliar, o estresse hídrico e o aborto de flores são alguns dos fatores que podem influenciar os padrões fenológicos das plantas, enquanto que a adaptação do período de produção de sementes pode estar relacionada ao comportamento de predadores de sementes, à atividade de polinizadores e dispersores, ao desenvolvimento do fruto e das sementes e às necessidades específicas para a germinação (MANTOVANI et al., 2003).

Neste caso, para obter uma melhor compreensão sobre os mecanismos reprodutivos, as estratégias de polinização e o entendimento das relações entre planta-ambiente, são necessários a compreensão e o conhecimento da biologia floral da espécie em estudo. As espécies da família Poaceae são tradicionalmente consideradas como

anemófilas, particularmente pela estrutura floral peculiar, que inclui redução do perianto, ausência de nectários, muitas flores por inflorescência, produção abundante de grãos de pólen, estigma plumoso e reduzido número de óvulos (geralmente um), essas características condizem com adaptações ao aumento da eficiência da polinização pelo vento (LINDER, 1998). Um exemplo citado por Bogdan (1962), é que em espécies florestais de Poaceae, há evidências de visitas por agentes bióticos às inflorescências, polinizadores, contrastando com a anemofilia, indicada para a família.

Trabalhos com *Paspalum* têm mostrado que algumas espécies deste gênero apresentam baixa capacidade de produção de sementes viáveis quando ocorrem fatores como a não-passagem do estágio vegetativo para o reprodutivo. Nessa situação, não há o aparecimento de pendões reprodutivos e a planta vegeta durante todas as estações do ano. Em alguns casos a planta apresenta florescimento, mas não ocorre a formação de cariopses e quando ocorre essa formação, há ausência de germinação das sementes por problemas de dormência (BATISTA; GODOY, 1998).

O *Paspalum atratum* cv. 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).

Uma ferramenta aplicável ao não sincronismo no florescimento, que inviabiliza a produção de sementes, é o armazenamento do grão de pólen, visando preservar a viabilidade dos gametas masculinos por diferentes períodos, sob condições artificiais (FERREIRA et al., 2007). Além de possibilitar o cruzamento entre cultivares de ciclos diferentes e permitir a propagação de populações de plantas macho-estéreis, utilizadas na formação de híbridos, sem a necessidade de cultivo alternado, no campo, de linhagens mantenedoras.

Dentre os aspectos que corroboram para a importância da preservação da viabilidade de grãos de pólen destaca-se a duração do tempo de receptividade do estigma, longevidade do grão de pólen na planta, diferenças no período de florescimento entre plantas macho-férteis e macho-estéreis e conservação dos recursos genéticos

(Ganeshan, 1986). Deve-se destacar também a importância de se conhecer a longevidade do grão de pólen durante o armazenamento para o planejamento de hibridações artificiais em programas voltados para o desenvolvimento de novas progênies (FERREIRA et al., 2007).

### **3.6 Características morfológicas de grãos de pólen da família Poaceae**

O estudo de grãos de pólen, palinologia, possui uma grande relação com outras áreas da ciência como citologia, genética, física, química e matemática. Essa ciência é bastante aplicada no melhoramento de plantas, especialmente nos estudos sobre a viabilidade de grãos de pólen (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999).

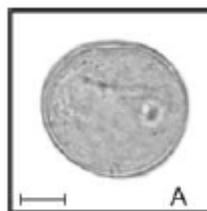
O grão de pólen é uma estrutura microscópica de coloração amarelada que apresenta número haplóide de cromossomos e dará origem ao gameta masculino. No interior do grão de pólen encontra-se dois núcleos: um menor, reprodutivo, que dará origem a dois microgametas, e o outro maior, nutritivo, que formará o tubo polínico (VIDAL; VIDAL, 1995). A parede do pólen é constituída de uma camada interna conhecida como intina que é envolta por uma camada externa denominada exina. A intina é semelhante à maioria das paredes celulares primários, sendo composta basicamente por celulose, na qual ocorre o processo de emissão, alongamento, desenvolvimento e formação do tubo polínico. A exina, por sua vez, é derivada principalmente de materiais depositados pelo tapete e outros compostos tais como flavonóides e lipídios e confere rigidez ao grão de pólen e apresenta poros germinativos. Conhecer as camadas que compõem a parede do grão de pólen é extremamente importante, pois são elas que possuem a função de proteção contra dessecação e também, alojam substâncias químicas que determinam os sistemas de autoincompatibilidade (SI). Estas substâncias químicas são liberadas no estigma durante a germinação do grão de pólen e se forem compatíveis, o tubo polínico cresce ocorrendo a fertilização da oosfera formando o zigoto; caso contrário, não há formação do zigoto (KARASAWA, 2009; MELHEM; SALGADO-LABORRIOU, 1973)

Muitos autores consideram a família Poaceae, do ponto de vista palinológico, como uma família estenopolínica, ou seja, com grãos de pólen morfológicamente semelhantes (CORRÊA et al., 2005; ERDTMAN, 1986; MELHEM; MAKINO, 1978; SALGADO-LABORRIOU, 1973).

De acordo com Corrêa et al. (2005), os grãos de pólen dessa família se apresentam em mônades, de âmbito circular, prolato-esferioidais a oblato-esferoidais, abertura do tipo poro, com presença de ânulo e opérculo, exina rugulado-pilada (de difícil visualização em microscopia óptica) e areolada, com aréolas de diferentes tamanhos, com contornos irregulares e recobertos por espículos quando vistos em microscopia eletrônica de varredura.

As gramíneas são reconhecidas tradicionalmente como anemófilas, ou seja, polinizadas pelo vento, em virtude principalmente da presença de características florais distintas, tais como redução do perianto, ausência de nectários, muitas flores por inflorescências, grandes anteras produzindo abundante quantidade de grãos de pólen com exina psilada, intina espessa e apenas um poro germinativo, e reduzido número de óvulos (KOSHY et al., 2001). Essas características morfológicas facilitam esse tipo de estratégia de polinização. Embora Poaceae seja uma família muito bem estudada do ponto de vista taxonômico, ainda são poucos os estudos sobre sua biologia floral e fenologia, principalmente de espécies ocorrentes no Brasil.

Segundo Radaeski et al. (2014), *Paspalum notatum* Flügge apresenta grãos de pólen mônade, médio, âmbito circular, esférico, monoporado, poro circular medindo aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$  (6  $\mu\text{m}$  quando somado ao ânulo), exina micropilada. Sexina e nexina de mesma espessura, conforme a figura 1.



**Figura 1.** Grão de pólen ocorrente nos Campos do Sul do Brasil. A: *Paspalum notatum*; Escala: 10  $\mu\text{m}$ .  
Fonte: Radaeski, et al., 2011. (adaptado)

### 3.7 Conservação de grãos de pólen em diversas culturas

A conservação ou armazenamento de grãos de pólen consiste numa importante ferramenta para a manutenção dos recursos genéticos vegetais e criação de bancos de amostras de pólen, por isso, as questões relacionadas com a manutenção artificial de grãos de pólen funcional e as estimativas sobre a qualidade depois do

armazenamento a longo prazo são de interesse para embriologistas e geneticistas (GEORGIEVA; KURELEVA, 1994). Sendo assim, é de extrema importância conservar grãos de pólen, uma vez que o uso dessa técnica é importante para o desenvolvimento de pesquisas com pólen, bem como para a melhoria da eficiência dos programas de melhoramento e a promoção de intercâmbio e preservação de germoplasma (EINHARDT et al, 2006; HANNA, 1994), com o objetivo de preservar a diversidade genética (CONNOR; TOWILL, 1993).

Segundo Wang (1975), o armazenamento de grãos de pólen com a finalidade de conservação genética, consiste em conservar material para futura utilização, além de proporcionar ótimas condições ao material de forma que ele mantenha sua integridade genética original bem como seu vigor e poder germinativo. A conservação genética é interessante para diversas espécies de plantas, pois o pólen pode ser mantido em bancos de conservação com a descrição da informação do genitor masculino (FRANÇA, 2008), sendo de grande interesse para programas de melhoramento, pois permite o cruzamento entre genótipos que apresentam assincronia reprodutiva, como materiais não adaptados e espécies afins (CONNOR; TOWILL, 1993). Além disso, esse banco pode ser disponibilizado para melhoristas, permitindo que além das hibridações desejadas seja possível o intercâmbio entre as instituições (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008).

Nesse sentido, uma das possibilidades da utilização dos grãos de pólen conservado é como um complemento para agentes polinizadores pouco eficientes ou inexistentes e também para sincronia artificial entre a dispersão de pólen e a receptividade floral, uma vez que o pólen pode ser utilizado a qualquer momento (TIGHE, 2004).

Dentre os objetivos para o armazenamento do grão de pólen, destaca-se a correção da não coincidência de florações e a utilização em cultivares de floração tardia, neste caso, é aconselhável testar a viabilidade, antes, durante e após sua utilização (EINHARDT et al, 2006). Essa recomendação também é citada por Dafni (1992), que 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.

Dessa maneira, os grãos de pólen preservados devem manter sua viabilidade, assim, é necessário o monitoramento dessa capacidade antes, durante e após o período de armazenamento. Para estabelecer um banco de pólen conservado é

necessário determinar o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar.

Para o sucesso do armazenamento do pólen, fatores como umidade e temperatura de armazenamento devem ser controlados, já que a 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).

O armazenamento pode ser classificado em dois tipos: a curto e a longo prazo, geralmente, o armazenamento a curto prazo é destinado a estudos de genética e de melhoramento, e a longo prazo, para a conservação genética (Sousa, 1988), nesse tipo de armazenamento, é necessário o domínio de técnicas de coleta, secagem, armazenamento e testes de viabilidade do pólen, porém cada espécie se comporta diferente em relação a esse processo, dessa forma, para não comprometer a viabilidade do pólen, é necessário o desenvolvimento de metodologias referentes a estas técnicas (SOUSA et al., 2010). Em contrapartida, Sousa (1988), afirma que em armazenamento a longo prazo, é comum a ocorrência de alterações genéticas que podem levar, após muitos anos, a populações geneticamente diferentes dos originais.

Sabe-se que as condições de armazenamento determinam o sucesso no processo de conservação do pólen, assim vários fatores contribuem para a longevidade e influenciam a germinação e viabilidade do mesmo, entre estes, podemos citar fatores característicos do próprio pólen, tais como, estado de maturação fisiológica, origem, características genéticas, nutrição da planta, período, estágio fisiológico da flor e fatores externos, como composição do meio de cultura, densidade de pólen no meio, temperatura de incubação, período de coleta, agentes ambientais, temperatura e umidade, entre outros. Além disso, durante o armazenamento, podem ocorrer alterações fisiológicas como alteração na velocidade de respiração e conversão dos açúcares e ácidos orgânicos, acúmulo de produtos metabólicos secundários, alteração dos lipídeos da exina do pólen que contribuem para o decréscimo da viabilidade do mesmo (AKIHAMA et al., 1979; GIORDANO et al., 2003; STANLEY; LINSKENS, 1974).

Existem alguns métodos para redução de temperatura, entre eles o mais sofisticado é a utilização de gases liquefeitos e o mais fácil é a utilização de freezers e refrigeradores. Em relação à decisão sobre qual método utilizar, vai depender do

objetivo do armazenamento, bem como da característica da espécie trabalhada (PIO, 2003). 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).

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), assegura que, se o pólen de milho conter menos de 15% de água a sua viabilidade cai drasticamente. Portanto, geralmente é aceito que a redução da umidade do grão de pólen permite o armazenamento a longo prazo, porém a qualidade do pólen parecer estar correlacionado com a capacidade de tolerar o processo de desidratação (GUILLUY et al., 1990).

O teor de água no grão de pólen está correlacionado ao sucesso do armazenamento a longo prazo em nitrogênio líquido, que mostra ser o mais promissor, com temperaturas em torno de  $-196^{\circ}\text{C}$  (BAJAJ, 1995).

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). Para obter sucesso na conservação a longo prazo de grão de pólen é necessário que o teor de água esteja entre 7% a 20% para o armazenamento em temperaturas que variam de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  (YATES et al., 1991). Caso haja formação desses cristais, ocorre o rompimento da membrana celular, destruindo o pólen (ALMEIDA et al., 2011). 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.

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, mas deve-se tomar cuidado com a dessecação do pólen, pois quando este está extremamente seco, ele pode reduzir sua capacidade germinativa por perder água de constituição (FRANÇA, 2008). A secagem é a forma de reduzir o teor de água do pólen.

Esta deve ser realizada com cuidado, não permitindo que a temperatura de secagem exceda 28° C (ARGERICH; GAVIOLA, 1995).

O grão de pólen das espécies vegetais pode ser classificado como tolerantes ou sensíveis à desidratação, nesse contexto, os grãos de pólen binucleados são classificados como tolerantes e o pólen trinucleado como sensível (HUGHES; LEE, 1991). Muitos autores descrevem que os grãos de pólen binucleados possuem maior viabilidade comparado aos grãos de pólen trinucleados (FRANKEL; GALUN, 1977; STANLEY; LINSKENS, 1974). Logo, é necessário ter uma metodologia adequada para a secagem do pólen trinucleado, pois os componentes nucleares das células masculinas podem ser danificados, reduzindo a viabilidade. Isso é explicado pelo fato, de que a segunda divisão meiótica priva o grão de pólen das reservas suficientes para proporcionar uma boa longevidade e germinação (SOUSA, 1988). Esse fenômeno é mais ameno em grãos de pólen binucleados, pois de acordo com as conclusões de Kirby e Smith (1974) há maior quantidade de compostos de superfície na parede nesse tipo de pólen, não havendo grandes perdas das reservas destinadas à longevidade e germinação, na segunda divisão meiótica. O pólen das gramíneas é trinuclear, incluindo o milho, dificultando, assim, a armazenagem de gametas masculinos (ALVIM, 2008).

O teor de água no grão de pólen pode ser ajustado de acordo com soluções salinas saturadas conhecidas, dentre estas destacam-se: cloreto de magnésio hexa hidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ); cloreto de sódio (NaCl); cloreto de lítio hidratado ( $LiCl \cdot H_2O$ ); hidróxido de sódio (NaOH); nitrato de magnésio [ $Mg(NO_3)_2$ ], nitrato de amônia ( $NH_4NO_3$ ), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ), cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ), nitrato de cálcio [ $Ca(NO_3)_2$ ], nitrato de sódio ( $NaNO_2$ ) (CONNOR; TOWILL, 1993; HONG et al., 1999), sílica gel, dessecação a vácuo ou vapor de nitrogênio líquido (ALMEIDA et al., 2011).

Segundo Connor e Towil (1993), os grãos de pólen podem sobreviver aos procedimentos de secagem e respondem com sucesso ao armazenamento em temperaturas de - 80°C e a - 196°C, se a umidade for mantida dentro de certos limites.

De acordo com Winston e Bates (1960), as soluções saturadas com excesso de sólidos mantém uma pressão de vapor muito constante, mesmo sob as condições de mudança de umidade, porque o ganho de água faz com que o material se precipite; não havendo muito líquido sobre o sólido ocorre uma difusão dentro da solução lentamente, e as condições de umidade permanecem inalteradas.

Outro fator importante a ser apontado é a utilização de metodologia adequada para a avaliação da viabilidade e da germinação do grão de pólen. A viabilidade do pólen pode ser determinada por diferentes métodos, sendo os mais utilizados os testes colorimétricos; germinação *in vitro*; germinação *in vivo*, polinização *in vivo*, reação fluorométrica e a porcentagem de frutificação efetiva (GALETTA, 1983). Além de métodos como a fertilização a campo, o que permite a análise da capacidade de emissão do tubo polínico e uma correlação desta taxa com a viabilidade do pólen (ALVIM, 2008).

Na técnica de coloração, é comum o uso de corantes nucleares como carmim acético e azul de anilina, que colorem apenas grãos de pólen funcionais. Apesar de ser um método simples e barato, ele não revela a capacidade de germinação de grãos de pólen viáveis com exina espessa e/ou mucilaginosas, que devido à parede ser espessa, não são coloridos e isto gera subestimativas (ALEXANDER, 1980). Do mesmo modo que pode haver superestimativas da viabilidade do pólen, pois este pode se colorir mesmo sendo incapaz de germinar, devido a problemas no desenvolvimento do tubo polínico (GALETTA, 1983). Outro método bastante utilizado para testar a viabilidade do pólen é a germinação *in vitro*. Esta técnica consiste na simulação das condições do estigma, induzindo a germinação do tubo polínico em condições artificiais, porém há uma limitação nos testes de germinação *in vitro*, principalmente em espécies que apresentam grão de pólen trinucleado, como é o caso da família Poaceae, pois há uma dificuldade em obter uma germinação satisfatória nessas espécies, pois grãos de pólen trinucleado apresenta menor longevidade comparado aos binucleados (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992). Diante esse comportamento típico das espécies de gramíneas, Kihara (1982) recomenda-se que a germinação seja feita por meio de observações *in vivo* das interações pólen-pistilo. Essa técnica apresenta alta correlação com a fertilização a campo, entretanto, por desconsiderar a influência de fatores relacionados com a receptividade do estigma, barreiras genéticas e influência ambiental, essa técnica tende a superestimar a fertilização *in vivo* (BARNABÁS et al., 1988). O método é descrito, colocando uma pequena amostra para germinar em um meio de cultura apropriado, com visualização em microscópio óptico. Apesar de ser um método muito utilizado e com resultados positivos para diversas culturas, alguns fatores afetam a germinação, como os componentes químicos e consistência do meio de cultura, tempo e condições de incubação. Geralmente, o grão de pólen das angiospermas necessita de fontes de carbono (sacarose), de boro (ácido bórico) e, frequentemente de mais outros

nutrientes, como cálcio (cloreto de cálcio), para que ocorra a germinação (GALETTA, 1983).

Analisando os métodos existentes para a avaliação da qualidade do pólen, foi estabelecido que os testes utilizados para a coloração vital geralmente superestimam a viabilidade do pólen (BARROW, 1983). Ao mesmo tempo, notou-se que testes de germinação *in vitro* muitas vezes subestimam a qualidade do pólen por causa dos meios e condições subótimos para o cultivo (PFAHLER, 1970; SHIVANNA; CRESTI, 1989). Mesmo a polinização *in vivo* nem sempre é confiável, pois a fertilização e a produção de sementes não dependem somente da viabilidade e fertilidade do pólen, mas também do estado da planta mãe, receptividade do pistilo, e as condições ambientais na qual a polinização foi feita (KERHOAS; DUMAS, 1988). Atualmente, a técnica mais aceita como de maior confiabilidade na viabilidade do pólen e o efeito da fertilização, é o teste fluocromático (FCR) (HESLOP-HARRISON et al., 1984; SHIVANNA et al., 1991).

Algumas espécies mantêm a capacidade de germinação dos grãos de pólen, outras não, quando os grãos de pólen são armazenados sob diferentes temperaturas. Estudos de alguns autores revelam que para algumas espécies submetidas à temperatura de 5°C a capacidade germinativa pode ser mantida (SILVA FILHO, 2007) ou reduzida (DUTRA et al., 2000; HECKER et al., 1986). Já em amostras submetidas às temperaturas de -196°C e -20°C não observou-se redução na capacidade germinativa do grão de pólen (FERREIRA et al., 2007; GANESHAN, 1986; GOMES et al., 2003; HECKER et al., 1986). O aumento da temperatura de armazenamento do pólen de diversas espécies reduz o vigor germinativo e a longevidade (FERREIRA et al., 2007; GIORDANO et al., 2003; HECKER et al., 1986; LUZA; POLITO, 1985).

Trabalhos já foram descritos utilizando armazenamento de grãos de pólen obtendo resultados de sucesso e outros não. Pólen de cactos do gênero *Hylocereu*, armazenado 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 et al., 2000). Casali et al. (1984) afirmam que a redução da temperatura no armazenamento prolonga a viabilidade do grão de pólen de *Capsicum*, enquanto que Gomez et al. (2000), analisando pólen de amêndoas durante oito semanas de armazenamento à temperatura de 4 e 22°C, verificaram que a capacidade de germinação diminuiu drasticamente a temperatura de 22°C após a segunda semana, mas manteve 50% de viabilidade quando conservado a 4°C. Luza e Polito (1985), trabalhando com grãos de

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

Outro trabalho na mesma linha foi descrito por Nascimento et al (2003) que constataram que o pólen de berinjela submetido à temperatura de 5°C também viabilizou a produção de sementes com qualidade fisiológica, mesmo este tendo sido armazenado por curto período (de zero a 60 dias), porém o uso de pólen armazenado por 50 a 60 dias levaram a frutos com qualidade de sementes inferiores, sendo assim, esse autor indica que para berinjela Ciça em condições brasileiras, é aconselhável armazenar o pólen até 20 dias, a fim de obter uma produção de semente ideal e com maior qualidade. Daniel et al (2002) trabalharam com pólen de inhame branco (*Dioscorea rotundata* Poir) armazenado durante dois anos à temperaturas de -80, -20, 5 e 15°C, os resultados mostraram que houve a manutenção da capacidade de germinação em todos os níveis de temperatura, porém verificaram que não houve perda significativa da viabilidade do pólen armazenado a 5 e 15°C até 100 dias de armazenamento, porém após 700 dias, grãos de pólen armazenados a 5 e 15°C perderam a capacidade de germinação, enquanto não houve diferença significativa entre a germinação de pólen fresco e do pólen congelado (-80 e -20°C). Dutra et al. (2000) também afirmam que ambientes com umidade relativa controlada e baixa temperatura permitem a manutenção da capacidade germinativa dos grãos de pólen de pimenta. O aumento da temperatura nesta mesma condição de umidade diminuiu a viabilidade polínica de grãos de pólen de pistache (VITHANAGE; ALEXANDER, 1985). No mesmo contexto, Giordano et al. (2003), afirmam que grão de pólen de tomate, pode permanecer viável por várias semanas quando armazenado em ambientes com baixa umidade relativa do ar e baixa temperatura. Caso o armazenamento seja feito em dessecador, com temperatura de 0°C a 5°C, o pólen poderá permanecer viável por um período de até seis meses.

Em estudos com tremoço amarelo (*Lupinus luteus* L.), Andrada e Hill (1999) armazenaram pólen a -18, 3, 15 e 25°C e observaram redução depois de dois anos de armazenamento a -18 e 3°C, embora 10,8% dos grãos de pólen tenham permanecido viáveis. No armazenamento em temperatura acima de 15°C não houve germinação. Entretanto, Aslantas et al. (2002), observaram que pólen de morango armazenado a 22, 4, -4 e -18°C manteve-se viável a -18°C por 20 meses. Mardi et al. (2000) secaram grãos de pólen de palma (*Phoenix dactylifera* L.) e armazenaram em congelador (-18°C), refrigerador (4 a 5°C) e temperatura ambiente (23 a 25 °C) durante 6 e 12 meses. O pólen mantido em refrigerador e freezer obteve maior porcentagem de

germinação, enquanto no armazenado à temperatura ambiente a germinação foi drasticamente reduzida.

Siregar e Sweet (2000) estudaram pólen de *Pinus* armazenado a 4°C, por um ano, e obtiveram um índice de germinação de 84%, comparado com 93% de viabilidade do pólen fresco. Pólen de eucalipto foi armazenado por Sousa (1988) em freezer (-16°C) e em refrigerador (-4°C) dentro de dessecadores. Após três meses de armazenamento, verificou-se que a temperatura de -16°C foi mais adequada. Já Pereira (2001), armazenou pólen de eucalipto em freezer (-4°C) por um, dois e três meses, constatando decréscimo na viabilidade do pólen no decorrer do período de armazenamento.

Em papaya, o grão de pólen pode ser armazenado com sucesso durante seis meses, quando mantido a -18°C em um congelador (COHEN et al., 1989). Bombem et al. (1999) armazenaram pólen de kiwi (*Actinidia chinensis* Planch.) a 4, -18 e -80°C, com germinação testada a cada dois meses durante o primeiro ano e a cada seis meses nos anos seguintes. O pólen armazenado a 4°C teve diminuição rápida e linear na germinação, não havendo germinação após 24 semanas. O armazenamento a -18°C manteve um índice de germinação considerável (40 e 60%) durante 80 semanas. Pólen armazenado a -80°C manteve-se viável após 160 semanas.

Oliveira Júnior et al. (1995) armazenaram grãos de pólen de pessegueiro cv. 'Aurora' (*Prunus pérsica* (L.) Batsch) à temperatura ambiente por 15 e 30 dias e não obtiveram resultados satisfatórios, com 1,81% de germinação aos 30 dias de armazenamento. Enquanto que Eenik (1983) armazenou pólen de alface em temperatura ambiente (20°C) e refrigerador (4°C), e observou uma perda da viabilidade após dois dias à temperatura ambiente, porém o material armazenado em refrigerador, perdeu a viabilidade após quatro dias.

Parton et al. (2002) armazenaram pólen de *Bromeliaceas* em nitrogênio líquido (-196°C) e não houve perda considerável da viabilidade, para isso foi necessário um período de desidratação de quatro horas antes e um período de reidratação de uma hora após a criopreservação. Em batata, o grão de pólen quando armazenado a -20°C e -196°C apresentou viabilidade para produzir sementes (WEATHERHEAD et al., 1978). Sparks e Yates (2002) observaram que o pólen de noqueira pecan (*Carya illinoensis* K.) permaneceu viável por 1, 10, 11, 12 e 13 anos em nitrogênio líquido.

Ganeshan (1986) armazenou amostras de pólen de *Allium cepa* L. em nitrogênio líquido (-196°C), durante 360 dias, comprovando que a duração do

armazenamento não influenciou a viabilidade e capacidade de fertilização do pólen desta espécie. Por sua vez, Gomes et al. (2003) armazenaram grãos de pólen de cebola, em diferentes condições, por dois anos. O pólen conservado por um ano, em nitrogênio líquido, foi, então, transferido para um refrigerador, a 4°C, registrando-se a porcentagem de germinação após 10, 15, 20 e 30 dias de permanência neste. O armazenamento em nitrogênio líquido foi o melhor ambiente para a conservação dos grãos de pólen, durante dois anos. As amostras armazenadas por um ano, em nitrogênio líquido, que foram transferidas para o refrigerador, conservaram-se viáveis por até dez dias.

Ganeshan e Alexander (1991) armazenaram pólen de limão em nitrogênio líquido (-196°C) durante três anos e meio e verificaram que a taxa de germinação de pólen foi semelhante à de pólen fresco. O pólen de cebola cv. Petrolini foi armazenado, pelo período de um ano, em nitrogênio líquido e no interior de um dessecador com ácido sulfúrico, mantido em congelador -18°C (GOMEZ et al., 2000). Os autores constataram que a melhor condição para o armazenamento foi em nitrogênio líquido.

Isso indica que baixas temperaturas propiciam a manutenção da viabilidade do pólen por um período prolongado de tempo, bem como a umidade relativa de armazenamento. Assim, mesmo obtendo pólen com germinação viável em teste de laboratório, não significa que o pólen consiga fertilizar o óvulo e produzir sementes, isso significa que o período de viabilidade depende da espécie e pode durar de dias a anos (FRANÇA, 2008).

Esses trabalhos demonstram que a criopreservação (armazenamento em nitrogênio líquido a -196 ° C) é um método eficiente para conservação de pólen, já que este pode ficar armazenado por 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 porta diferentemente frente aos referidos processos, por isso é primordial que mais pesquisas e metodologias referentes a esta técnica sejam desenvolvidas (SOUSA et al., 2010). No gênero *Paspalum*, não existem estudos publicados sobre a viabilidade e conservação de grãos de pólen além disso outros trabalhos existentes na literatura sobre preservação de grãos de pólen de diversas espécies não possuem descrição detalhada da metodologia de extração, secagem e conservação, o que dificulta a sua replicabilidade.

### 3.8 Criopreservação em culturas vegetais

A criobiologia é uma ciência relativamente nova e ganhou maior destaque nos últimos anos, uma vez que foram desenvolvidos diversos protocolos de criopreservação para espécies de plantas de propagação vegetativa, gramíneas, ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, medicinais e aromáticas (SANTOS, 2001).

A criopreservação consiste na conservação de material biológico (estruturas vegetativas e reprodutivas) a temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$  (KARTHA, 1985), mantendo as características do material, após o descongelamento. Essa técnica tem se mostrado eficiente e prática para conservação a longo prazo de recursos filogenéticos, principalmente no que refere a espécies que apresentam sementes recalcitrantes ou intermediárias (SANTOS, 2000).

Diante disso, o método tem sido considerado o meio mais promissor de preservação a longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais, e é a maneira ideal para conservação de germoplasma (TOWILL, 2002), pois é capaz de interromper o metabolismo celular, e é adequado, pois mantém a estabilidade genética e as características fenotípicas dos materiais biológicos, permitindo o armazenamento por tempo indefinido, usando pouco espaço e necessitando de pouca manutenção (CARVALHO; VIDAL, 2003; ENGELMANN, 1997).

Todavia, o desenvolvimento da criopreservação de células e tecidos vegetais seguiu os mesmos avanços feitos em mamíferos, ainda que algumas décadas mais tarde. Em 1960, Sakai realizou o primeiro trabalho relacionado à sobrevivência de tecidos vegetais em condições de temperaturas ultrabaixas, entretanto os avanços foram lentos e quase uma década passou, até que fosse demonstrado o uso do dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor em células vegetais.

Em 1968, Quatrano publicou os trabalhos feitos por Sakai, em que ele demonstrou que brotos de amoreira podiam suportar o congelamento em NL, após a desidratação dos mesmos. Em 1971, Latta desenvolveu um protocolo para criopreservação de células de cenoura em cultura e estas sobreviveram após congelamento em nitrogênio líquido. Os métodos utilizados foram os mesmos que já haviam sido empregados com sucesso para outros materiais biológicos: uso de crioprotetores químicos; desidratação e congelamento lentos, seguidos de rápida

imersão em NL; descongelamento rápido; lavagem e recuperação do material (ENGELMANN, 1997).

Os trabalhos envolvendo a conservação de materiais vegetais, são considerados métodos clássicos e foram baseados na sequência de eventos descritos acima e foram desenvolvidos na década de 70 e 80 (KARTHA, 1985). Contudo, novas técnicas foram realizadas nos últimos anos, permitindo a aplicação da criopreservação para vários tipos de tecidos e órgãos vegetais. Os métodos clássicos de criopreservação envolviam a desidratação induzida pelo congelamento lento, enquanto que as novas técnicas são baseadas na vitrificação (FAHY et al., 1984).

A criopreservação tem se mostrado eficiente para o armazenamento de várias partes das plantas como: sementes, pólen, embriões somáticos e zigóticos, partes vegetativas como raízes, bulbos, tubérculos, gemas, ápices meristemáticos, dentre outras. Esse método pode assegurar a conservação do material por longos períodos de tempo, pois, nas condições de temperatura citada acima, ocorre a paralisação do metabolismo basal, impedindo assim a deterioração fisiológica do material biológico (BAJAJ, 1995; GONZÁLEZ-BENITO, 1998; KARTHA, 1985).

De acordo com Santos (2000), nos últimos vinte anos foram publicados numerosos relatos de criopreservação de plantas de propagação vegetativa, cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes, medicinais e aromáticas, entre outras. Em cada caso foi utilizado diversas técnicas, incluindo a criopreservação de protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões (somáticos, zigóticos e nucleares) e produtos biotecnológicos (culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagens celulares geneticamente modificadas) (REED, 2002; SAKAI, 1995; STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995).

O teor de água presente no material a ser criopreservado tem sido o maior problema encontrado no processo de criopreservação, pois baixos teores de água levam à excessiva desidratação e morte celular, por outro lado, altos teores de água levam à formação de cristais de gelo no interior das células, ocasionando a ruptura do sistema de membranas celulares e a perda da permeabilidade seletiva e da compartimentalização das células, nesse caso, ocorre colapso e morte celular (CARVALHO, 2006). Portanto, para garantir a sobrevivência dos tecidos vegetais à criopreservação, é necessário que os mesmos tolerem à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido. Deste modo, faz-se necessário o conhecimento de mecanismos bioquímicos e biofísicos associados à

resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação (STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995).

De acordo com Santos (2000), a formação de cristais de gelo nas células é um dos grandes problemas encontrados na criopreservação, pois à medida que a temperatura decresce e aproxima-se de 0°C, a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento (“supercooling”) e posteriormente ocorre a formação de gelo no meio extracelular, pois a parede celular e a membrana plasmática agem como barreiras, prevenindo que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem a célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma, dessa maneira, o conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado.

Dessa forma, a velocidade de congelamento irá interferir nos eventos físicos subsequentes. A célula supercongelada perde água porque a pressão de vapor da água na célula excede aquela do exterior celular congelado, e com a progressiva redução da temperatura a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular se o congelamento ocorre de forma lenta. Isso resulta na concentração da solução celular aumentada e a célula perde turgor. Este fenômeno (“freezeinduced desiccation”) é conhecido como desidratação induzida por congelamento. Em tais casos, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre, evitando assim a formação de gelo em seu interior. O equilíbrio é estabelecido quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas se igualar àquele do gelo extracelular, e enquanto a temperatura permanecer constante, a desidratação adicional não ocorrerá (SANTOS, 2000).

Por outro lado, se a célula foi congelada muito rapidamente a desidratação por congelamento não ocorre, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e eventualmente a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo que causam injúria mecânica às células decorrente da expansão da água (STEPONKUS; WEBB, 1992). Evitar a formação dos cristais de gelo é o principal objetivo a ser alcançado na definição de um protocolo de criopreservação de determinado material biológico. Após o descongelamento as células intactas podem reabsorver água e ganhar turgor novamente (SAKAI; LARCHER, 1987). Entretanto, se as células são desidratadas em excesso elas podem ser danificadas pela exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos eletrólitos celulares (efeitos de solução) (SANTOS, 2000).

Geralmente, os materiais vegetais utilizados apresentam altos teores de água em suas células. Faz-se necessário uma desidratação do material antes de ele ser congelado. Por sua vez, a desidratação não é um processo simples, pois a água exerce inúmeras funções biológicas fundamentais nas células. A água é um importante solvente, meio de transporte, tamponante e um constituinte essencial e estabilizador da estrutura de macromoléculas e organelas. Para obter êxito em um protocolo de criopreservação, o teor de água deverá ser baixo o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo, porém para evitar a desidratação excessiva, o teor de água não pode ser muito baixo para não causar injúria na célula (SANTOS, 2001).

O estado cristalino ou o estado vítreo, é o único estado físico existente abaixo da temperatura de aproximadamente  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a viscosidade é muito elevada, a difusão é considerada insignificante (dependendo da escala de tempo da armazenagem), a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrerão muito lentamente ou serão paralisadas completamente (KARTHA, 1985). Desse modo, o armazenamento à temperatura do nitrogênio líquido, pode manter a viabilidade e a alta estabilidade genética do material por muitos anos (STUSHNOFF; SEUFFERHELD, 1995).

Para que ocorra a sobrevivência e a regeneração do material criopreservado, alguns fatores devem ser levados em consideração como o tamanho e o estágio de desenvolvimento do material, desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração. Os tecidos da planta toleram de forma diferente à desidratação e isto resulta em sensibilidade diferente à exposição ao nitrogênio líquido. Em estruturas menores, o congelamento ocorre de forma mais rápida e uniforme, portanto são mais apropriadas ao congelamento, de modo geral, material jovem, em estágio meristemático, também apresenta melhores resultados, pois as suas células são pequenas e contém citoplasma denso com poucos vacúolos e, portanto, pouca água (ENGELMANN, 1991).

Entretanto, outros tipos de material vegetal como pontas de ápice, raízes, células em cultura, protoplastos, pólen, anteras, embriões somáticos e zigóticos e sementes inteiras de várias espécies, poderão ser regeneradas em qualquer época, com sucesso, sem risco de variações genéticas no material preservado, após congelamento em nitrogênio líquido por períodos de tempo que variam de algumas horas até alguns anos (CARVALHO; VIDAL, 2003; KARTHA, 1985; WITHERS, 1987).

Uma maneira rápida e prática de iniciar um banco de germoplasma, é fazendo o armazenamento do grão de pólen (REED, 2002), pois é uma maneira de

conservar parte da diversidade genética por meio de uma forma acessível e que pode ser utilizada pelos melhoristas de plantas. O armazenamento de grão de pólen é semelhante ao das sementes, apesar do teor de água dos grãos de pólen seja mais fácil de ser ajustado, a qualidade do pólen é muito importante para o processo, uma vez que grãos de pólen coletados de anteras muito novas ou velhas não sobrevivem bem ao armazenamento. Outro fator importante a ser considerado é que plantas estressadas produzem pólen com baixa fertilidade. Apesar disso, o armazenamento tanto de pólen quanto de sementes, requer pouco espaço físico, e sobretudo, preserva grandes quantidade de material genético (TOWILL, 2002).

A tolerância dos grãos de pólen à perda de água é variável, assim como nas sementes, e podem ser denominados de resistentes ou sensíveis, assim, grãos de pólen resistentes podem ser desidratados a baixos teores de água que variam de 5 a 10%, sendo utilizados os mesmos métodos aplicados às sementes, e em seguida ser colocados diretamente no NL e descongelados à temperatura ambiente sem maiores problemas. Em baixos teores de água, quanto menor a temperatura de armazenamento, maior a longevidade das sementes e, também do pólen (CARVALHO, 2006). O pólen de várias espécies é tolerante à desidratação, tendo comportamento semelhante ao das sementes ortodoxas, porém, normalmente plantas que possuem sementes ortodoxas, possuem pólen sensível e vice-versa (TOWILL, 2002).

Análogo ao que ocorre com a dessecação de sementes tolerantes, se a umidade é reduzida de modo que pelo menos a água congelável é removida, o armazenamento a baixas temperaturas pode ser possível (VERTUCCI, 1989). No entanto, os níveis de umidade ótimos necessários para manter a viabilidade a baixas temperaturas para diversas espécies de pólen não foram determinados. Pólen sensível à dessecação não pode ser tratado como descrito pois perderia a viabilidade, neste caso, protocolos originais devem ser desenvolvidos para este tipo de pólen (CONNOR; TOWILL, 1993). De acordo com Livingston e Ching (1967), tem sido aplicado com sucesso o armazenamento de pólen em nitrogênio líquido para várias espécies florestais, dentre essas, há informações de armazenamento por períodos de cinco a sete anos. Copes (1987), manteve pólen de *Pseudotsuga menziesii* viável por três anos, enquanto que Luza e Polito (1988), mativeram pólen de *Juglans regia* L. por um ano. Outros pesquisadores como Partfitt e Almehti (1983) conservaram com sucesso o pólen de *Vitis vinífera* L. Um dos fatores que mais interfere no sucesso dessa tecnologia é o teor de umidade. Ao que tudo indica, existe um nível ideal de umidade para cada espécie.

Copes (1987) em seu trabalho, armazenou o pólen de *Pseudotsuga menziesii* com umidade entre 4 a 7%, enquanto que para o pólen de *Juglans regia* L. a umidade ideal estava entre 3,2 e 7,0% (LUZA; POLITO, 1988). Existem, também, espécies cujos grãos de pólen perdem a viabilidade com a secagem drástica, como *Simmondria chinensis* e *Zea mays* L. Nessa última espécie, o estágio trinuclear do pólen dificulta o processo. A alta umidade prejudica a criopreservação pois contribui para a formação de gelo intracelular durante o congelamento. Em geral, o limite máximo de umidade do pólen, previamente ao seu congelamento, para diversas espécies, está entre 20 e 40%. Por outro lado, o limite inferior estimado entre 1% e 5% deve ser utilizado com cuidado, pois pode haver redução de viabilidade a esses níveis (KARTHA, 1985). Embora ocorra a indicação de que para obter êxito na criopreservação o teor de água dos grãos de pólen deve estar abaixo de 20%, não há ainda, estudos definindo qual a umidade mínima, para que o pólen ainda mantenha sua viabilidade (CONNOR; TOWILL, 1993).

Para o melhorista de plantas, um importante aspecto da criopreservação é o armazenamento de pólen. O pólen armazenado em NL é capaz de manter sua viabilidade por longos períodos de tempo, e o fitomelhorista não necessita esperar pelo crescimento e florescimento da planta para obter o parental masculino, pois 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), trazendo 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 têm armazenado pólen em NL, como forma de aperfeiçoamento dos programas de melhoramento genético. A conservação de pólen deve, por essas razões, ser integrada aos bancos ativos de germoplasma. 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 a 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, 1979; TOWILL, 1985).

O pólen é bastante importante para a conservação de material genético de várias espécies, por isso, vem sendo estocado em vários institutos. O NBPGR (National Bureau for Plant Genetic Resources), possui pólen criopreservado de 65 acessos pertencentes a diferentes espécies e localiza-se na Índia. O Instituto Indiano para Pesquisa em Horticultura (IIHR – Indian Institute for Horticultural Research, Bangalore) preserva pólen de 600 acessos pertencentes a 40 espécies de 15 famílias diferentes, sendo que alguns estão estocados há mais de 15 anos. Já o NCGRP (National Center for Genetic Resources Preservation), nos EUA conserva o pólen de 13 cultivares de ervilhas e de 24 espécies de *Pyrus* (ENGELMANN, 2004).

Os estudos sobre os custos de implantação do sistema e manutenção de materiais vegetais em NL, ainda são poucos. Entretanto, na literatura revisada, alguns trabalhos vêm confirmando a viabilidade do uso da criopreservação, também sob o ponto de vista econômico, o custo anual de manutenção de um acesso de uma fruteira temperada é da ordem de 900 dólares, se mantida a campo; 23 dólares, quando armazenada *in vitro* sob condições de crescimento mínimo; e de apenas um dólar, quando criopreservada, conforme o trabalho realizado por Hummer e Reed (2000), citado por Engelmann (2004). Porém é recomendado, adicionar um custo inicial de 50 a 60 dólares para criopreservar o material, um exemplo a ser citado é sobre a coleção de mandioca do Centro Internacional para Agricultura Tropical (CIAT – International Center for Tropical Agriculture, Cali, Colômbia) que possui cerca de 5.000 acessos, em que o custo de manutenção anual da coleção é de 5.000 dólares para os acessos criopreservados contra 30.000 dólares dos acessos mantidos em cultivo mínimo *in vitro* (ENGELMANN, 2004).

É preciso salientar, todavia, que a criopreservação não deve ser tomada como o método que irá substituir os métodos tradicionais de conservação *ex situ*. Ela fornece uma alternativa a mais para os curadores dos bancos de germoplasma, incrementando assim as formas de conservação de germoplasma já existentes.

A predileção sobre o melhor método de conservação, vai depender de alguns fatores como, o período de conservação desejável, as espécies a serem preservadas, da parte da planta utilizadas, da disponibilidade de mão-de-obra e dos recursos financeiros disponíveis. A expectativa é que, em poucos anos, a criopreservação se torne cada vez mais utilizada no armazenamento de materiais

vegetais e, conseqüentemente, na conservação das fontes genéticas vegetais por longos períodos de tempo (ENGELMANN, 2004). Porém, é importante ressaltar que a criopreservação, necessita ser estudada para muitas espécies (SANTOS, 2000).

### **3.9 Métodos de desidratação de grãos de pólen**

Para se garantir uma eficaz conservação de germoplasma é necessário que ocorra a preservação a longo prazo da viabilidade do material armazenado. Como a maioria das sementes ortodoxas e pólen são capazes de suportar a dessecação extrema, eles são particularmente adequados para a conservação, porém a manutenção da longevidade só é possível através da redução da umidade relativa e da temperatura de armazenamento (BUITINK et al., 1998).

Grãos de pólen de diversas espécies podem sobreviver com sucesso armazenados a temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$  como visto anteriormente, mas para isso a taxa de umidade tem que ser mantida dentro de certos limites (STANLEY; LINSKENS, 1974; TOWILL, 1985). Um método muito utilizado para monitorar o teor de umidade é realizado colocando o grão de pólen sobre soluções salinas de diferentes umidades relativas. Algumas soluções já são bem definidas e podem ser utilizadas para este fim, como soluções de ácido sulfúrico de densidade variável (LANNER; FOREST, 1962) e soluções saturadas de vários sais que apresentam umidades relativas bem estabelecidas (WINSTON; BATES, 1960; YOUNG, 1967).

Os meios tradicionais e mais convenientes de fornecimento de umidades relativas padrão cobrindo uma vasta gama de valores é a utilização de soluções salinas, saturada ou insaturada, em pequenos recipientes. Qualquer solução de sal a uma concentração definitiva e a uma temperatura constante, está em equilíbrio com uma pressão parcial de vapor de água fixa e, portanto, define uma umidade relativa fixa (YOUNG, 1967).

De acordo com Vertucci e Roos (1990), Walters et al., (1998) e Eira et al., (1999), para determinar as relações entre a umidade relativa do ar, temperatura e o grau de umidade de equilíbrio das sementes e o estabelecimento de isotermas de sorção (relação entre a umidade relativa do ar e o grau de umidade das sementes), sob determinada temperatura, trabalhos com soluções salinas saturadas podem ser administradas. O mesmo pode ser feito para definir o nível crítico de água das sementes com perspectivas para armazenamento em diferentes temperaturas (VERTUCCI et al.,

1994; WALTERS et al., 1998). Em sementes, é realizado o estudo de sorção de água por meio de substâncias sólidas, através de isotermas. Devido a higroscopia, as sementes cedem ou absorvem água do ar que as envolve, nesse caso, se a pressão de vapor d'água contida na semente for menor que a do ar, ocorre a absorção de água (adsorção) e, no caso inverso, a semente cede água para o ar (dessorção). Quando a pressão da água da superfície da semente se iguala à pressão de vapor do ar ambiente, obtém-se a umidade de equilíbrio (NELLIST; HUGHES, 1973).

Sabe-se que as soluções salinas saturadas produzem umidade relativa do ar própria de cada sal em uma determinada temperatura (MEDEIROS, 2006). Deste modo, para se investigar a influência da umidade relativa do ar e temperatura na longevidade de pólen, pesquisas já foram realizadas utilizando soluções salinas saturadas (BUTINK et al., 1998). O processo de desidratação/hidratação está no equilíbrio entre a umidade relativa do ar e a umidade contida no grão de pólen (CONNOR; TOWILL, 1993).

Roberts (1973) definiu que grãos de pólen que permanecem viáveis após a secagem e contém baixa umidade são denominados de tolerantes à dessecação, enquanto que grãos de pólen que perdem a viabilidade durante a secagem são denominados de sensíveis à dessecação. Assim, Copes (1985) e Towill (1981), descreveram trabalhos com grãos de pólen tolerantes à dessecação armazenados com sucesso a baixa umidade em torno de 5% a 7%.

Sabe-se ainda que a umidade relativa de uma solução salina saturada varia dependendo da temperatura, porém ela continua a ser constante no interior de um espaço fechado para a maioria dos sais. Todavia, falta informações sobre o teor de umidade do pólen e cinéticas de ganho de umidade ou perda em determinadas umidades relativas (CONNOR; TOWILL, 1993).

Trabalhos realizados por Connor e Towill (1993), com *Pinus ponderosa* Dough. ex P. Laws., *Picea pungens* Engelm e *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch, utilizando diferentes soluções salinas saturadas ( $MgCl_2$ ,  $Mg(NO_3)_2$ ,  $NH_4NO_3$  e  $KCl$ , e  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) demonstram que os grãos de pólen sobreviveram ao tratamento de dessecação e exposição a nitrogênio líquido, estes estudos fornecem informações sobre a variabilidade esperada nas respostas de desidratação / hidratação de grãos de pólen das diversas espécies mantidas em uma coleção de germoplasma.

As soluções mantêm a umidade relativa constantes na atmosfera, porque qualquer solução não volátil em água terá uma pressão de vapor de água definida a uma

dada temperatura, quando a fase de vapor está em equilíbrio com o líquido. As constâncias da pressão de vapor podem ser explicadas pelo uso da regra das fases de Gibbs discutido em textos de físico-química. Soluções saturadas com um excesso de sólidos (as "soluções supersaturadas" de alguns autores) mantêm uma pressão de vapor muito constante, mesmo sob condições de alterações da umidade porque um ganho de água faz com que sólido entre na solução e uma perda de água faz com que o material dissolvido se precipite. Enquanto não há muito líquido sobre o sólido, a difusão que ocorre dentro da solução é muito lenta, e as condições de umidade permanecerá inalterada. Assim, quantidades consideráveis de água podem ser ganhas ou perdidas pelo organismo, sem alterar a pressão de vapor (WINSTONS; BATES, 1960).

De acordo com trabalhos realizados por Connor e Towill (1993), o teor de umidade do pólen foi facilmente e precisamente regulados por soluções salinas saturadas de umidades variáveis. Embora o teor de umidade de equilíbrio (EMC) para um determinado sal varia entre os diferentes tipos de grãos de pólen usados, a variação não foi extrema. Assim, colocando o pólen tolerante a dessecação sobre uma solução saturada de sal com uma umidade relativa baixa durante aproximadamente 2 h é um método razoável para a redução da umidade para fins de armazenamento. A extensão e a taxa de variação de umidade do pólen dependem do sal, o gradiente entre o teor de umidade do sal e do conteúdo de umidade do pólen e do tipo de pólen. Nesse trabalho, observou-se que os grãos de pólen se aproximam do equilíbrio dentro de aproximadamente 1-2 horas depois de ter sido colocada sobre todas as soluções salinas saturadas de desidratação testadas pelos autores, mas os teores de umidade geralmente não se estabilizaram durante 6-24 h (CONNOR; TOWILL, 1993).

Nos últimos anos foram publicados vários valores de umidades relativas em equilíbrio para diversas soluções salinas, em diferentes temperaturas. Os resultados desses trabalhos foram reunidos e confrontados com resultados anteriores e estão representadas em gráficos e tabelas explicativas para permitir que pesquisadores escolham as soluções salinas que melhor atender às suas necessidades específicas. Estas tabelas e gráficos podem ser encontradas nos trabalhos de Young (1967); Winston e Bates (1960) e Connor e Towil (1993). Também são apresentados alguns dados sobre as umidades relativas em equilíbrio sobre soluções salinas insaturadas. A utilização de soluções salinas saturadas para controlar a umidade relativa é um método barato e cômodo. A maioria dos reagentes é prontamente disponível em pureza razoável, são

seguros de manusear e não são voláteis, evitando assim a contaminação do espécime (YOUNG, 1967).

Certos sais são inadequados para essa finalidade, devido a sua instabilidade ou comportamento irregular. Winston e Bates (1960), lista vários haletos [cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), brometo de alumínio ( $\text{AlBr}_3$ ), cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), e cloreto de tório (IV) ( $\text{ThCl}_4$ ) que são propensas a hidrólise, e alguns outros halogenetos que são sensíveis à luz.  $\text{FeCl}_3$  com uma umidade relativa de 5,0% a 25 °C é o único do exemplo que pode ser usado com grande vantagem, apesar da diferença entre as preparações. Buxton e Mellanby (1934), indicam que  $\text{NH}_4\text{Cl}$  libera vestígios de  $\text{NH}_3$  e que  $\text{LiCl}$  desprende  $\text{Cl}_2$  acima de 37°. A escolha de sais deve ser regida pelo custo, disponibilidade e reprodutibilidade dos resultados; existem vários para escolher na maioria das umidades e temperaturas.

Na literatura, dificilmente são mencionadas formas de secagem do pólen, e nos casos em que isso ocorre (AKIHAMA et al., 1978; ASLANTAS et al., 2002; ALMEIDA et al., 2011; FERREIRA et al., 2007; GOMEZ et al., 2000; SILVA FILHO, 2007) não existe uma descrição detalhada da metodologia utilizada e do teor de água residual presente nos grãos de pólen. Isto dificulta sua repetibilidade e utilização prática na produção de sementes híbridas.

### **3.10 Estudos de viabilidade de grãos de pólen pelo método de coloração**

A determinação da viabilidade do grão de pólen e a germinação do tubo polínico são fatores importantes para o melhoramento de plantas, uma vez que cada grão de pólen carrega os materiais genéticos resultantes da recombinação (SOUZA et al., 2002). Um dos maiores problemas da polinização manual relatada pelos melhoristas são o tempo e o espaço, deste modo, preservar a viabilidade do pólen pode permitir cruzamentos entre plantas localizadas em locais diferentes e ser a solução para esses problemas (BISSIR; NIKNEJAD, 1976).

É importante que o pólen tenha boa viabilidade para que ele possa obter sucesso nas hibridações controladas. É preciso, muitas vezes, armazenar o pólen colhido, para ser utilizado posteriormente, devido à não-coincidência de floração. Por outro lado, não são raras as situações em que o pólen a ser usado tenha sido colhido em outra região ou mesmo, fornecido através de intercâmbio com outros países, neste caso é necessário testar a viabilidade do mesmo, antes de sua utilização (EINHARDT, 2006).

Para determinar a viabilidade do pólen, são usados dois tipos de procedimentos, métodos diretos, que consiste na indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e métodos indiretos, que são baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (DAFNI, 1992; SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992). Por ser um procedimento barato e simples, a coloração é muito utilizada e fornece resultados em curto espaço de tempo, esse método é muito atrativo para a palinologia, ciência que estuda os grãos de pólen (ALVIM, 2008).

Dentre os corantes mais utilizados destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (SHARMA; SHARMA, 1994; STANLEY; LINSKENS, 1974;), cloreto de trifeniltetrazólio, tetrazólio vermelho (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; STANLEY; LINSKENS, 1974) e verde malaquita com fucsina ácida (ALEXANDER, 1980), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo.

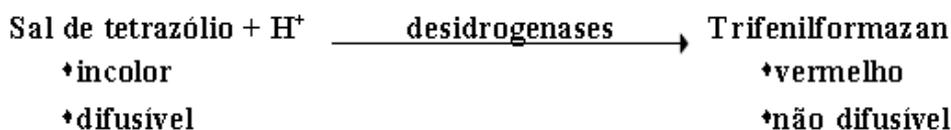
O carmim acético indica a integridade cromossômica (MUNHOZ et al., 2008), considerando-se viáveis os grãos de pólen corados de vermelho e inviáveis aqueles não corados. Na solução Alexander, o verde de malaquita reage com a celulose da parede do pólen, enquanto a fucsina ácida reage com o protoplasma. Assim, grãos de pólen abortados coram-se de verde, e os viáveis, de roxo (ALEXANDER, 1980). O cloreto de trifeniltetrazólio, baseia-se na alteração da coloração dos tecidos, em presença de solução salina de 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio, o qual é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando num composto chamado formazan, de coloração vermelha carmim, tecidos mortos não apresentam coloração. O padrão de coloração dos tecidos pode ser utilizado para classificar os grãos de pólen corados como viáveis e os incolores, como inviáveis (VIEIRA et al., 1998).

O uso de corantes é um método relativamente seguro para estimar a quantidade de grãos de pólen viáveis, o que permite fazer inferências importantes sobre a integridade dessas estruturas (MENCK et al., 1990). A estimativa da viabilidade é dada pela contagem dos grãos de pólen viáveis e não viáveis que se mostram corados e não corados, respectivamente, deste modo considera-se que existe uma correlação entre a viabilidade e a coloração. Apesar de ser um método simples e barato, os resultados de coloração não são totalmente confiáveis, como já relatado, pois, eles podem fornecer uma informação sub ou superestimada da viabilidade. Neste caso, vale a comparação dos dados obtidos por coloração com outra técnica. Pode-se optar pelo método de observação da capacidade germinativa do grão de pólen, visto que a germinação é um

caráter que se correlaciona diretamente com a capacidade de fertilização (ALVIM, 2008). Esses testes têm sido empregados principalmente quando é necessário armazenar grãos de pólen com o objetivo de realização de cruzamentos controlados entre parentais com diferentes períodos de florescimento ou que se encontram em regiões distantes (TECHIO et al., 2006).

### 3.10.1 Tetrazólio

Um dos corantes mais usados é o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio. O teste de tetrazólio baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases (BULAT, 1961; COOK; STANLEY, 1960), as quais catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio ou TCT) nos tecidos vivos (MOORE, 1973). Quando o TCT é reduzido nas células vivas, a reação de redução resulta na formação de um composto vermelho, estável e insolúvel, conhecido por trifenilformazan, essa reação, indica que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade na célula e no tecido. Desse modo, a coloração vermelha da reação, é a indicação da viabilidade através da detecção da respiração a nível celular, sendo assim, tecidos não viáveis não reagem e conseqüentemente não apresentam coloração. Associa-se neste caso a capacidade de germinação com a atividade enzimática (SOUSA, 1988).



**Figura 2.** Formação do trifenilformazan a partir da reação química do sal de tetrazólio com hidrogênio.

Fonte: Neto et al., 1998

Quando o tecido está vivo, a coloração será um vermelho carmim claro; se este está em deterioração, haverá a formação de uma cor vermelho mais intenso, devido a maior intensidade de difusão da solução de TCT pelas membranas celulares comprometidas desses tecidos e quando o tecido não é viável, não ocorrerá a redução do sal, e esse se manterá branco (incolor) (MOORE, 1973).

Este corante é empregado com grande intensidade para determinar a viabilidade de sementes. Vieitez (1952), realizou o primeiro trabalho relacionado à coloração de pólen utilizando grãos de pólen de milho. A escolha dessa espécie deve-se a grande abundância de pólen disponível e a nítida percepção da cor vermelha produzida na reação. O autor verificou que a temperatura a qual a reação ocorreu com máximo vigor foi ao redor de 50°C e que a reação se mostrou um pouco ineficaz com temperaturas superiores a 60°C e 70°C devido a destruição do sistema enzimático. Quanto à temperatura ótima destaca que a mesma nem sempre se constitui em um ponto fixo uma vez que depende da quantidade de enzimas presentes.

### **3.11 Germinação *in vivo* via fluorescência**

O teste de germinação *in vivo* consiste na deposição de grãos de pólen no estigma receptivo e, no destaque do estilete após um determinado período. Em seguida é realizada a contagem do número de tubos que penetraram no estigma, e comparado ao número total de grãos de pólen (SOUSA, 1988). Retrata-se algumas desvantagens dessa metodologia, do ponto de vista prático, que podem refletir na avaliação da viabilidade, tais como a dificuldade de penetração do tubo polínico na superfície estigmática devido a superfície cuticular; a presença de água no estigma, que pode levar à ruptura do pólen, de forma que o mesmo não germine e; a não receptividade do estigma ou a incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; a aplicação de alta concentração de pólen que irá inibir a penetração do tubo polínico no estilete; a dificuldade de se identificar os tubos polínicos dos grãos germinados no estigma e a ocorrência de uma queda acentuada na temperatura, podendo modificar drasticamente a germinação do pólen *in vivo* e conduzir a uma viabilidade aparentemente baixa (STANLEY; LINSKENS, 1974). Resultados de pesquisa precedentes mostram que a porcentagem de germinação e porcentagem de viabilidade do pólen estão em completa anuência (BOLAT; PIRLAK, 1999). Nesse aspecto, Scorza e Sherman (1995) acreditam que um grão de pólen vigoroso, deve-se apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos.

Em vários campos de utilização é feita investigações usando a microscopia de fluorescência, por exemplo, no campo botânico, onde é aplicado este procedimento particularmente para investigar o crescimento de tubos polínicos no estilo e no ovário. O procedimento baseia-se na chamada fluorescência secundária, que

representa a absorção seletiva de determinadas substâncias fluorescentes, chamados fluorocromos, pelas células a serem estudadas. Nas preparações assim tratadas as células em questão, fluorescem quando irradiadas com feixes de luz que não são perceptíveis ao olho nu (KHO; BAER, 1968).

A fluorescência a partir de uma única célula pode ser detectada como uma imagem ou um sinal fotométrico, assim, a técnica de microscopia de fluorescência apresenta um grande potencial para estudos qualitativos e quantitativos sobre a estrutura e função das células das plantas (FRICKER et al., 1997). Assim, nesse tipo de técnica, o corante azul de anilina é usado pois é uma coloração específica para calose localizada na camada interior do tubo polínico, que fluoresce sob luz ultravioleta especificadamente, o uso deste em microscopia de fluorescência permite a visualização de tubos polínicos no estigma e ao longo do estilete, fornecendo informações relacionadas com a compatibilidade de acessos e viabilidade do pólen (FANG et al., 2009; KALINGANIRE, 2000).

A microscopia de fluorescência se mostrou adequada para o estudo de crescimento do tubo polínico no estilo, pois além de ser um método rápido, a boa qualidade das imagens reduz erros de interpretação das preparações. A calose, é uma substância presente nas paredes dos tubos polínicos de diversas culturas, mas que está ausente no tecido circundante do estilo. A anilina ocupa esta substância seletivamente e, conseqüentemente, fluoresce quando iluminada pela luz azul ou ultravioleta. Assim, as paredes ricas em calose apresentam fluorescência verde-amarelo brilhante, contrastando nitidamente com o fundo escuro. Os tampões de calose são formados a distâncias irregulares ao longo dos tubos polínicos (KHO; BAER, 1968).

A presente técnica depende da ocorrência da calose, que conecta grãos de pólen e tubos polínicos. A demonstração feita por Currier (1957), diz que em qualquer calose, o tecido vivo ou morto, pode ser manchado seletivamente com azul de anilina e corantes similares que apresentam fluorescência sob luz ultravioleta. A técnica é confiável, simples de usar, e altamente flexível com relação à programação de tempo (MARTIN, 1959). É uma técnica avançada com objetivos amplos que, quando combinado com estudos de longevidade, viabilidade e conservação de pólen, permite a observação de alterações na estrutura de grãos de pólen, após armazenamento (VIEIRA, 2013).

Apesar disso, ocorre o decréscimo do crescimento dos tubos polínicos e da porcentagem de germinação, à medida que o grão de pólen envelhece, mesmo que o

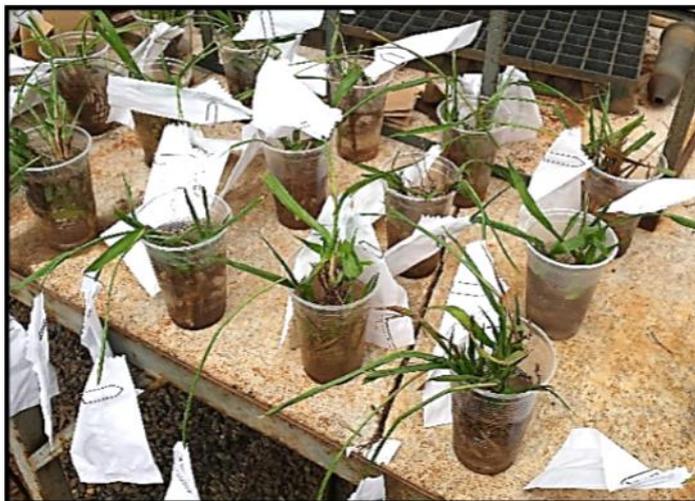
pólen aparente fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação. Para a avaliação da longevidade e controle da viabilidade do grão de pólen conservado, vários ensaios podem ser utilizados, que consistem geralmente de quatro tipos principais: por meio de corantes; germinação *in vitro*; germinação *in vivo*, e porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste (GALETTA, 1983).

De acordo com os estudos de Stanley e Linskens (1974), após o pólen ter sido armazenado, nenhum teste de viabilidade é completamente satisfatório. Isso pode ser explicado uma vez que os testes químicos usam corantes que reagem com constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar. Outra razão que explica esse fato é que amostras de grãos de pólen que germinam bem *in vitro*, mas podem não produzir elongação suficiente do tubo polínico para efetuar a fertilização. Em contrapartida, amostras de pólen que parecem não-viáveis quando testadas *in vitro*, podem produzir boa porcentagem de sementes *in vivo*, nesse caso, o pólen armazenado pode germinar diferentemente em amostragens repetidas ou em meios distintos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e armazenamento de grãos de pólen

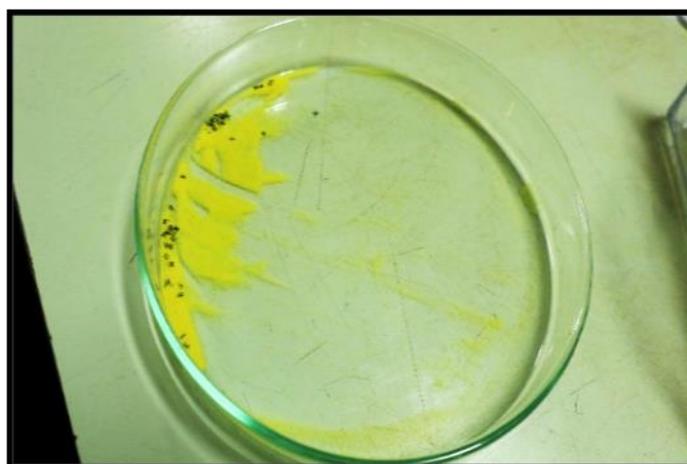
As amostras de pólen de *Paspalum notatum* foram coletadas em uma área demarcada de 90 m<sup>2</sup> localizada na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP), entre os meses de abril 2014 a novembro de 2015. As inflorescências foram colhidas à tarde, no dia anterior à deiscência das anteras e colocadas em copos plásticos com água, dentro da casa de vegetação. As inflorescências foram cobertas com saquinhos de papel (25x16cm) e mantidas assim até a manhã seguinte (Figura 3). Pela manhã, após a deiscência das anteras, aproximadamente às oito horas, as inflorescências foram levemente agitadas, induzindo à liberação do pólen (Figura 4). As amostras de grãos de pólen foram colocadas em placas de petri (100x15mm) (Figura 5) e levadas ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Pecuária Sudeste e foram submetidas aos testes de desidratação e conservação a curto, médio e longo.



**Figura 3.** Inflorescências colocadas em copo plástico com água cobertas com saquinho de papel.



**Figura 4.** Inflorescências agitadas para liberação de grãos de pólen

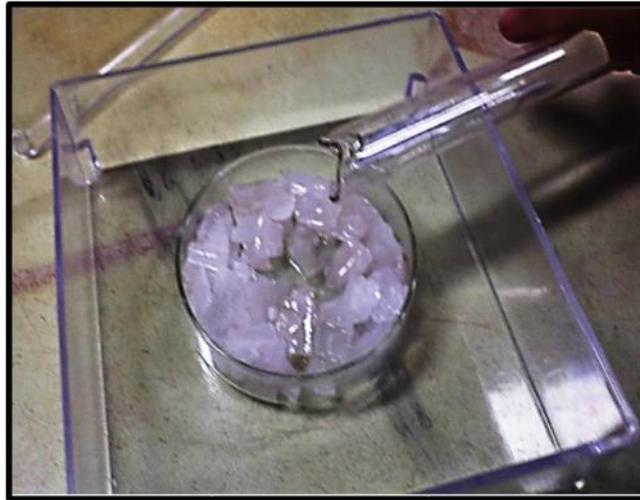


**Figura 5.** Grãos de pólen de *Paspalum notatum*

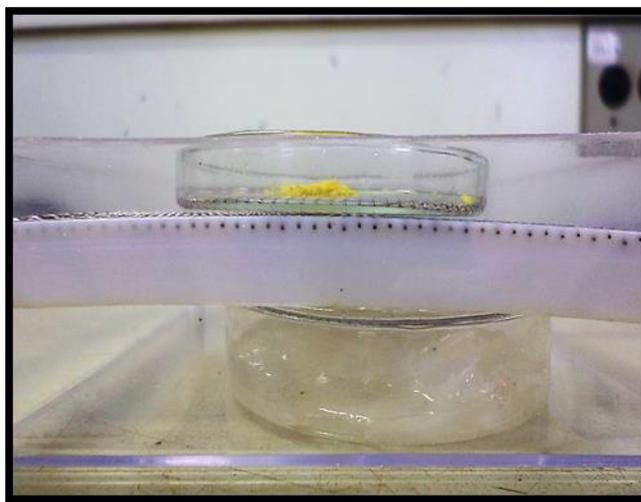
#### **4.2 Desidratação de grãos de pólen por meio de sais saturados**

Para a desidratação, foi necessário criar um ambiente fechado para abrigar os grãos de pólen. Iniciou-se com a pesagem dos sais (15g) e após foi realizado uma dissolução com água destilada (5 mL) (Figura 6) para a formação da solução saturada salina (75%), colocou-se a solução em uma placa petri (90x15mm) aberta dentro de uma caixa gerbox de material poliestireno cristal transparente capacidade de 250 ml com calço, medindo 11x11x3,5cm, com tela em aço inox para caixa plástica gerbox, medido 11x11cm., sobre a placa petri colocou-se uma tela e nesta tela colocou-se os uma placa de petri contendo os grãos de pólen (Figura 7), manteve-se as caixas gerbox fechadas por diferentes intervalos de tempo: 30, 60 e 120 minutos à temperatura

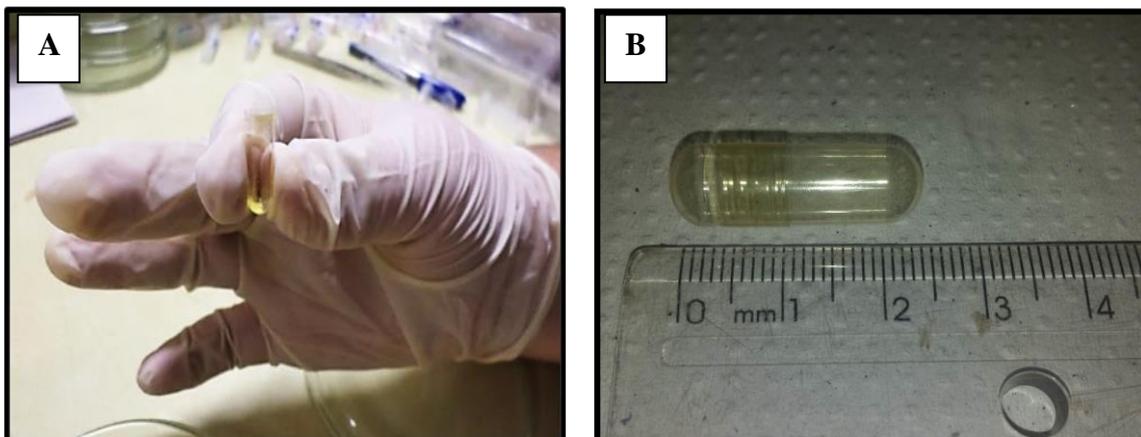
de 25°C. Após esse tempo armazenou-se os grãos de pólen em cápsulas de gelatina (Figura 8) dentro de criotubos imersos em nitrogênio líquido ou em geladeira (4°C) e freezer (-20°C), foi utilizado também um tratamento testemunha, correspondente aos grãos de pólen que não foram submetidos à secagem.



**Figura 6.** Dissolução do sal (hidróxido de sódio) em água destilada (5 ml)



**Figura 7.** Caixa gerbox com placas de petri contendo o sal saturado e os grãos de pólen para a desidratação



**Figura 8.** A: Grãos de pólen armazenados em cápsula gelatinosa. B: detalhe da cápsula gelatinosa.

Foram realizados 13 tratamentos de desidratação distintos, a fim de obter a taxa de umidade relativa ideal para a criopreservação. Além dos testes em nitrogênio líquido, foram realizados os mesmos tratamentos em geladeira e freezer, para efeitos de comparação e indicação de melhor forma de conservação a curto, médio e longo prazo.

Para a desidratação dos grãos de pólen foram utilizados sais saturados tais como, cloreto de lítio (LiCl) (75%), hidróxido de sódio (NaOH) (75%), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (75%); e também sílica gel azul (15g). As soluções salinas saturadas possuem a capacidade de manter a umidade relativa do ar específica de cada sal em uma determinada temperatura. De acordo com a tabela proposta por Winston & Bates, (1960), o sal saturado LiCl apresenta umidade relativa de 12% a 25°C, o NaOH apresenta umidade relativa de 7% a 25°C e o MgCl<sub>2</sub> apresenta umidade relativa de 32% a 25°C. Quanto à sílica gel azul, Almeida et al. (2011) afirmam que a umidade relativa é de 10 % à temperatura ambiente (25° C). Para cada tratamento foram conservados três tubos com pólen.

As combinações de agentes de desidratação, tempo de exposição e forma de conservação são apresentadas na Tabela 1. Para cada tratamento foi coletado o dado da testemunha, que consistiu na identificação da viabilidade do pólen recém-colhido na inflorescência. O tratamento denominado hidratado consistiu na imersão de amostras de pólen em nitrogênio líquido sem a desidratação, logo, não foi exposto a nenhum agente e a nenhum tempo de desidratação.

De acordo com Buitink et al. (1998), a absorção de água em sementes e pólen é um dos principais fatores que afetam seu estado físico e estabilidade. Quando

isotérmicas de sorção de água de pólen e sementes são comparados com a sua longevidade em diferentes teores de água, torna-se evidente que, para ambos a umidade relativa ótima para armazenamento está situado em torno do ponto alto da isotérmica de absorção. Isotermas de sorção de água é a relação inversa entre temperatura e conteúdo de água quando a umidade relativa é mantida constante. O conteúdo de água em torno deste ponto tem sido muitas vezes encontrado e correspondem aos teores de água para a estabilidade ótima de alimentos com baixo teor de umidade. Além disso, essa quantidade de água tem sido proposta para a manutenção da integridade estrutural dos organismos tolerantes à dessecação. Assim, se a umidade relativa de armazenamento ideal é constante de acordo com a temperatura, logo, o conteúdo de água que dá longevidade máxima varia com a temperatura. Portanto, isotermas de sorção de água produzidas em diversas temperaturas são úteis para prever as condições de armazenamento ideais para tecidos biológicos.

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados para desidratação de grãos de pólen de *P. notatum* para conservação em geladeira, freezer e criotankue.

AD	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH	Hidrat
T/C	Crio/Freez./Gel.	Crio/Freez./Gel.	Crio/Freez./Ge	Crio/Freez./Gel.	Crio/Freez./Ge
30	X	X	X	X	*
60	X	X	X	X	*
120	X	X	X	X	*

AD= agente de desidratação, T= Tempo (min), C= condições de acondicionamento (criotankue, freezer e geladeira).

\* Não foi sujeito a agentes de desidratação, portanto independe do tempo

Os grãos de pólen foram armazenados em criotubos dentro do criotankue (Figura 9) por um período mínimo de 24 horas. Além do armazenamento em nitrogênio líquido, também foram utilizados freezer e geladeira para a conservação dos grãos de pólen. Nestes dois últimos ambientes, as amostras foram colocadas dentro de cápsulas de gelatinas e disposto em tubos eppendorf não vedados e armazenados por 10, 60, 120 e 180 dias.



**Figura 9.** Grãos de pólen armazenados em tanque com nitrogênio líquido.

### **4.3 Criopreservação**

Para análise dos grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido, foram feitas nove repetições de cada sal citado na tabela 1, três repetições do tratamento com grãos de pólen hidratados mais a testemunha, que consistiu na observação dos grãos de pólen recém colhidos. Os grãos de pólen foram descongelados, seguindo o descongelamento lento, técnica que consiste descongelar os pólenes em diferentes temperaturas, afim de não causar injúrias no grão de pólen, o mesmo foi descongelado por 30 minutos no freezer, 30 minutos na geladeira e 30 minutos no ambiente (temperatura de 25°C).

### **4.4 Avaliação da viabilidade de pólen após conservação pelo método de coloração**

A avaliação da viabilidade de pólen foi feita logo após coletados os grãos de pólen das anteras (testemunha) e após cada tratamento realizado com os sais saturados e sílica gel. Após as coletas das amostras, os grãos de pólen foram corados com solução de cloreto de tetrazólio (0,25%). Uma gota de solução de tetrazólio foi colocada na lâmina, posteriormente foi colocada a amostra de grãos de pólen. A lâmina foi colocada em uma caixa de gerbox com papel de filtro umedecido. Esta foi mantida em estufa a 27°C por duas horas. As estimativas de viabilidade de pólen (%) foram feitas pela contagem ao acaso, no microscópio ótico, do número de grãos de pólen corados em relação ao total.

As amostras foram avaliadas quanto à viabilidade do pólen em condições de freezer e geladeira com solução de tetrazólio (0,25%) após 10, 60, 120 e 180 dias

para cada tratamento, sempre em três repetições e em condições de nitrogênio líquido com solução de tetrazólio (0,25%) após 24h de armazenamento. De cada tubo foram feitas três lâminas, estas foram levadas ao microscópio para análise dos grãos de pólen viáveis e inviáveis. Os critérios para considerar os grãos de pólen como viáveis foram os grãos estarem bem desenvolvidos e inteiramente corados, sendo que os grãos mal desenvolvidos ou parcialmente coloridos, foram considerados como inviáveis. Foram contados 200 grãos em cada lâmina (repetição). As porcentagens de grãos de pólen corados foram calculadas para cada amostra de todos os indivíduos envolvidos.

#### **4.5 Viabilidade de pólen por germinação *in vivo* via fluorescência**

A outra técnica utilizada para a identificação da viabilidade de pólen foi por germinação *in vivo*. Inflorescências de *Paspalum notatum*, foram colocadas em uma câmara úmida dentro da casa de vegetação, na tarde antes do florescimento. Na manhã seguinte, devido à alta umidade relativa do ar, a deiscência das anteras foi atrasada por um período curto, o que proporcionou tempo suficiente para remover as anteras com uma pinça antes que elas se abrissem. Após a emasculação, a planta foi removida da câmara úmida para permitir a secagem dos estigmas. Periodicamente, os estigmas das espiguetas emasculadas foram examinados sob lupa para verificar a ocorrência de contaminação. As espiguetas com estigmas contaminados foram retiradas da inflorescência. Os floretes emasculados com estigmas limpos foram polinizados com o pólen armazenado em nitrogênio líquido. Após a polinização em um período de 2h, 5 a 10 espiguetas foram removidas das inflorescências. Em seguida as estruturas foram fixadas em solução de F.A.A. (1: formaldeído, 1: Ácido Acético glacial, 8: Álcool etílico 80%) por 30 minutos. As amostras foram armazenadas em álcool 70%.

Posteriormente, os pistilos foram dissecados e preparados para análise em microscopia de fluorescência. Os pistilos dissecados foram colocados em solução de NaOH 1N por 30 minutos e depois transferidos para solução azul de anilina 0,1% por 30 minutos. Foram examinados em microscópio de fluorescência equipado com filtro de luz T400lp. A porcentagem de grãos de pólen germinados foi determinada por uma contagem de amostras ao acaso, foram utilizadas três lâminas em cada tratamento (BURSON; YOUNG, 1983).

#### 4.6 Análise estatística

Foi realizada a Análise de Variância e o Teste de Médias Duncan dos dados de viabilidade de pólen por coloração e por germinação *in vivo* pelo uso do software SAS® (SAS Institute, Inc.). Foi verificada a normalidade dos resíduos pelos testes de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e Cramer-von Mises. Os dados de coloração foram transformados para  $x = \sqrt{x + 0,5}$ .

Gráficos e identificações de desvio padrão foram realizados no software Microsoft Office Excel.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises dos resultados mostraram que houve diferenças significativas na viabilidade dos grãos de pólen, em função dos diferentes tratamentos de desidratação dos grãos de pólen. Constatou-se que houve interação significativa entre os teores de água e os ambientes de armazenamento. (Tabelas 2 a 5).

### 5.1 Criopreservação

Na Tabela 2 é possível observar os resultados da porcentagem de grãos de pólen viáveis por coloração após 24 horas de armazenamento em nitrogênio líquido (NL). A testemunha (pólen recém-colhido – C1) e o tratamento de pólen hidratado e criopreservado (C2) também constam na Tabela 2. O coeficiente de variação da análise foi de 2,15%, isso demonstra que há uma boa confiabilidade nos resultados.

A viabilidade do grão de pólen recém-colhido (testemunha – C1) foi de 68,52%. Já o tratamento de pólen hidratado criopreservado demonstrou que a viabilidade das amostras após a retirada do criotânque foi muito baixa, observando que apenas 37,5% dos grãos de pólen permaneceram viáveis. A redução da viabilidade de pólen pode ser explicada pois quando o pólen é submetido a baixas temperaturas, a redução da umidade é necessária para evitar o rompimento dos tecidos provocado pelo congelamento intracelular da água contida no grão de pólen. Este resultado é corroborado por Barnabás e Rajki (1976), que enfatizam que os grãos de pólen para serem armazenados, necessitam de uma umidade adequada, pois se muito secos pode haver perda de viabilidade e se muito úmidos pode gerar formação intracelular de cristais de gelo quando o armazenamento é feito sob temperaturas abaixo do ponto de congelamento (0°C).

Os maiores valores de viabilidade (em negrito na Tabela 2) foram encontrados quando os grãos de pólen foram secos com uso de cloreto de lítio por 30 minutos, obtendo uma viabilidade de 70,06%. O mesmo ocorreu com o uso de sílica gel por 120 minutos, obtendo uma viabilidade de 66%. Ambos não diferiram da testemunha (68,52%).

Acredita-se que o uso dos agentes de desidratação LiCl e Sílica Gel por 30 e 120 minutos respectivamente resultou em porcentagens de grãos de pólen viáveis

similares a testemunha porque os sais utilizados apresentam umidade relativa de 12% e 10% respectivamente, de acordo com os trabalhos realizados por Winston e Bates (1960); Young (1967); Almeida et al. (2011). Estas soluções saturadas apresentam umidades relativas bem estabelecidas. Qualquer solução de sal a uma concentração definida e a uma temperatura constante estará em equilíbrio com uma pressão parcial de vapor de água fixa e, portanto, define uma umidade relativa fixa (YOUNG, 1967). O tempo de exposição dos grãos de pólen na solução saturada, determina o teor de umidade de equilíbrio. Assim, colocando o pólen tolerante a dessecação sobre uma solução saturada de sal com uma umidade relativa baixa durante aproximadamente 2 h é um método aceitável para a redução da umidade para fins de armazenamento. A extensão e a taxa de variação de umidade do pólen dependem do sal, o gradiente entre o teor de umidade do sal e do conteúdo de umidade do pólen e do tipo de pólen (CONNOR; TOWILL, 1993).

Já o cloreto de magnésio e o hidróxido de sódio não foram considerados os melhores agentes porque de acordo com os trabalhos citados acima, a umidade relativa desses sais é 32% e 7% respectivamente, mantendo os grãos de pólen em faixa muito abaixo ou muito acima da umidade ideal para a conservação em nitrogênio líquido. Esses resultados corroboram com trabalhos de Yates et al. (1991), que enfatiza que para obter sucesso na conservação a longo prazo de grão de pólen é necessário que o teor de água esteja entre 7% a 20% para o armazenamento em temperaturas que variam de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

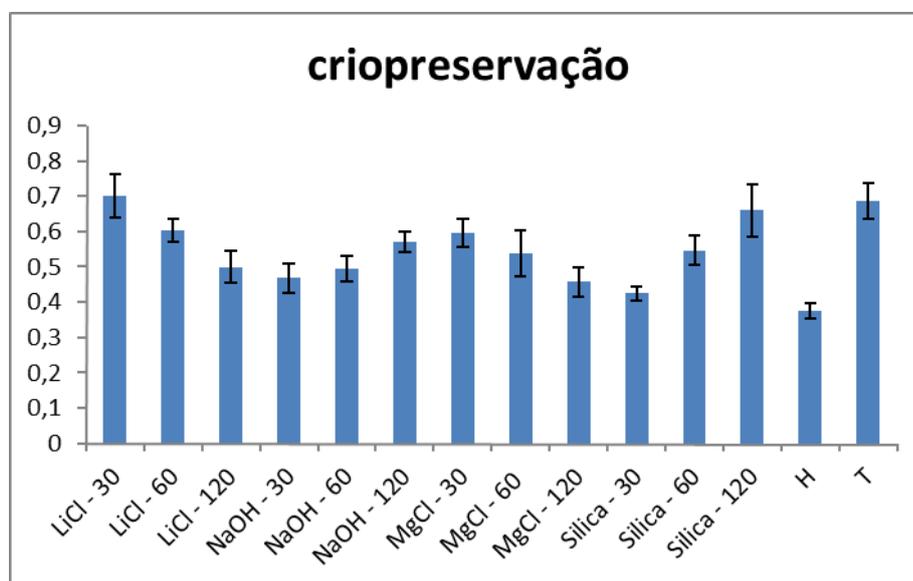
A escolha de qual dos dois tratamentos utilizar dependerá da disponibilidade dos agentes de desidratação e do tempo disponível para realizar o trabalho, além do custo da pesquisa, uma vez que a sílica gel tem menor custo que o cloreto de lítio.

**Tabela 2.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis por coloração de *Paspalum notatum* após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após 24 horas de armazenamento em nitrogênio líquido (NL). C1: pólen recém colhido sem desidratação e não submetido ao NL (testemunha); C2: pólen hidratado submetido ao NL.

Tempo/Trat	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH
30	<b>70,06 a</b>	42,44 f	59,56 b	46,83 e
60	60,17 b	54,67 c	53,83 cd	49,50 de
120	49,94 de	<b>66,00 a</b>	45,72 ef	57,06 bc
C1	<b>68,52 a</b>			
C2	37,50 g			

letras iguais significam que os resultados não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade. Em vermelho, os melhores tratamentos e a testemunha.

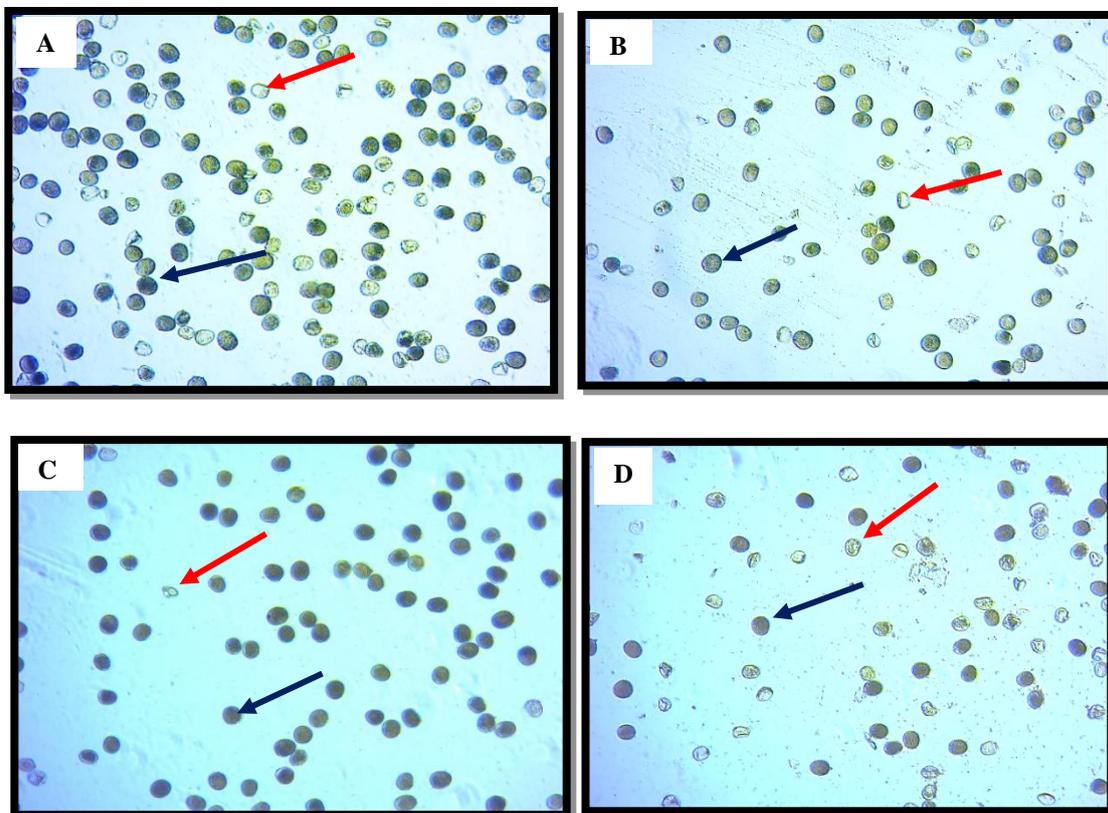
Novamente, na Figura 10 é possível observar as médias das porcentagens de grãos de pólen viáveis após os tratamentos de desidratação e criopreservação. Observa-se que os desvios padrão para grãos de pólen armazenados no nitrogênio líquido, foram pequenos, o que indica uma maior confiabilidade nos resultados.



**Figura 10.** Médias de grãos de pólen viável (%) de *Paspalum notatum* e respectivos desvios padrão após 13 tratamentos de desidratação seguidos de conservação em nitrogênio líquido por 24h. H = hidratado, T=testemunha

Na Figura 11 é possível observar as imagens dos tratamentos com melhores resultados (LiCl por 30 minutos e Sílica Gel por 120 minutos) e do tratamento

com a menor porcentagem de pólen viável (hidratado). Convém informar que as imagens retraram dados qualitativos, ou seja, não é possível comparar as imagens no que tange a quantidade de pólen de cada uma.



**Figura 11.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio após a criopreservação. A: tratamento com LiCl por 30 minutos; B: tratamento com Sílica por 120 minutos; C: Testemunha. D: Pólen sem desidratação no NL. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis.

## 5.2 Conservação de grãos de pólen em freezer

Para análise dos grãos de pólen armazenados em geladeira e freezer foram realizadas três repetições de cada agente de desidratação citado, mais a testemunha que consistiu na observação dos grãos de pólen recém colhidos. O coeficiente de variação das amostras em freezer foi de 1,74% mostrando baixa variação entre as repetições e indicando uma boa confiabilidade nos resultados.

Os tratamentos de desidratação e armazenamento no freezer também apresentaram distintos resultados quanto a viabilidade de pólen. Pode-se observar na Tabela 3 que, para os grãos de pólen armazenados em freezer, maiores valores de

viabilidade (em negrito) foram nos tratamentos com uso de cloreto de magnésio por 30 minutos e armazenado por 10 e 60 dias e 60 minutos por 60 dias (68,33, 71,33 e 66,67%), desidratados com sílica gel por 120 minutos e armazenados por 10 dias (70,17%), desidratados com cloreto de lítio por 30 minutos e armazenados por 10 e 60 dias (69,83 e 65,67%) e desidratados com hidróxido de sódio por 60 e 120 minutos e armazenados por 10 dias (65,00 e 69,33%). Todos estes tratamentos não diferiram da testemunha (68,52%). Comparando os dados obtidos em condições de freezer e de criotânque, observa-se que os resultados dos tratamentos sílica gel por 120 minutos e cloreto de lítio por 30 minutos foram iguais a testemunha nas duas condições.

Isso demonstra que o armazenamento de pólen desidratado com esses agentes pelo tempo descrito acima e armazenados, no freezer, pode ser uma opção para trabalhos de curto prazo (entre um e dois meses). Contudo, para períodos entre 60 e 180 dias, há a queda da viabilidade de pólen, apesar de serem observados ainda tratamentos com porcentagens de germinação de pólen acima de 50% (dados sublinhados da Tabela 3).

O menor valor encontrado foi no armazenamento dos grãos de pólen desidratados com sílica gel por 30 minutos e armazenados por 180 dias, em que apenas 30,67% dos grãos de pólen permaneceram viáveis.

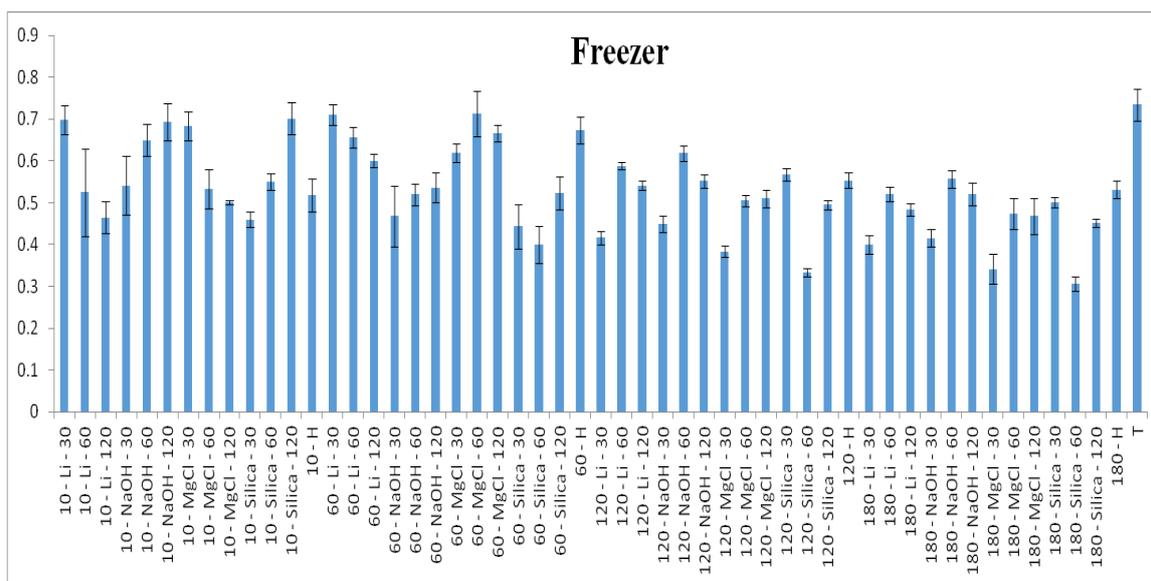
Observa-se que mesmo sem desidratação, a 10 dias de conservação em freezer, as amostras de grãos de pólen permaneceram acima de 50% (C2 10d = 51,83%).

**Tabela 3.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis de *Paspalum notatum* após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em freezer por 10, 60, 120 e 180 dias. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado.

Tempo - Período/Trat	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH
30 / 10d	<b>69,83 a</b>	46,00 o-t	<b>68,33 ab</b>	54,17 g-l
60 / 10d	52,50 h-o	55,00 f-k	53,33 g-n	<b>65,00 a-d</b>
120 / 10d	46,50 n-s	<b>70,17 a</b>	50,00 i-r	<b>69,33 a</b>
30 / 60d	<b>65,67 a-d</b>	40,00 ut	<b>71,33 a</b>	52,00 h-p
60 / 60d	60,00 c-g	52,33 h-o	<b>66,67 abc</b>	53,67 g-m
120 / 60d	46,83 m-s	<b>67,33 ab</b>	44,33 r-u	62,00 b-e
30 / 120d	<u>58,83 d-h</u>	33,33 vw	<u>50,50 i-r</u>	<u>61,83 b-f</u>
60 / 120d	<u>54,17 g-l</u>	49,50 j-r	<u>51,00 i-r</u>	<u>55,17 e-k</u>
120 / 120d	45,00 q-t	<u>55,33 e-k</u>	<u>56,83 e-i</u>	38,33 uv
30 / 180d	<u>52,00 h-p</u>	30,67 w	47,50 l-s	<u>55,67 e-j</u>
60 / 180d	48,33 k-r	45,17 p-t	46,83 n-s	<u>52,00 h-p</u>
120 / 180d	41,50 u-t	<u>53,17 g-n</u>	<u>50,17 i-r</u>	34,17 vw
C1	<b>68,52 ab</b>			
C2 10d	<u>51,83 h-p</u>			
C2 60d	41,67 u-t			
C2 120 d	40,00 ut			
C2 180 d	33,83 vw			

letras iguais significam que os resultados não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade

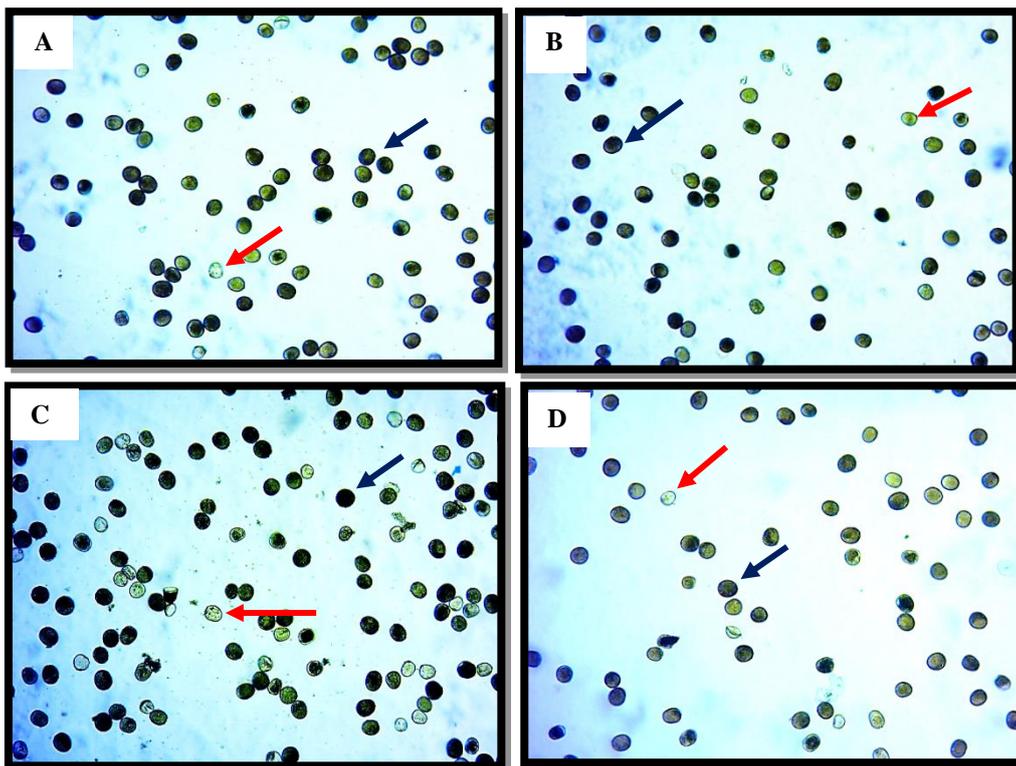
Na Figura 12 é possível observar novamente as médias de grãos de pólen viáveis (%) e que houve diferença entre os tratamentos. Observa-se também que os desvios padrão para grãos de pólen armazenados em freezer foi pequeno, a exceção do tratamento LiCl desidratado por 60 minutos, armazenado por 10 dias cujo o desvio foi um pouco maior.



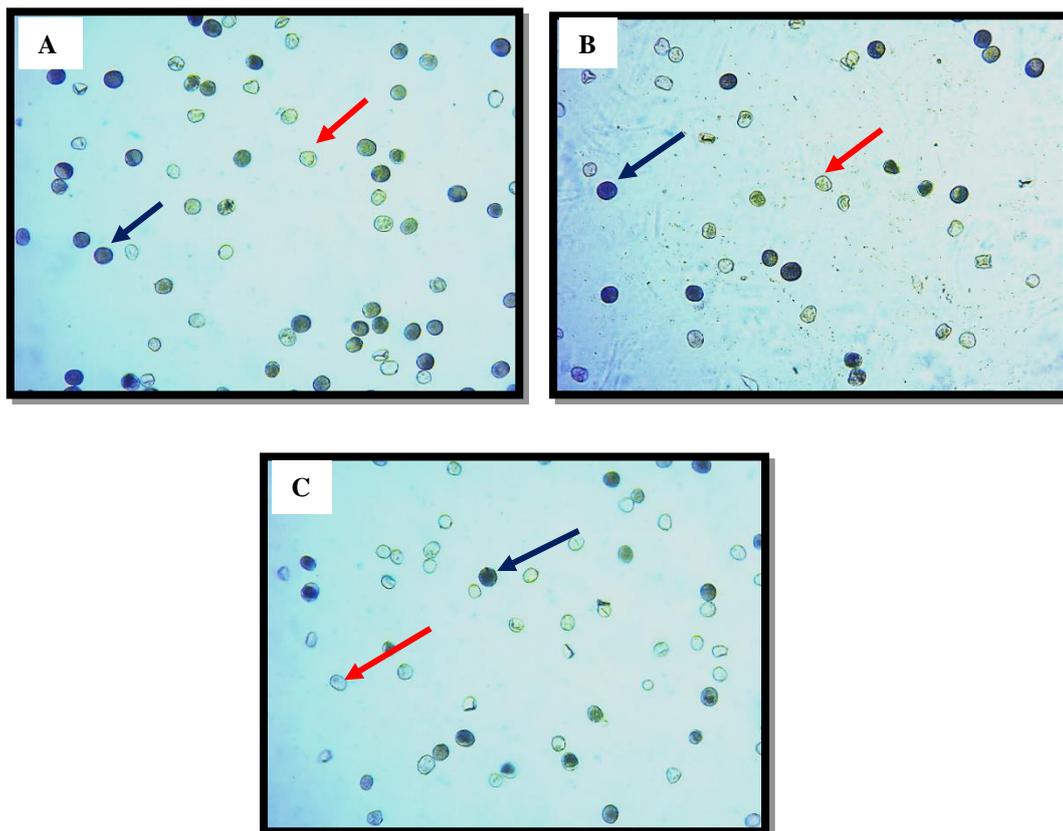
**Figura 12.** Médias de grãos de pólen viável (%) de *Paspalum notatum* e respectivos desvios padrão após 13 tratamentos de desidratação seguidos de conservação em freezer por quatro períodos distintos (10, 60, 120, 180 dias). H = hidratado, T=testemunha

Na Figura 13 é possível observar as imagens de alguns dos tratamentos com melhores resultados e na Figura 14 dos tratamentos com as menores porcentagens de pólen viável.

Tanto em freezer, quanto em nitrogênio líquido, entre os melhores resultados de viabilidade apresentados estão os tratamentos de desidratação com Cloreto de Lítio e Silica Gel. Buitink et al (1998), afirmam que para todas as temperaturas de armazenamento estudadas por eles, a deterioração foi mais lenta em amostras de pólen armazenados sobre soluções saturadas de LiCl, uma vez que esta solução dá uma umidade relativa em torno de 11 a 15%, dependendo da temperatura utilizada no momento da desidratação.



**Figura 13.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em freezer – melhores tratamentos. A: tratamento com NaOH por 120 minutos armazenado por 10 dias; B: tratamento com Sílica por 120 minutos armazenado por 10 dias; C: tratamento com LiCl por 30 minutos armazenado por 10 dias; D: tratamento com  $MgCl_2$  por 30 minutos armazenado por 60 dias. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis.



**Figura 14.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em freezer – piores tratamentos. A: Pólen tratado com NaOH por 120 minutos armazenado por 180 dias; B: pólen sem desidratação armazenado por 180 dias; C: pólen tratado com sílica por 30 minutos armazenado por 180 dias. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis.

### 5.3 Conservação de grãos de pólen em geladeira

Na Tabela 4 pode-se observar que para os grãos de pólen armazenados em geladeira e tratados com os distintos agentes de desidratação, a maior viabilidade foi encontrada (em negrito) quando estes foram tratados com cloreto de lítio por 30 minutos, armazenados por 10 dias (68% de viabilidade) e cloreto de magnésio por 60 minutos e armazenados por 10 dias (62,67%). Ambos tiveram resultados similares à testemunha (68,52%). Já a viabilidade dos grãos de pólen hidratados (sem tratamento com agentes de desidratação) e armazenados por 10 e 60 dias, foram de 63,33% e 64,33% respectivamente, não diferiram da testemunha. Isto mostra que, para o período de até 60 dias de armazenamento, em *Paspalum notatum*, a conservação de pólen hidratado pode ser uma alternativa. Como já era previsto, para períodos curtos de tempo, como até 60 dias, não há a necessidade real de desidratação de grãos de pólen em condições de geladeira, pois as células não serão congeladas. Observa-se também que após 60 dias, a conservação de grãos de pólen de *P. notatum* não é eficiente pois há

a queda significativa da viabilidade dos mesmos, apresentando uma viabilidade um pouco acima de 50% (dados sublinhados). O coeficiente de variação das amostras em geladeira foi de 1,81%, isso demonstra que há uma boa confiabilidade nos resultados.

Já no armazenamento dos grãos de pólen desidratados com cloreto de magnésio por 120 minutos e armazenados por 180 dias, constatou-se que apenas 25,33% dos grãos de pólen permaneceram viáveis, demonstrando assim uma redução significativa da viabilidade das amostras após a retirada, quando comparada a testemunha (68,52% de viabilidade).

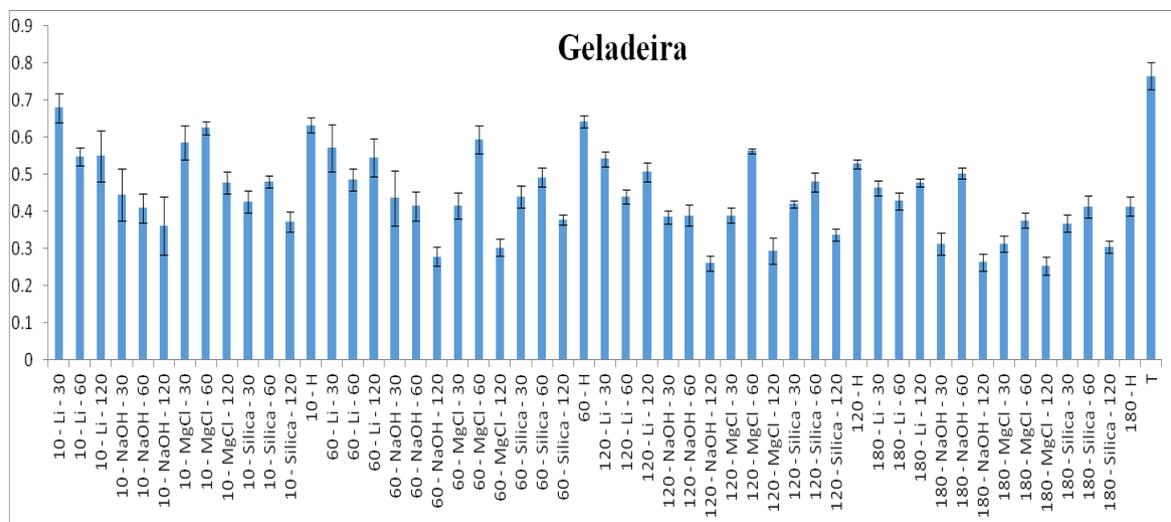
**Tabela 4.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis de *Paspalum notatum* após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em geladeira por 10, 60, 120 e 180 dias. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado.

Tempo - Período/Trat	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH
30 / 10d	<b>68,00 a</b>	42,67 k-r	<u>58,67 b-e</u>	44,67 j-p
60 / 10d	<u>54,83 e-g</u>	48,17 g-m	<b>62,67 a-d</b>	41,00 o-s
120 / 10d	<u>55,00 e-g</u>	37,33 q-t	47,83 h-n	36,17 s-v
30 / 60d	<u>57,17 c-f</u>	44,00 j-p	41,67 m-s	43,67 k-g
60 / 60d	48,67 g-l	49,17 g-k	<u>59,33 b-e</u>	41,50 m-s
120 / 60d	<u>54,67 e-h</u>	37,83 q-t	30,33 v-y	27,83 xy
30 / 120d	<u>54,17 e-h</u>	42,00 l-s	39,00 p-t	38,50 p-t
60 / 120d	44,00 j-p	48,00 h-n	<u>56,33 d-f</u>	39,00 p-t
120 / 120d	<u>50,67 f-j</u>	33,83 t-w	29,33 w-y	26,17 xy
30 / 180d	46,33 i-o	36,83 r-u	31,33 u-x	31,33 u-x
60 / 180d	42,83 k-r	41,33 n-s	37,67 q-t	<u>50,33 f-j</u>
120 / 180d	47,83 h-n	30,50 v-y	25,33 y	26,33 xy
C1	<b>68,52 a</b>			
C2 10d	<b>63,33 abc</b>			
C2 60d	<b>64,33 ab</b>			
C2 120 d	<u>52,83 e-i</u>			
C2 180 d	41,33 n-s			

letras iguais significam que os resultados não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade.

Na Figura 15 é possível observar as médias de grãos de pólen viáveis (%) após os distintos tratamentos de desidratação e a conservação das amostras em geladeira. Os desvios padrão também são apresentados e foram considerados e pequena amplitude indicando uma boa confiabilidade nos resultados. Os maiores valores de

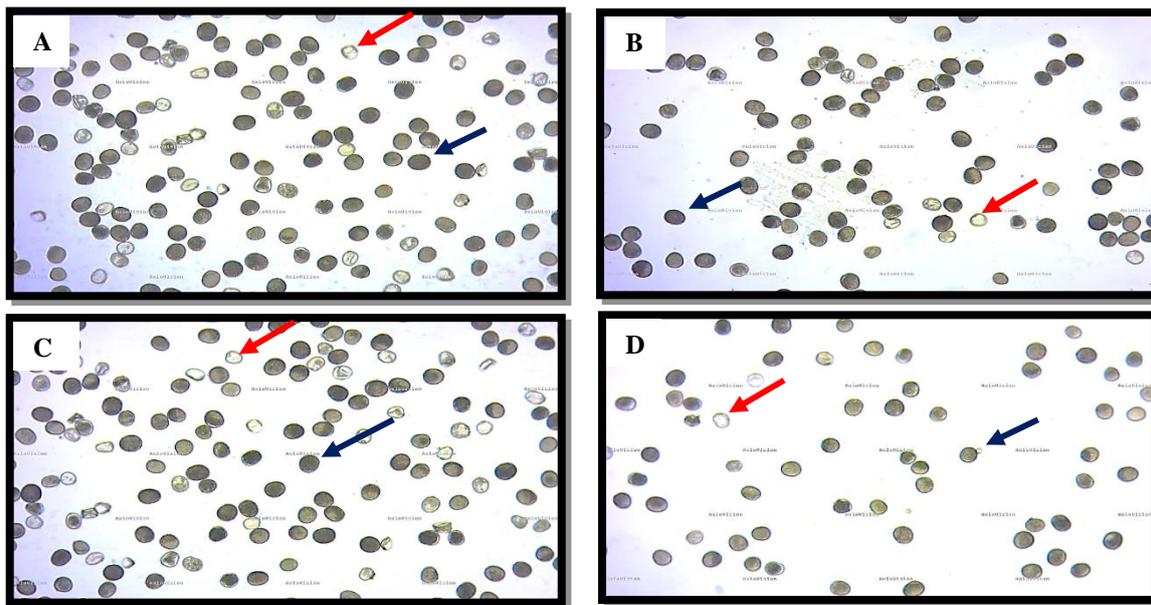
desvios padrão foram observados nos tratamentos LiCl por 120 minutos e armazenado por 10 dias e NaOH por 30 minutos e armazenado por 10 dias.



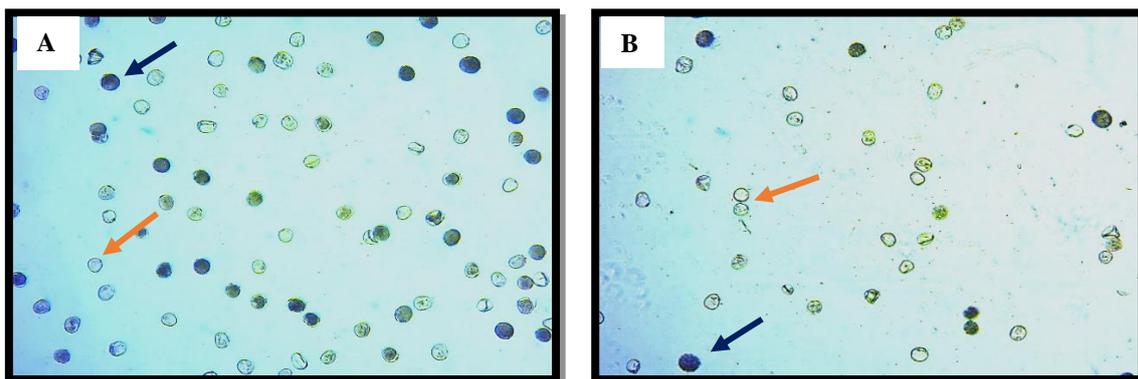
**Figura 15.** Médias de grãos de pólen viável (%) de *Paspalum notatum* e respectivos desvios padrão após 13 tratamentos de desidratação seguidos de conservação em geladeira por quatro períodos distintos (10, 60, 120, 180 dias). H = hidratado, T=testemunha

Na Figura 16 é possível observar as imagens de tratamentos com melhores resultados com o uso de solução de tetrazólio e em condições de geladeira. Na Figura 17 dos tratamentos com as menores porcentagens de pólen viável.

Apesar de observada ausência de necessidade de desidratação de pólen na conservação em geladeira, ao se comparar os agentes de desidratação observou-se que, tanto em geladeira quanto em nitrogênio líquido e freezer, um dos melhores resultados de viabilidade obtidos foram quando o grão de pólen foi desidratado com Cloreto de Lítio. Buitink et al. (1998) afirmam que para todas as temperaturas de armazenamento estudadas por eles, a deterioração foi mais lenta em amostras de pólen armazenados sobre soluções saturadas de LiCl, uma vez que esta solução dá uma umidade relativa em torno de 11 a 15%, dependendo da temperatura utilizada no momento da desidratação.



**Figura 16.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em geladeira – melhores tratamentos. A: pólen sem desidratação, armazenado por 10 dias; B: pólen tratado com LiCl por 30 minutos armazenado por 10 dias; C: pólen sem tratamento de desidratação, armazenado por 60 dias D: testemunha. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis.



**Figura 17.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e conservados em geladeira – piores tratamentos. A: Pólen tratado com NaOH por 120 minutos armazenados por 120 dias; B: Pólen tratado com MgCl<sub>2</sub> por 120 minutos armazenado por 180 dias. Seta azul: viáveis. Seta vermelha: inviáveis.

#### 5.4 Análise conjunta de todos os tratamentos em todos os ambientes

A análise conjunta diferiu pouco das análises realizadas separadamente para cada ambiente de armazenamento (Tabela 5). Treze tratamentos (em negrito) foram considerados iguais a testemunha (68,52% de viabilidade): cloreto de lítio desidratado por 30 minutos, armazenado em nitrogênio líquido (70,06%), sílica gel desidratado por 120 minutos, armazenado em nitrogênio líquido (66%), cloreto de lítio desidratado por 30 minutos e armazenado no freezer por 10 e 60 dias (69,83% e 65,67%), sílica gel desidratado por 120 minutos e armazenado no freezer por 10 e 60 dias (70,17% e 67,33%), cloreto de magnésio

desidratados por 30 minutos e armazenado no freezer por 10 e 60 dias (68,33% e 71,33%), cloreto de magnésio desidratado por 60 minutos e armazenado no freezer por 60 dias (66,67%), hidróxido de sódio desidratado por 60 e 120 minutos e armazenado no freezer por 10 dias (65% e 69,33%), cloreto de lítio desidratado por 30 minutos e armazenado na geladeira por 10 dias (68%). Pólen sem desidratação, armazenado em geladeira por 60 dias (64,33%). O coeficiente de variação das amostras foi de 1,90%, isso demonstra que há uma boa confiabilidade nos resultados. Estes resultados são corroborados por vários autores (GOMEZ et al., 2000; SIREGAR & SWEET, 2000) que mantiveram o pólen armazenado em refrigerador por vários meses, embora com um decréscimo de viabilidade em função do tempo de armazenamento. O emprego de baixas temperaturas normalmente está ligado à redução do metabolismo do grão de pólen, o que propicia maior longevidade.

Apesar das amostras terem exibido taxas de viabilidade variáveis nos períodos e ambientes de armazenagem, pode considerar que os resultados obtidos para conservação a curto, médio e longo prazo dos grãos de pólen possa subsidiar programas de melhoramento em *Paspalum*, viabilizando cruzamentos entre indivíduos com potencial econômico e que apresentem assincronia de floração.

**Tabela 5.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis de *Paspalum notatum* após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em geladeira e freezer por um período de 10, 60, 120 e 180 dias, e em nitrogênio líquido por um período de 1d (24h). C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado nos três locais citados.

Armazenamento	Criopreservação				Freezer				Geladeira			
	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH
Tempo	-											
Período/Trat												
30 / 1d	<b>70,06 ab</b>	42,44 C-N	59,56 e-l	46,83 s-H								
60 / 1d	60,17 d-k	54,67 j-r	53,83 k-t	49,50 n-C								
120 / 1d	49,94 n-B	<b>66,00 a-f</b>	45,72 v-I	57,06 g-n								
30 / 10d					<b>69,83 ab</b>	46,00 u-I	<b>68,33 abc</b>	54,17 k-s	<b>68,00 abc</b>	42,67 B-N	58,67 f-m	44,67 x-K
60 / 10d					52,50 l-w	55,00 j-r	53,33 k-u	<b>65,00 a-f</b>	54,83 j-r	48,17 P-G	62,67 b-i	41,00 G-N
120 / 10d					46,50 t-H	<b>70,17 ab</b>	50,00 n-A	<b>69,33 abc</b>	55,00 j-r	37,33 L-P	47,83 q-G	36,17 N-R
30 / 60d					<b>65,67 a-f</b>	40,00 H-O	<b>71,33 a</b>	52,00 l-x	57,17 g-n	44,00 y-L	59,33 e-m	43,67 z-M
60 / 60d					60,00 d-k	52,33 l-w	<b>66,67 a-e</b>	53,67 k-t	48,67 p-E	49,17 O-D	41,67 E-N	41,50 E-N
120 / 60d					46,83 s-H	<b>67,33 a-d</b>	44,33 y-L	62,00 c-j	54,67 j-r	37,83 K-O	30,33 R-U	27,83 TU
30 / 120d					58,83 f-m	33,33 O-T	50,50 n-z	61,83 c-j	54,17 k-s	42,00 D-N	39,00 I-O	38,50 J-O
60 / 120d					54,17 k-s	49,50 n-C	51,00 n-y	55,17 i-q	44,00 y-L	48,00 q-G	56,33 h-o	39,00 I-O
120 / 120d					45,00 x-J	55,33 i-q	56,83 g-n	38,33 J-O	50,67 n-Z	33,83 O-T	29,33 S-U	26,17 U
30 / 180d					52,00 l-x	30,67 Q-U	47,50 r-G	55,67 i-P	46,33 t-H	36,83 M-P	31,33 P-U	31,33 P-U
60 / 180d					48,33 p-F	45,17 x-J	46,83 s-H	52,00 l-x	42,83 A-N	41,33 F-N	37,67 K-P	50,33 n-z
120 / 180d					41,50 E-N	53,17 k-u	50,17 n-A	34,17 O-S	47,83 q-G	30,50 Q-U	25,33 U	26,33 U
C1	<b>68,52 abc</b>											
C2 1d	37,50 L-P											
C2 10d					51,83 m-x				63,33 b-h			
C2 60 d					41,67 E-N				<b>64,33 a-g</b>			
C2 120 d					40,00 H-O				52,83 k-v			
C2 180 d					33,83 O-T				41,33 F-N			

letras iguais significam que os resultados não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade.

### 5.5 Germinação *in vivo* via fluorescência

Na Tabela 6 foi possível observar que quando os grãos de pólen foram desidratados com sílica gel por 120 minutos, obtiveram-se maiores médias de germinação (em negrito) (82%), não diferindo da testemunha (83,30%). Essa porcentagem de germinação é corroborada por Scorza e Sherman (1995) que afirmam que uma boa porcentagem de germinação se encontra entre 50% e 80%.

No caso do uso da germinação *in vivo*, observou-se que a desidratação dos grãos de pólen deve ser realizada com sílica gel, uma vez que as médias de germinação foram maiores e sem grandes variações, o que não ocorreu com os grãos de pólen desidratados por 120 minutos com cloreto de magnésio e cloreto de lítio que apresentaram viabilidade de 45,80% e de 42,80%, respectivamente.

Os grãos de pólen hidratados, também apresentaram baixa viabilidade, apenas 45,70%. O coeficiente de variação das amostras foi de 2,24%, isso demonstra que há uma confiabilidade nos resultados.

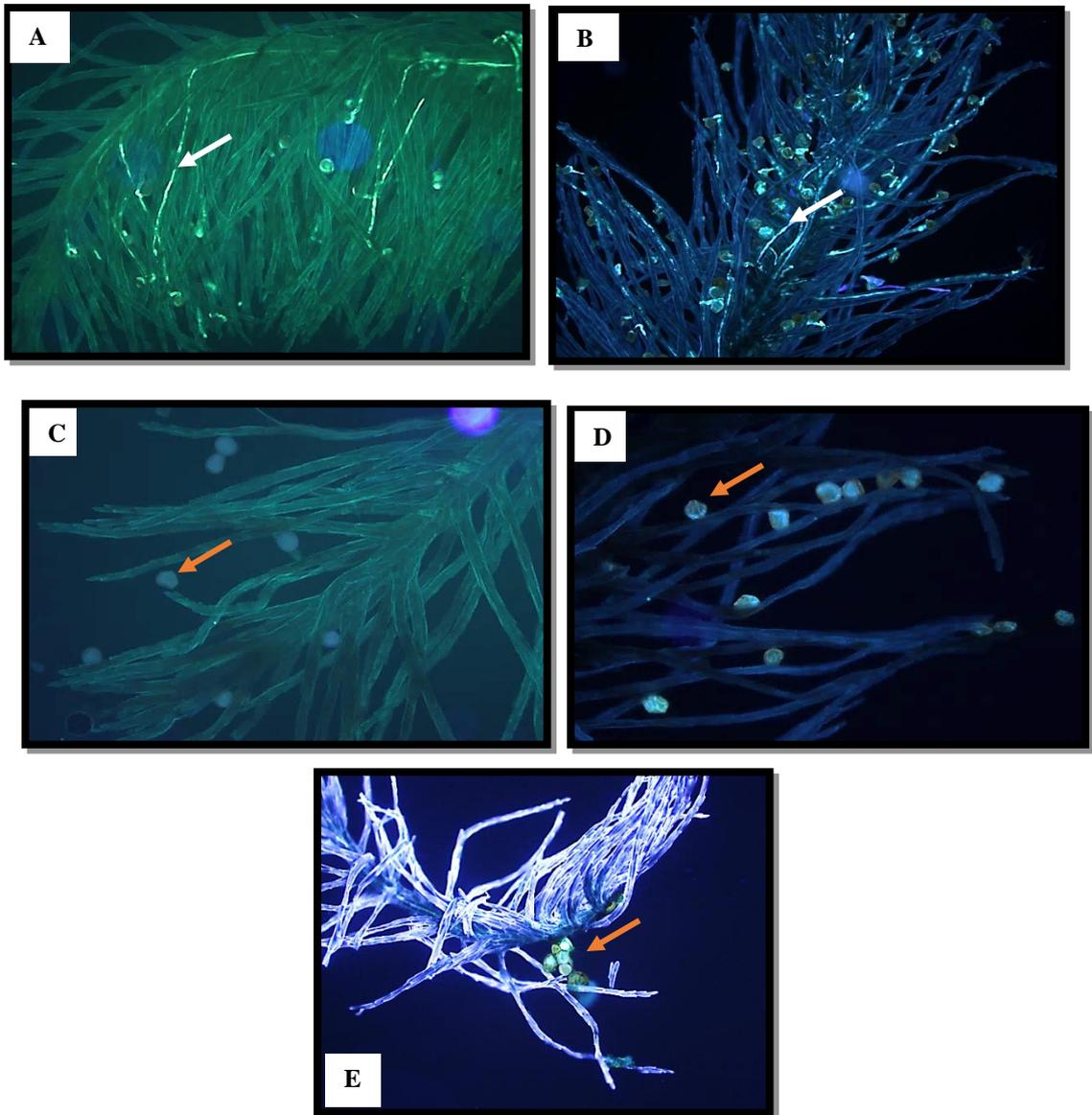
**Tabela 6.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis via técnica de germinação *in vivo* de *Paspalum notatum* após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em nitrogênio líquido por um período de 24h. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado e armazenado.

Tempo/Trat	LiCl	Sílica gel	MgCl <sub>2</sub>	NaOH
30	77,80 b	66,20 f	70,60 de	53,60 g
60	68,70 e	75,00 c	64,40 f	64,00 f
120	42,80 h	<b>82,00 a</b>	45,80 h	75,10 cd
C1	<b>83,30 a</b>			
C2	45,70 h			

letras iguais significam que os resultados não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade .

Na Figura 18 é possível observar as fotografias de estigmas com grãos de pólen germinando, com os tubos polínicos fluorescendo, após distintos tratamentos de desidratação: A: pólen tratado com Sílica por 120 minutos armazenando em nitrogênio líquido, por 24h,

objetiva de 20x) e B: testemunha (objetiva de 10x) e C, D e E: aqueles que possuíram baixa germinação após serem conservados em nitrogênio líquido.



**Figura 18.** Imagens dos grãos de pólen submetidos a germinação *in vivo* após conservação em nitrogênio líquido. Pólen com tubo polínico são viáveis e sem tubo polínico são inviáveis. A: pólen tratado com Sílica por 120 minutos armazenado em nitrogênio líquido, por 1 dia, objetiva de 20x; B: testemunha objetiva de 10x; C: Pólen sem desidratação armazenado NL; D: Pólen tratado com LiCl por 120 minutos armazenado no NL; E: Pólen tratado com  $MgCl_2$  por 120 minutos, armazenado no NL. Seta branca: pólen com tubos polínicos e viáveis. Seta vermelha: grãos de pólen sem tubo polínico e inviáveis.

## 5.6 Comparação da técnica de coloração com tetrazólio e germinação *in vivo*

Ambas as técnicas foram úteis para a avaliação da viabilidade de grãos de pólen de *P. notatum* em criopreservação.

Foi observado que comparando a porcentagem de viabilidade de pólen via uso do corante tetrazólio e pela germinação *in vivo*, os melhores resultados para ambos testes, demonstraram que grãos de pólen desidratados com cloreto de Lítio por 30 minutos e sílica gel por 120 minutos, apresentam boa viabilidade após serem armazenados em nitrogênio líquido (Tabela 7). Isso sugere que estes dois agentes de desidratação podem ser utilizados para que obtenha êxito no armazenamento de grãos de pólen de *Paspalum notatum* em nitrogênio líquido. De acordo com Santos (2000), a capacidade de sobrevivência dos tecidos vegetais à criopreservação depende de sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido -196 °C e o sucesso da criopreservação independe do tempo de armazenamento, depende da umidade e da temperatura (LINSKENS, 1964; DEAN, 1965; GANESHAN, 1986).

**Tabela 7.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis de *Paspalum notatum* via técnica de germinação *in vivo* (g) e coloração com tetrazólio (c) após quatro tratamentos de desidratação e em três tempos distintos (minutos), após armazenamento em em nitrogênio líquido por um período de 24h. C1: pólen recém colhido (testemunha); C2: pólen hidratado.

Tempo/ Trat	LiCl		Sílica gel		MgCl <sub>2</sub>		NaOH	
	c	g	c	g	c	g	c	g
30	<b>70,00 a</b>	78,00 b *	42,00 f	66,00 f **	60,00 b	71,00 de **	47,00 e	54,00 g **
60	60,00 b	69,00 e **	55,00 c	75,00 cd **	54,00 cd	64,00 f **	50,00 de	64,00 f **
120	50,00 de	43,00 h **	<b>66,00 a</b>	<b>82,00 a</b> **	46,00 ef	46,00 h ns	57,00 bc	75,00 cd **
C1	<b>68,00 a</b>	<b>83,00 a</b> **						
C2	38,00 g	46,00 h *						

letras iguais significam que os resultados não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade

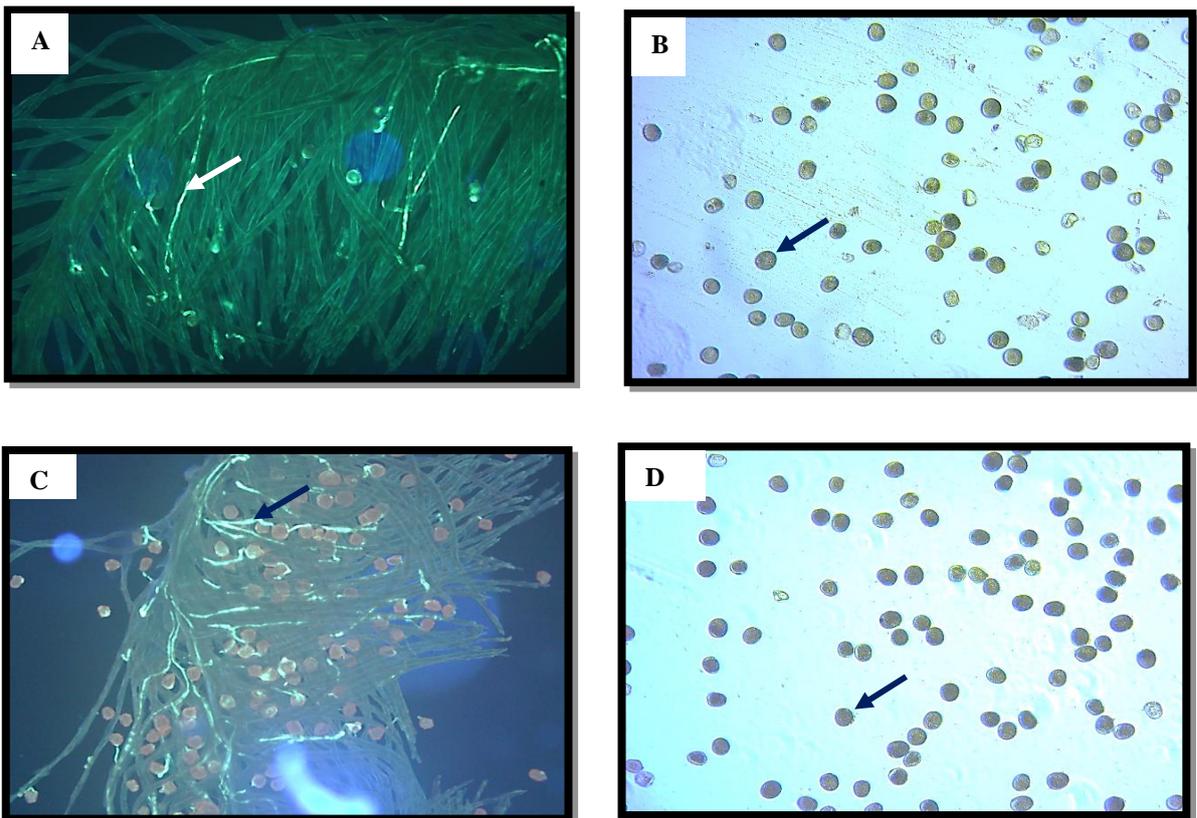
\* = 5% \*\* = 1%

Segundo a Tabela 7, todos os dados de viabilidade de pólen obtidos por coloração e por germinação foram distintos dentro de cada tratamento, a exceção de cloreto de magnésio a 120 minutos. Dados de germinação tiveram médias maiores que dados de

coloração a exceção do tratamento com cloreto de lítio a 120 minutos. Pode-se inferir que ambos os testes foram válidos para avaliação da viabilidade de pólen.

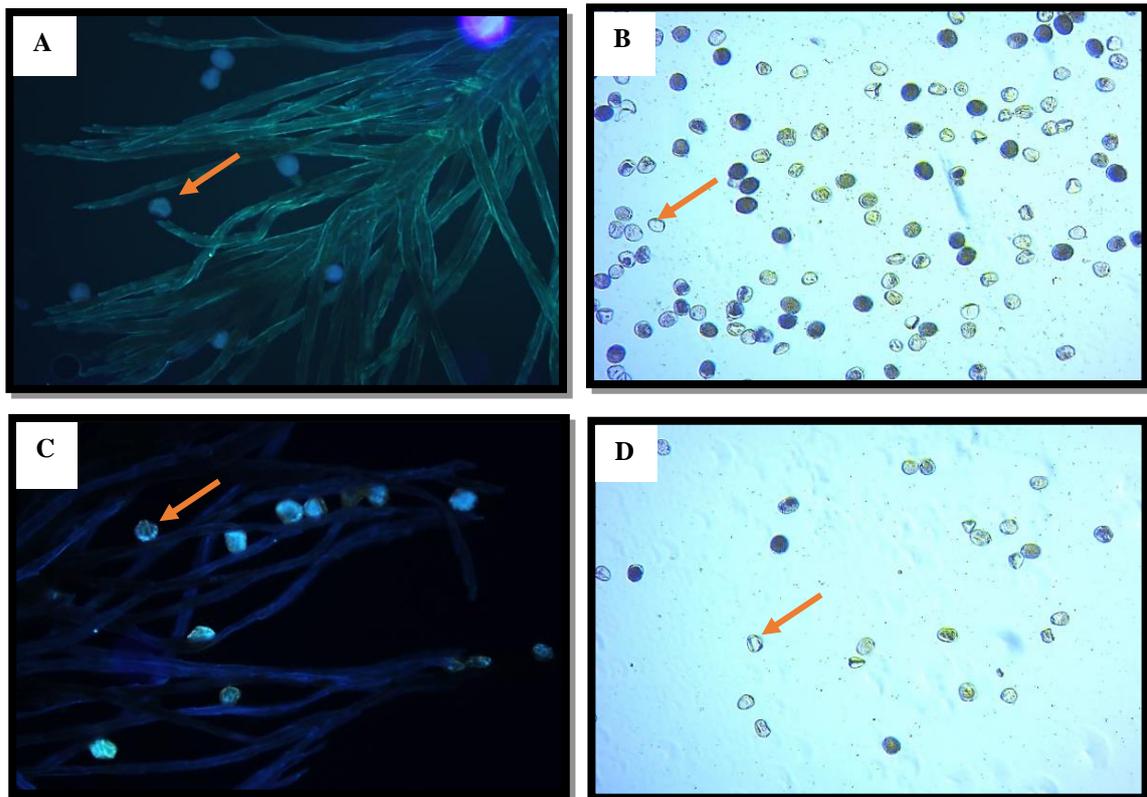
Segundo Connor & Towill (1993), embora indiquem um teor de água dos grãos de pólen abaixo dos 20 % para que sejam criopreservados com êxito, não há, ainda, estudos definindo qual a umidade mínima, para que o pólen ainda mantenha sua viabilidade. Para as cultivares testadas neste trabalho, o pólen permaneceu viável, mesmo em teores baixos de água, o que indica que o pólen é tolerante à desidratação.

Na Figura 19 estão representados os melhores tratamentos de grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e germinação *in vivo* via fluorescência, na figura A observa-se a germinação de grão de pólen tratado com Sílica gel por 120 minutos armazenado no NL, na B, verifica-se a viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio tratado com Sílica por 120 minutos armazenado em NL, na figura C, observa-se a testemunha na avaliação da germinação *in vivo* e na D, a testemunha na avaliação por coloração com tetrazólio.



**Figura 19.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e com germinação *in vivo* – melhores tratamentos. A: germinação de grão de pólen tratado com Sílica gel por 120 minutos armazenado no NL; B: viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio tratado com Sílica por 120 minutos armazenado em NL; C: testemunha na avaliação da germinação *in vivo*; D: testemunha na avaliação por coloração com tetrazólio. Seta branca e azul: viáveis.

Na Figura 20 estão representados os piores tratamentos de grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e germinação *in vivo* via fluorescência, na figura A observa-se a germinação de grão de pólen sem tratamento de desidratação armazenado no NL, na B, verifica-se a viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio sem tratamento de desidratação armazenado em NL, na figura C, observa-se a germinação de grão de pólen tratado com LiCl por 120 minutos, armazenados no NL, e na D, a viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio tratado com LiCl por 120 minutos, armazenado em NL.



**Figura 20.** Imagens dos grãos de pólen corados com solução de tetrazólio e com germinação *in vivo* – piores tratamentos. A: germinação de grão de pólen sem tratamento de desidratação armazenado no NL; B: viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio sem tratamento de desidratação armazenado em NL; C: germinação de grão de pólen tratado com LiCl por 120 minutos, armazenados no NL; D: viabilidade de pólen por coloração de tetrazólio tratado com LiCl por 120 minutos, armazenado em NL. Seta vermelha: inviáveis.

## 6. CONCLUSÕES

A desidratação dos grãos de pólen de *Paspalum notatum* com cloreto de lítio por 30 minutos e sílica gel por 120 minutos resultaram em um armazenamento a longo prazo adequado, pois a viabilidade permaneceu similar aos grãos de pólen recém-colhidos (testemunha).

O melhor tratamento para germinação *in vivo* foi com uso de sílica gel a 120 minutos para desidratação.

A conservação de pólen em freezer por até 60 dias pode ser uma alternativa, já que em alguns tratamentos os resultados foram estatisticamente iguais a testemunha.

A conservação de pólen em geladeira sem desidratação por até 60 dias pode ser uma alternativa, quando o genitor feminino está apto e o masculino não apresenta pólen.

O uso do corante cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio e da técnica de germinação *in vivo* foram eficientes para a avaliação da viabilidade de grãos de pólen após o armazenamento de nitrogênio líquido.

O uso do corante de tetrazólio também foi eficiente para a avaliação dos grãos de pólen após o armazenamento em freezer e em geladeira.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, C. A.; BLOUNT, A. R.; QUESENBERRY, K. H.; KENWORTHY, K. E.; HANNA, W. W. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 179, n. 2, p. 227-235, 2011.

AGUILERA, P. M.; SARTOR, M. E.; GALDEANO, F.; ESPINOZA, F.; QUARÍN, C. L. Interspecific Tetraploid Hybrids between Two Forage Grass Species: Sexual *Paspalum plicatulum* and apomitic *P. guenoarum*. **Crop Science**, Madison, v. 51, n. 4, p. 1544-1550, 2011.

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.

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

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 polén de milho**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ANDRADA, M. P.; HILL, G. D. Storage and longevity of *Lupinus luteus* L. pollen. **Towards the 21st century**, Oeiras, v. 11, n. 16, p. 321-326, 1999.

ARGERICH, C. A.; GAVIOLA, J. C. **Production de semilla de tomate**. 1ed., Argentina: INTA-EEA la Consulta, 1995. Fascículo 6. 81p.

ASKER, S. E. Progress in apomixis research. **Hereditas**, Lund, v. 91, p. 231-240. 1979.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 1992. 298p.

ASLANTAS, R.; PIRLAK, L.; HIETARANTA, T.; LINNA, M. M.; PALONEN, P.; PARIKKA, P. Storage of strawberry pollen, **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 567, n. 46, p. 227-230, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/download/Relatorio%20exportacao%202013\\_jan\\_dez.pdf](http://www.abiec.com.br/download/Relatorio%20exportacao%202013_jan_dez.pdf). Acesso em 10 de abril 2014.

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**. Berlim: 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.

BARNABÁS, B.; RAJKI, E. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at – 196°C in liquid nitrogen. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 747-752, 1976.

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.

BARROW, J. R. Comparisons among pollen viability measurement methods in cotton. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 4, p. 734-736, 1983.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Avaliação de germoplasma de forrageiras do gênero *Paspalum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29, 1992. Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ, 1992a. p. 79.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Capacidade de produção de sementes em acessos do gênero *Paspalum*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.5, p.841-847, 1998.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização de germoplasma do gênero *Paspalum* na região central do Estado de São Paulo, Brasil. Características vegetativas. In: REUNIÃO SABANAS, 1, 1992, Brasília. **Anais...** Brasília: Red Internacional de Evaluacion de Pastos Tropicales – RIEPT, 1992b. p. 97-106.

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. Introdução e avaliação do potencial forrageiro em germoplasma do gênero *Paspalum* na região de São Carlos, São Paulo, Brasil. In: REUNIÓN

SABANAS, I., 1992, Brasília. **Anais...** Brasília: Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales – RIEPT, 1992c. p. 239-245.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R.; PEREIRA, J. M. C. Potencial forrageiro de acessos do gênero *Paspalum* no ensaio de 1993/94. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32, 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995. p. 66-64.

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.

BATISTA, L. A. R.; REGITANO NETO, A. **Espécies do gênero *Paspalum* com potencial forrageiro.** São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. 19p. (Documentos, 29).

BENDIX, J.; HOMEIER, J.; ORTIZ, E. C.; EMCK, P.; BRECKLE, S. W.; RICHTER, M.; BECK, E. Seasonality of weather and tree phenology in a tropical evergreen mountain rain Forest. **International Journal of Biometeorology**, v.50, p.370–384, 2006.

BISSIRI, M. K; NIKNEJAD, M. Effects temperature and humidity on pollen viability of six rose species. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 56, n. 3, p. 517-523. 1976.

BOGDAN, A. V. Grass pollination by bees in Kenya. **Proceedings Linnean Society**, v. 173, n. 10, p. 57-173. 1962.

BOLAT, Y.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, Ankara, v.23, p.383-388, 1999.

BOLDRINI, I. I. **Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos.** Depressão Central, RS. 1993. 262 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

BOLDRINI, I. I.; LONGHIN-WAGNER, H. M.; BOECHAT, S. de C. **Morfologia e taxonomia de gramíneas sul-rio-grandenses.** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 96 p.

BOMBEN, C.; MALOSSINI, C.; CIPRIANI, G.; TESTOLIN, R.; RETAMALES, J. Long term storage of kiwifruit pollen. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 498, p. 105-108, 1999.

BUITINK, J.; WALTERS, C.; HOEKSTRA, F. A.; CRANE, J. Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents: interpretation on the basis of water activity and glass concepts. **Physiologia Plantarum**, v. 103, n. 2, p. 145-153, 1998.

BULAT, H. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v. 26, p. 686-696, 1961.

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.

BURSON, B. L.; YOUNG, B. A. Pollen-pistil interactions and interspecific-incompatibility among *Panicum antidotale*, *P. coloratum*, and *P. deustum*. **Euphytica**, v. 32, n. 2, p. 397-405, 1983.

BURTON, G. W. A search for the origin of Pensacola bahiagrass. **Economy Botanic**, NewYork, v. 21, n. 2, p. 379-82, 1967.

BURTON, G. W. Conventional breeding of dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 6, p.491-494, 1962.

BURTON, G. W.; FORBES, I. The genetics and manipulation of obligate apomixis in common Bahiagrass *Paspalum notatum* Flügge. In: **Proceedings of the Eighth International Grassland Congress held at the University of Reading**, England, 11-21. 1960. p. 66-71.

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.

BUXTON, P. A.; MELLANBY, K. The measurement and control of humidity. **Bulletin of Entomological Research**, v. 25, n. 02, p. 171-175, 1934.

CÁCERES, M. E.; PUPILLI, F.; QUARÍN, C. L.; ARCIONI, S. Feulgen-DNA densitometry of embryo sac permits discrimination between sexual and apomitic plants in *Paspalum simplex*. **Euphytica**, v. 110, p. 161-167, 1999.

CARNEIRO, V. T de C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 36-42, 2002.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 22 p. (Documentos, 115).

CARVALHO, V. S. **Criopreservação de sementes e pólen de orquídeas**, 2006. 69f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

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.

CHASE, A. C. L. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the U.S. National Herbarium**, v. 28, p. 1-310, 1929.

COHEN, E.; LAVI, U.; SPIEGEL-ROY, P. Papaya pollen viability and storage. **Scientia Horticulturae**, Israel, v.40, n.4, p.317-324, 1989.

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.

COOK, S. A.; STANLEY, R. G. Tetrazolium chloride indicator of pine pollen germinability. **Silvae Genetica** 9, Heft 5, p. 121-148, 1960.

COPESE, D.L. Fertility of Douglas-fir pollen after one year of storage in liquid nitrogen. **Forest Science**, Washington, v. 31, n. 3, p.569-574, 1985.

COPESE, D. L. Long term storage of douglas-fir pollens. **Forest Science**, Washington, v.33, n.1, 244-46, 1987.

CORRÊA, A. M. S.; GUIMARÃES, M. I. T. M.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; BEGALE, F. F. Flora polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). Família 176 – Poaceae (Gramineae). **Hoehnea**, v. 32, n. 2p. 269-282, 2005.

COSENDAI, A. C.; HÖRANDL, E. Cytotype stability, facultative apomixis and geographical parthenogenesis in *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). **Annals of Botany**, v. 105, n. 3, p. 457-470, 2010.

COSENZA, G. W. **Resistência de gramíneas forrageiras à cigarrinha-das-pastagens**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1982. (Boletim de Pesquisa).

COSTA, J. A. A. **Características ecológicas de ecótipos de *Paspalum notatum* Flüggé var. *notatum* naturais do Rio Grande do Sul e ajuste de um modelo de estimação do rendimento potencial**. 1997. 99f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

CURRIER, H. B. Callose substances in plant cells. **American Journal of Botany**, v.44, p. 478-488, 1957.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: IRL Press Ltd, 1992. 250p.

DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. 2005. Apomixia, Genética e melhoramento de plantas. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 2, p. 127-133.

DALL'AGNOL, M.; STEINER, M. G.; BÁREA, K.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; NABINGER, C.; SANTOS, R. J. Perspectivas de lançamento de cultivares de espécies forrageiras nativas: o gênero *Paspalum*. **Anais do**, v. 1, p. 147-160, 2006.

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.

DANIEL, I. O.; TAYO, T. O.; TOGUN, A. Wet cold preservation of West African yam (*Dioscorea spp.*) pollen. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 138, n. 1, p. 57-62, 2002.

DAURELIO, L. D.; ESPINOZA, F.; QUARÍN, C. L.; PESSINO, S. C. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, v. 244, n. 3-4, p. 189-199, 2004.

DE WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. **Evolution**, v. 24, n. 2, p. 270-277, 1970.

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.

DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. 4. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 215p.

DICKINSON, T. A. Taxonomy of agamic complexes in plants: a role for metapopulation thinking. **Folia Geobotanica**, Praga, v. 33, p. 327-332, 1998.

DUTRA, G. A. P.; SOUSA, M. M.; RODRIGUES, R.; SUDE, C. P.; PEREIRA, T. N. S. Viabilidade em grãos de pólen fresco e armazenado em acessos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.729-730, 2000.

EENIK, A. H. Preliminary results of research on storage and *in vitro* germination of lettuce pollen as and aind in lettuce breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 32, n. 2, p. 521-526, 1983.

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.

EIRA, M. T. S.; WALTERS, C. W.; CALDAS, L. S.; FAZUOLI, L. C.; SAMPAIO, J. B.; DIAS, M. C. L. L. Tolerance of *Coffea spp.* to desiccation at low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.11, n.2, p.97-105, 1999.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 112, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. **Euphytica**, Wageningen, 57: 227-243, 1991.

ENGELMANN, Florent. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms**. v. 74. Brill Archive, 1986. p. 526-527.

ESPINOZA, F.; QUARÍN, C. L. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomitic *Paspalum* species. **Australia Journal of Botanic**, v. 45, p. 871-87, 1997

ESPINOZA, F.; URBANI, M. H.; MARTINEZ, E. J.; QUARÍN, C. L. The breeding systems of three *Paspalum* species with forage potential. **Tropical Grassland**, v. 35, p. 211-217, 2001.

EVERS, G. W.; BURSON, B. L. Dallisgrass and other *Paspalum* species. **Warm Season Grasses**, v. 45, p. 681-713, 2004

FACHINETTO, J. M. **Caracterização agronômica, molecular, morfológica e determinação do nível de ploidia em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé**. 2010. 142 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FAHY, G. M.; MACFARLANE, D. R.; ANGELL, C. A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v, 21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FANG, X.; TURNER, N. C.; YAN, G.; LI, F.; SIDDIQUE, K. H. M. Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. **Journal of experimental botany**, v, 61,p. 335-345, 2009.

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.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flügge. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 402-406, 1961.

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.

FRANKEL, R; GALUN, E. **Pollination mechanism reproduction and plant breeding**. New York: Springer Verlag, 1977. 281 p.

FRICKER, M. D.; Meyer, A. J.; Tlalka, M.; Wood, J.; White, N. S.; Chow, C. M.; Vaux, D. J. Quantitative imaging of intact cells and tissues by multi-dimensional confocal fluorescence microscopy. In: **EBO—Experimental Biology Online Annual 1996/97**. Springer Berlin Heidelberg, 1998. p. 417-448.

GAALICHE, B.; MAJDOUB, A.; TRAD, M.; MARS, M. Assessment of Pollen Viability, Germination, and Tube Growth in Eight Tunisian Caprifig (*Ficus carica* L.) Cultivars. **Agronomy**, v. 2013, 4 p., 2013.

GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N., JANIK, J. eds. **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University, v.1, p. 23–47, 1983.

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.

GANESHAN, S.; ALEXANDER, M. P. Cryogenic preservation of lemon (*Citrus limon* Burm.) pollen. **Gartenbauwissenschaft**, Bangalore, v. 56, n. 5, p. 228-230, Sept./Oct. 1991.

GATES, R. N.; QUARÍN, C. L.; PEDREIRA, C. G. S. Bahiagrass. In: MOSER, L. E.; BURSON, B. L.; SOLLENBERGER, L. E. (Ed.). **Warm-season (C4) grasses**. Madison: ASA, CSSA; SSSA, p. 651-680, 2004.

GEORGIEVA, L. D., KURELEVA, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 72, p. 87–94, 1994.

GIORDANO, L. B.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Melhoramento genético do tomateiro, **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.24, n.219, p.43-57, 2003.

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.

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

GOMEZ, P.; GRADZIEL, T. M.; ORTEGA, E.; DICENTA, F. Short term storage of almond pollen. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 6, p. 151-152, 2000.

GONÇALVES, S. L.; FRANCHINI, J. C. **Integração lavoura pecuária**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 7p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 44).

GONZÁLES-BENITO, M. E. Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. **Acta Horticulturae**, v. 457, p. 133-142. 1998.

GRASSO, M. **Reproductive behavior of seashore Paspalum** (*Paspalum vaginatum* Sw. 2012. 130 f. Dissertações (Mestrado em Ciências) - The University of Georgia, Georgia, 2012.

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.

HADDAD, C. M.; DOMINGUES, J. L.; CASTRO, F. G. F.; TAMASSIA, L.F.M. Características de produção e valor nutritivo do capim Pensacola (*Paspalum notatum* Flüge var. *saurae* Parodi) em função da idade de corte. **Scientia Agrícola**, Piracicaba v. 56, n. 3, 1999.

HAND, M. L.; KOLTUNOW, A. M. G. The genetic control of apomixis: asexual seed formation. **Genetics**, v. 197, n. 2, p. 441-450, 2014.

HANNA, W. N. Pollen storage in frostless and conventional frost forming freezers. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1681-1682, 1994.

HANNA, W. W.; BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 6, p. 1136-1139, 1987.

HECKER, R. J.; STANWOOD, P. C.; SOULIS, C. A. Storage of sugarbeet pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, n. 3, p. 777-783, 1986.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, n. 4, p. 367-375, 1984.

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.

HÖRANDL, E. Species concepts in agamic complexes: Applications in the *Ranunculus auricomus* complex and general perspectives. **Folia Geobotanica**, Praga, v. 33, p. 335–348, 1998.

HÖRANDL, E.; DOBES, C.; LAMBROU, M. Chromosomen-und Pollen untersuchungen an osterreichischen Arten des apomiktischen *Ranunculus auricomus* Komplexes. (Chromosome and pollen studies on Austrian species of the apomictic *Ranunculus auricomus* complex.). **Botanica Helvetica**, v. 107, n. 2, p. 195-209, 1997..

HÖRANDL, E.; GREILHUBER, J. Diploid and autotetraploid sexuals and their relationships to apomicts in the *Ranunculus cassubicus* group: insights from DNA content and isozyme variation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 234, n. 1-4, p. 85-100, 2002.

HUGHES, H. G.; LEE, C. W.; TOWILL, L. E. Low-temperature preservation of *Clanthus formosus* pollen. **HortScience**, v. 26, n. 11, p. 1411-1412, 1991.

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, 2008, p. 55-87.

KALINGANIRE, A.; Harwood, C. E.; Slee, M. U.; Simons, A. J. Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (*Grevillea robusta* A. Cunn.). **Annals of Botany**, v. 86, n. 1, p. 133-148, 2000.

KARASAWA, Marines M. Gniech. Diversidade reprodutiva de plantas. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. de. **Cultivo do capim Pojuca**. Embrapa Cerrados, 2001.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. **Cryopreservation of plant cells and organs**, p. 115-134, 1985.

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.

- KERHOAS, C.; Dumas, C. Pollen quality in *Zea mays* as a prerequisite for sperm cell isolation and pollen transformation. **Plant sperm cells as tools for biotechnology**. p. 97-104, 1988.
- KHO, Yi O.; BAER, J. Observing pollen tubes by means of fluorescence. **Euphytica**, Wageningen, v. 17, n. 2, p. 298-302, 1968.
- KIHARA, H. **Wheat studies: retrospects e prospects**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1982. 310 p. (Developments in Crop Science).
- KIRBY, E. G.; SMITH, J. E. Elutable substances of pollen grain walls. In: LINSKENS, H.F. **Fertilization in higher plants**. Amsterdam: North-Holland, p.127-130, 1974.
- KOLTUNOW, A. M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, v. 5, n. 10, 1425–1437. 1993.
- KOSHY, K. C.; HARIKUMAR, D.; NARENDRAN, T. C. Insect visits to some bamboos of the Western Ghats, India. **Current Science**, v. 81, n. 7, p. 833-838, 2001.
- LANNER, R. M.; FOREST, P. S. Controlling the moisture content of conifer pollen. **Silvae Genetica**, v. 11, n. 4, p. 114-117, 1962.
- LANSAC, A. R.; SULLIVAN, C. Y.; JOHNSON, B. E.; LEE, K. W. Viability and Germination of the Pollen of *Sorghum* [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Annals of Botany**, v. 74, p. 27-33, 1994.
- LATTA, R. Preservation of suspension cultures of plant cells by freezing. **Canadian Journal of Botany**, v. 49, p. 1253-1254, 1971.
- LIETH, H. **Purposes of a phenology book**. Springer Berlin Heidelberg, p. 3-19, 1974.
- LINDER, H. P. Morphology and the evolution of wind pollination. In: Owens, S. J.; Rudall, P. J. **Reproductive biology in systematics, conservation and economic botany**. Royal Botanic Gardens, Kew, UK: Royal Botanic Garden, p. 123-135, 1998.
- LINSKENS, H. F. Pollen physiology. **Annual Review Plant Physiology**, v. 15, n. 1, p. 225-226, 1964.
- LIVINGSTON, G. K.; CHING, K. K. The longevity and fertility of freeze dried douglas-fir pollen. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.16, p.98-101, 1967.
- LUZA, J. G.; POLITO, V. S. Cryopreservation of english walnut (*Juglans regia* L.) pollen. **Euphytica**, Wageningen, v. 37, p.141-48, 1988.

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.

MAEDA, J. A.; PEREIRA, M. F. D. A. Caracterização, beneficiamento e germinação de sementes de *Paspalum notatum* Flüggé. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 100-105, 1997.

MANTOVANI, M., RUSCHEL, A. R., REIS, M. S., PUCHALSKI, A.; NODARI, R. O. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em uma formação secundária de floresta atlântica. **Revista Árvore**, v. 27, n. 4, p. 451-458, 2003.

MARASCHIN, G. E. A planta forrageira no sistema de produção: grama batatais, forquilha e bahiagrass. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. 393 p.

MARDI, M. O.; BAKHEIT, C. S.; KHAROUSI, L.; MANTHERI, O. S. Factors regulating *in vitro* germination of date palm pollen grains after storage. **Journal for Scientific Research Agricultural Sciences**, Oman, v. 5, n. 1, p. 19-23, 2000

MARIOT, A.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. Uso e conservação de *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) na Mata Atlântica: I. Fenologia reprodutiva e dispersão de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5, n. 2, p. 1-10, 2003.

MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain technology**, v. 34, p. 125-128, 1959.

MARTÍNEZ, E. J.; QUARÍN, C. L. Citoembriologia y comportamiento reproductivo de um citotipo diploide de *Paspalum hydrophilum* y SUS híbridos com *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). **Darwiniana**, v. 37, p. 243-251, 1999.

MARTÍNEZ, E. J.; URBANI, M. H.; QUARIN, C. L.; ORTIZ, J. P. A. Inheritance of apospoy in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, Lund, v. 135, p. 19-25, 2001.

MEDEIROS, A. C. S. **Preparo e uso de soluções salinas saturadas para a caracterização fisiológica de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 6 p. (Circular técnica, n. 125).

MELHEM, T. S.; MAKINO, H. Grãos de pólen de plantas alergógenas. **Boletim IG-USP**, v. 9, p. 145-152, 1978.

MELHEM, T. S.; SALGADO-LABOURIAU, M. L. Pollen grains of plants of the "Cerrado" V -Leguminosae - Caesolpinodae. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 369-387, 1973.

MENCK, A. L. M.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALSKI, M. E. Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 43/44, p. 20-23, 1990.

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.

MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. p.347-366.

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.

MORELLATO, L. P. C.; LEITÃO-FILHO, H. F. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian forest. **Biotropica**, v. 28, n. 2, p. 180-191, 1996.

MORENO-PÉREZ, D. C. E.; GARCÍA-VELÁZQUEZ, A.; ARRAZATE, C. H. A. Estudio citológico en poblaciones diploides y poliploides del género *Tripsacum*. **Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América**, v. 34, n. 11, p. 791-795, 2009.

MORRONE, O.; AAGESEN, L.; SCATAGLINI, M. A., SALARIATO, D. L., DENHAM, S. S., CHEMISQUY, M. A.; ZULOAGA, F. O. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P. D.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NASCIMENTO, W. M.; TORRES, A. C.; LIMA, L. B. Pollen viability in hybrid seed production of eggplant under tropical conditions. **Acta Horticulturae**, Gainesville, v. 607, p. 37-39, 2003.

NELLIST, M. E.; HUGHES, M. Physical and biological processes in the drying of seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 3, p. 613-643, 1973.

NETO, J. B F.; KRZYZANOWSKI, F. C.; DA COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Embrapa-CNPSO, 1998.

NIJS, H. C. M. Den; MENKEN, S. B. J. Relations between breeding system, ploidy level, and taxonomy in some advanced sections of *Taraxacum*. In: HIND, H. D. N.; BEENTJE, H. J. eds. **Compositae: Systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 665-677, 1996.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B. M. **Embryology of Angiosperms**, ed., Berlin: Springer-Verlag. p. 475-518, 1984.

NORMANN, G. A.; QUARIN, C. L.; BURSON, B. L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. **Journal of Heredity**, v. 80, n. 1, p. 24-28, 1989.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de. **Ação do iprodione e cálcio sobre alguns aspectos fisiológicos da germinação de grãos de pólen do pessegueiro diamante (*Prunus persicae* L. Bastch)**. 1999. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1999.

OLIVEIRA JÚNIOR, A. F. de.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; SANÁBIO, D.; SANTOS, S. dos. Influência do armazenamento na germinação de grãos de pólen de pessegueiro cv. Aurora. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 8., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1995. p. 117.

OZIAS-AKINS, P.; VAN DIJK, P. J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 509-37, 2007.

PARFITT, D. E.; ALMEHDI, A. A. A cryogenic storage of grape pollen. **American Journal of Enology and Viticulture**. Davis, v. 34, n. 4, p. 227-28, 1983.

PARTON, E.; VERVAEKE, I.; DELEN, R.; VANDENBUSSCHE, B.; DEROOSE, R.; PROFT, M. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, Dordrecht, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.

*Paspalum* **IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO**. JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13432>>. Acesso em: 01 Dez. 2015.

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.

PEREIRA, R. C. **Alternativas para melhorar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento em *Eucalyptus***. 2001. 41f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2001.

PERNÈS, J. **Organisation évolutive d'un groupe agamique: la section des Maximae du genre Panicum (Graminées)**. IRD Editions, 1975.

PFAHLER, P. L. In vitro germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays*) pollen. III. The effect of pollen genotype and pollen source vigor. **Canadian Journal of Botany**, v. 48, n. 1, p. 111-115, 1970.

PIO, L. A. S. **Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de armazenamento**. 2003. 45p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2003

PIZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A. Cerrado: introducción y evaluación agronomica de forrajeras tropicales. **Reunión de Sábanas**, v. 117, 1992.

POZZOBON, M. T.; VALLS, J. M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 29-34, 1997.

PRATES, E. R. **Efeito de doses de N e de intervalos entre cortes sobre a produção e composição de 2 ecotipos de *Paspalum notatum* Flügge e da cultivar pensacola *Paspalum notatum* Flügge var. sauræ Parodi**. 1970. 45p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 1970.

PRITCHARD, A. J. The cytology and reproduction of *Paspalum yaguaronense* (Hemr). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, p. 206-211, 1962.

QUARÍN, C. L. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomitic *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction** v. 11, p. 331-335, 1999.

QUARÍN, C. L. The nature of apomixis and its origin in *Panicoid* grasses. **Apomixis Newsl**, v. 5, p. 8-15, 1992.

QUARÍN, C. L.; HANNA, W. W. Effect of three ploidy levels on meiosis and mode of reproduction on *Paspalum hexastachyum*. **Crop Science**, Madison, v. 20, n. 1, p. 69-75, 1980.

QUARÍN, C. L.; POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. **Euphytica**, Wageningen, v. 90, p. 345-349, 1996.

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.

QUARÍN, C.L.; BURSON, B.L.; BURTON, G.W. Cytology of intra and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 145, n. 3, p. 420-426, 1984.

QUATRANO, R. S. Freeze-preservation of cultures flax cells utilizing dimethyl sulfoxide. **Plant Physiology**, v. 43, p. 2057-2061, 1968.

RADAESKI, J. N, EVALDT, A .C. P., LIMA, G. L., BAUERMAN, S. G. Grãos de pólen das formações campestres sul-brasileiras. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Luterana do Brasil**, v. 9, p. 59-67, 2011.

RADAESKI, J. N.; EVALDT, A. C. P., BAUERMAN, S. G.; LIMA, G. L. DE. Diversidade de grãos de pólen e esporos dos Campos do sul do Brasil: descrições morfológicas e implicações paleoecológicas. **IHERINGIA, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 69, n. 1, p. 107-132, 2014.

RAMOS, D. M. **Comportamento fenológico de gramíneas em um campo sujo de Cerrado: da indução de floração à emergência de plântulas**. 2010. 90 f. Dissertação (mestrado em botânica), - Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

RATHCKE, B.; LACEY, E. P. Phenological patterns of terrestrial plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 179-214, 1985.

REED, B. M. Implementing cryopreservation for long-term germplasm preservation in vegetatively propagated species. In: Towill, L. E.; Bajaj, Y .P. S. eds. **Cryopreservation of plant germplasm II**. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlin: Springer, 2002. p. 22-33.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science Technol.** v. 1, 499-514, 1973

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: **Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Springer Berlin Heidelberg. p. 53-69, 1995.

SAKAI, A. The frost-hardening process of woody plant VI. Seasonal variations in sugars (1). **Nihon Ringaku Kai Shi= Journal of the Japanese Forestry Society**, v. 42, n. 3, p. 97-102, 1960.

SAKAI, S.; MOMOSE, K.; YUMOTO, T.; NAGAMITSU, T.; NAGAMASU, H.; KARIM, A. A. H. NAKASHIZUKA, T.; INOUE, T. Plant reproductive phenology and general flowering in a mixed dipterocarp Forest. In: Roubik, D.; Sakai, S.; Hamid, A. A. Pollination ecology and the rain forest. **Ecological studies**, New York, v. 174, p. 35-50, 2005.

SALGADO-LABORIAU, M. L. Contribuição à palinologia dos Cerrados. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 1973, 291p.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 20, p. 60-65, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SARTOR, M. E.; QUARÍN, C. L.; ESPINOZA, F. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 4, p. 1270-1276, 2009.

SARTOR, M. E.; REBOZZIO, R. N.; QUARÍN, C. L.; ESPINOZA, F. Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. **Plant systematics and evolution**, v. 299, n. 7, p. 1295-1306, 2013.

SAVIDAN, Y. Apomixis, the way of cloning seeds. **Biofutur (France)**, 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).

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. P. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**, New York, p. 325-440, 1995.

SHARMA, A. K; SHARMA, A. **Chromosome techniques**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994. 367p.

SHIPPINDALL, L. K. A.; SCOTT, J. D.; THIRON, J. J.; MEREDITH, D. **The grasses and pastures of South Africa**. New York: Meredith, 1955. 771p.

SHIVANNA, K. R.; CRESTI, M. Effects of high humidity and temperature stress on pollen membrane integrity and pollen vigour in *Nicotiana tabacum*. **Sexual Plant Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 137-141, 1989.

SHIVANNA, K. R.; LINSKENS, H. F.; CRESTI, M. Pollen viability and pollen vigor. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 81, n. 1, p. 38-42, 1991.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. Pollen biology. A laboratory manual. Berlin/New York: **Springer-Verlag**, Berlin/Heidelberg, 1992.

SILVA FILHO, J. G. **Avaliação da temperatura e do período de armazenamento na conservação de grãos de pólen de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), visando a produção de sementes híbridas.** 2007. 32p. Monografia (Especialização em Biotecnologia vegetal) - Faculdade JK, Brasília, 2007.

SIREGAR, I. Z.; SWEET, G. B. The impact of extraction and storage conditions on the viability of radiata pine pollen. **Silvae Genetica**, Bogor, v. 49, n. 1, p. 10-14, 2000.

SAKAI, A. The frost-hardening process of woody plant VI. Seasonal variations in sugars (1). **Journal of the Japanese Forestry Society**, v. 42, n. 3, p. 97-102, 1960.

SAKAI, A.; LARCHER, W. **Frost survival of plants: Responses and adaptation to freezing stress.** Berlin: Heidelberg, Springer-Verlag, v. 62, 1987.

SOARES, H. H. R. F. Efeito de doses de nitrogênio e intervalos entre cortes sobre a produção de matéria seca e proteína bruta de dois ecotipos de *Paspalum dilatatum* Poir, um ecotipo de *Paspalum notatum* Flügge e a cultivar Pensacola (*Paspalum notatum* Flügge var. sauræ Parodi). **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas “Francisco Osório”**, Porto Alegre, v. 4, p. 201-232, julho 1977

SORENG, R. J.; PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F. O.; JUDZIEWICZ, E. J.; MORRONE, O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 117-137, 2015.

SOUSA, V. A. de. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1996.

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

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.

SOUZA, M. M.; 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* f. *flavicarpa* O. Deg.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1209-1217, 2002.

SPARKS, D.; YATES, I. E. Pecan pollen stored over a decade retains viability. **HortScience**, Alexandria, v. 37, n. 1, p. 176-177, 2002.

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.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. E. **Pollen: Biology, Biochemistry, Management**. New York: Springer-Verlag, 1974.

STEIN J.; QUARIN. C. L; MARTINEZ, E. J.; PESSINO. S C.; ORTIZ, J. P. A. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus **Theoretical and Applied Genetics**, Berling, v. 109, p.186–191, 2004.

STEINER, M. G. **Caracterização agronômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* e *Paspalum guenoarum* Arech**. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

STEPONKUS, P. L.; WEBB, M. S. Freeze induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Eds.) **Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1992. p. 338-362.

STRAPASSON, E.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 373-381, 2000.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995. p. 87-101.

TALORA, D. C.; MORELLATO, P. C. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 13-26, 2000.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. Â.; VANDER PEREIRAM A. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.

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.

TORACIO, M. A. P.; GOETZKE, S. ; SABBI, L. B. C. Avaliação do uso de resíduos de roçada (palha) no controle da erosão viária. **Cadernos da Escola de Saúde** , Curitiba. v. 2, p. 191-202, 2013.

TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. eds. **Cryopreservation of plant germplasm II**. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlim: Springer, 2002. p. 04-21.

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. Liquid nitrogen preservation of pollen from tuber-bearing *Solanum* species [Germplasm, potatoes]. **HortScience (USA)**, 1981.

TOWILL, L. E. Low temperature and freeze-/vacuum-drying preservation of pollen. **Cryopreservation of plant cells and organs**, p. 171-198, 1985.

TRENHOLM, L. E.; UNRUH, J. B.; CISAR, J. L. Selecting a Turfgrass for Florida Lawns. **University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. Electronic Data Information Source Document ENH04**, 2001.

URBANI, M. H.; QUARÍN, C. L.; ESPINOZA, F.; PENTEADO, M. I. O.; RODRIGUES, I. F. Cyto geography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. **Plant Systematics and Evolution**, v. 236, n. 1-2, p. 99-105, 2002.

VALLE, C. B. do; SIMIONI, C.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; CHIARI, L. . Melhoria genética de Brachiaria. In: RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; VALLE, C. B. do (Org.). **Melhoramento de Forrageiras Tropicais**. 1. ed. Campo Grande: Embrapa, 2008, v. 1, p. 13-53.

VALLS, J .F. M.; POZZOBON, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de *Paspalum* **Anais...** Instituto de Zootecnia, SAPF-DNAP-IZ, CNPGC-Embrapa, Orstom e Procisur, Nova Odessa, p. 15-21, 1987.

VALLS, J. F. M. Recursos Genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Paspalum*, 1987, Nova Odessa, SP. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1987, p. 03-13.

VALLS, J. F. M. Impacto do conhecimento citogenético na taxonomia de *Paspalum* e *Axonopus*, Gramineae. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. et al. (Ed.) **Tópicos atuais em botânica: palestras convidadas do 51st Congresso Nacional de Botânica**.

Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Sociedade Botânica do Brasil, 2000. p. 57-60.

VEENENDAAL, E. M.; ERNST, W. H. O.; MODISE, G. S. Reproductive effort and phenology of seed production of savanna grasses with different growth form and life history. **Vegetatio**, v. 123, n. 1, p. 91-100, 1996.

VERTUCCI, C. W. Relationship between Thermal Transitions and Freezing Injury in Pea and Soybean Seeds. **Plant Physiology**, v. 90, n. 3, p. 1121-1128, 1989.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Theoretical basis of protocols for seed storage. **Plant Physiology**. Rockville, v. 94, n. 3, p. 1019-1023, 1990.

VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E.; CRANE, J. Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperature. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 531-540, 1994.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica organografia**. Viçosa: UFV, 1995. 114 p.

VIEIRA, L. J. **Conservação *in vitro* e criopreservação de espécies de *Manihot***. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – BA., 2013.

VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M.; PINHO, E. V. R. V.; GUIMARÃES, R. J.; OLIVEIRA, J. A. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de cafeeiro**. Lavras: UFLA, 1998. 34 p. (Boletim Agropecuário, 26).

VIEITEZ, E. El uso del cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. **Rev Anales Edafol & Fisiol Veget**, v. 12, n. 12, p. 1033-40, 1952.

VITHANAGE, H. I. M. V; ALEXANDER, D. M. E. Synchronous flowering and pollen storage techniques as aids to artificial hybridization in pistachio (*Pistacia* spp.). **Journal of Horticultural Science**, Australia, v. 60, n. 1, p. 107-113, 1985.

WALTERS, C.; RAO, N. K.; HU, X. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 1, p. 15-22, 1998.

WANG, B. S. P. Metodología de la conservación de los recursos genéticos forestales. **Roma: FAO**, p. 93-103, 1975.

WEATHERHEAD, M. A.; GROUT, B. W. W.; HENSHAW, G. G. Advantages of storage of potato pollen in liquid nitrogen. **Potato Research**, Netherlands, v. 21, p. 331-334, 1978.

WEILER, R. L. **Hibridação intraespecífica em *Paspalum notatum* Flügge**. 2013. 111f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

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.

WINSTON, E. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, v. 41, p. 232-237, 1960.

WITHERS, L. A. *In vitro* methods for collecting germplasm in the field. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 69, p. 2-6, 1987.

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.

YOUNG, J. F. Humidity control in the laboratory using salt solutions—a review. **Journal of Applied Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 241-245, 1967.

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.