

MÁRCIA DA COSTA CAPISTRANO



**FATORES DETERMINANTES NA FERTILIDADE DOS GAMETAS E
CONSERVAÇÃO DE PÓLENS DO AMENDOIM FORRAGEIRO
(*Arachis pintoï*) NO ACRE**

RIO BRANCO - AC

2015

MÁRCIA DA COSTA CAPISTRANO

**FATORES DETERMINANTES NA FERTILIDADE DOS GAMETAS E
CONSERVAÇÃO DE PÓLENS DO AMENDOIM FORRAGEIRO
(*Arachis pintoï*) NO ACRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Vanderley B. dos Santos
Co-orientadora: Dra. Patrícia Silva Flores

RIO BRANCO - AC

2015

A minha querida mãezinha Maria Lizete Souza da Costa,
pelas orações e incentivo de seguir sempre em frente,
apesar das dificuldades.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pela saúde e pelo direcionamento em minha vida.

Aos meus orientadores, Dr. Vanderley Borges dos Santos e Dra. Patrícia Silva Flores, pelos ensinamentos e apoio científico ao longo desses anos.

À Universidade Federal do Acre, pela oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

À Embrapa Acre e toda sua equipe, pelo espaço disponibilizado.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À FAPAC, pelos recursos financeiros recebidos.

Aos estudantes de iniciação científica, Conceição Paula Rufino, Ivanir Cardozo e Clemeson Souza, pelo apoio nas atividades de campo e laboratório.

Aos professores do curso de pós-graduação em agronomia, Dr. Jorge Ferreira Kusdra, Sebastião Elviro Neto, Regina Lucia Felix, Josué Bispo e Romeu de Carvalho Neto, pelos conhecimentos adquiridos em suas disciplinas.

Ao Dr. José Francisco M. Valls, pelos valiosos ensinamentos e ao me receber no CENARGEN, bem como a sua equipe, em especial a Daniele Wondracek, Adriana Custódio e Marisa Pozzobon, pelas informações recebidas.

Aos colegas de pós-graduação, em especial, a Valter Magalhães, Shirlei Minosso, Anderson Souza, João Carlos, Jonathas Vasconcelos, Cássio Sthephan, Marinês Cades, Raquel Smith, Angelita Butzke e Ueliton de Almeida, pela convivência e amizade.

Aos Amigos Raimundo D'ávila, Robson Lima (*in memoriam*), Bruno Gomes, Sâmia Fontenele, Rosilene Gomes, Cléia Santos, Glória Almeida, Eliglene Costa, Hemython Luiz Bandeira, Yldison Felipe Nobre e Mauro Costa, pela força e incentivo.

Em especial, aos meus pais, Valdízio Capistrano e Maria Lizete Souza da Costa, pelo exemplo de caráter, dedicação e amor sempre constantes e aos meus irmãos, Paulo, José Marcello e Antônio Israel, pelos quais busco um futuro melhor.

E por fim, a todos os professores e amigos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigada!

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

RESUMO

O amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krapov. & W. C. Greg.) é uma das leguminosas forrageiras que vem sendo bastante utilizada para a recuperação de pastagens degradadas. Apesar das vantagens do seu uso, problemas reprodutivos têm sido apontados como responsáveis pela baixa produção de sementes, resultando em alto custo no mercado, além de limitar a obtenção de híbridos em programas de melhoramento genético. Neste sentido, são necessárias informações sobre a biologia reprodutiva do *A. pinto* para garantir o sucesso nas hibridações. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento reprodutivo de *A. pinto* nas condições edafoclimáticas do Estado do Acre, no que se refere à viabilidade do pólen e receptividade do estigma ao longo do dia, bem como técnicas de armazenamento e assim, aumentar a eficiência das hibridações no programa de melhoramento genético do amendoim forrageiro. O experimento foi realizado na Embrapa Acre, utilizando genótipos de *A. pinto*, pertencentes ao seu Banco Ativo de Germoplasma. Foram estabelecidas metodologias para a determinação de viabilidade do pólen e receptividade do estigma ao longo dia. A germinabilidade polínica foi determinada com diferentes concentrações de sacarose (0, 100, 200, 300 e 400 g.L⁻¹) e ácido bórico (0, 25, 50, 75 e 100 mg.L⁻¹) suplementado aos sais do meio Niles e Quesenberry. Após a definição do meio de cultura adequado, foram testadas as temperaturas de incubação de 25, 30, 35 e 40 °C. A viabilidade polínica foi avaliada por meio de testes colorimétricos utilizando os corantes: TTC - Trifeniltetrazólio, MTT - 2,5 difeniltetrazólio bromide, Alexander, Baker, Carmim acético glicerinado, Sudan IV e Lugol. A eficiência dos reagentes empregados na determinação da receptividade dos estigmas foi avaliada utilizando-se peróxido de hidrogênio (3%), peroxtesmo e solução de Baker. Após, foi verificado o período de maior fertilidade em oito acessos de *A. pinto* pertencentes ao BAG. Para a avaliação das necessidades térmicas de armazenamento do pólen, foram testadas as seguintes temperaturas: 33, 20, 10 e -22 °C, em ambientes com e sem sílica gel, durante 10 semanas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nos testes colorimétricos, a comparação de médias foi realizada pelo teste de Dunnet a 5% de probabilidade. Os efeitos

das concentrações de sacarose, ácido bórico, do tempo na viabilidade polínica e armazenamento de pólenes foram demonstrados por análise de regressão. Para a análise, os dados de porcentagem foram transformados para $\sqrt{x + 1}$. Verificou - se que os meios de cultura que promovem maior porcentagem de germinação *in vitro* de pólen de *A. pintoi* são aqueles, suplementados com 25 e 75 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 200 g.L⁻¹ de sacarose. A temperatura de incubação que resulta na maior porcentagem de germinação *in vitro* de pólen é a de 30 °C. Os corantes que determinam a viabilidade de pólen semelhante a germinação *in vitro* são o MTT e o Baker. A temperatura de armazenamento de pólenes que possibilita maior longevidade é a de - 22 °C. A viabilidade e a germinabilidade polínica decrescem no decorrer do dia.

Palavras-chave: Viabilidade polínica, armazenamento de pólenes, receptividade de estigmas, melhoramento genético de plantas.

ABSTRACT

Forage peanut (*Arachis pinto* Krapov. & WC Greg.) is a legume that has been extensively used for recovery of degraded pastures. Despite the advantages of its use, reproductive problems have been identified as responsible for low seed production, resulting in its high cost, in the market addition to limiting the produce hybrids in breeding programs. As a result, information on reproductive biology of *A. pinto* is needed to ensure success in hybridizations. This work aimed to evaluate the reproductive behavior of *A. pinto* in the environmental conditions of Acre, with regard to pollen viability and stigma receptivity throughout the day, as well as storage techniques and thus increase the efficiency of hybridizations in the forage peanut breeding program. The experiment was conducted at Embrapa Acre, using genotypes of *A. pinto*, belonging to their Active Germplasm Bank. Methods have been established in for the determination of viability of the pollen and stigma receptivity throughout the day. Different sucrose concentrations (0, 100, 200, 300 and 400 g.L⁻¹) and boric acid (0, 25, 50, 75 and 100 mg.L⁻¹) of the medium supplemented with the salts Niles and Quesenberry were tested asses pollen germination. After defining the culture medium, incubation temperatures tested were 25, 30, 35 and 40 °C. Pollen viability was assessed by colorimetric tests using dyes: TTC - Triphenyltetrazolium, MTT - 2.5 diphenyltetrazolium bromide, Alexander, Baker, Carmine acetic glycerin, Sudan IV and Lugol. The efficiency of the reagents used in determining the receptivity of the stigma was assessed using hydrogen peroxide (3%), Baker and peroxtesmo solution. There after the period of greatest fertility was assessed in eight accessions *A. pinto* belonging to BAG. After it was found the period of greatest fertility in eight accessions of the BAG. For evaluation of the thermal storage pollen needs, the following temperatures were tested: 33, 20, 10 and - 22 °C, in environments with and without silica gel, for 10 weeks. The experimental design was completely randomized and the means were compared by the Tukey test at 5% probability. The colorimetric tests, the mean comparison was taken by Dunnet test at 5% probability. The effects of the concentrations of sucrose, boric acid, weather and pollen viability storage was demonstrated by regression analysis. For analysis, percentage data were transformed to $\sqrt{x + 1}$. The culture media that promote the highest

percentages of *in vitro* germination of pollen *A. pintoii* are those supplemented with 25 and 75 mg.L⁻¹ of boric acid and 200 g.L⁻¹ of sucrose. The incubation temperature resulting in the highest percentage of *in vitro* pollen germination is 30 °C. The dyes which determine the viability of pollen germination *in vitro* similar are MTT and Baker. The pollen storage temperature that assures the greater longevity is to - 22 °C. Pollen viability and pollen germination decrease throughout the day.

Keywords: pollen viability, pollen storage, receptivity of stigmas, plant breeding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Área de ocorrência natural de espécies do gênero <i>Arachis</i> e seu provável centro de origem na Serra do Amambaí.....	19
Figura 2	- Estrutura floral de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi'. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	22
Figura 3	- Estrutura do "peg" e do geotropismo em <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi'. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	24
Figura 4	- Retirada e abertura das anteras da flor de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi', para a liberação de pólen. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	33
Figura 5	- Reagentes utilizados na avaliação da receptividade dos estigmas de flores de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi'. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	37
Figura 6	- Pólen de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi' armazenados em microtubulos contendo algodão e sílica gel. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	39
Figura 7	- Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi' quando submetido a diferentes concentrações de sacarose e de ácido bórico. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	40
Figura 8	- Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi', em meio de Niles e Quesenberry (1992) suplementado com: A) 50 mg.L ⁻¹ de ácido bórico sem a adição de sacarose; e B 25 mg.L ⁻¹ ácido bórico combinado com 200 g.L ⁻¹ de sacarose. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	42
Figura 9	- Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de <i>Arachis pintoii</i> cv. BRS 'Mandobi' quando submetido a diferentes concentrações de sacarose e de ácido bórico. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	43

Figura 10	- Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', incubados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	45
Figura 11	- Efeito da temperatura de incubação na germinação <i>in vitro</i> de grãos pólen de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi'. A) 25 °C, B) 30 °C, C) 35 °C e D) 40 °C. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	46
Figura 12	- Coloração de grãos pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi' utilizando diferentes corantes: A) Alexander, B) Lugol, C) Sudan IV, D) Carmim acético glicerinado, E) MTT + Sacarose, F) MTT sem sacarose, G) Baker e H) TTC. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	51
Figura 13	- Receptividade dos estigmas de flores de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS Mandobi utilizando-se peróxido de hidrogênio, solução de Baker e peroxtesmo. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	55
Figura 14	- Viabilidade polínica de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi' em função do horário de coleta. UFAC, Rio Branco, AC. 2015.....	56
Figura 15	- Receptividade dos estigmas de flores de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em diferentes horários de coleta. UFAC, Rio Branco, AC.2015.....	59
Figura 16	- Germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	60
Figura 17	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Ap55, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	64
Figura 18	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Alqueire-1, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	65

Figura 19	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Ap8, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	66
Figura 20	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Ap56, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	66
Figura 21	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Ap57, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	67
Figura 22	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis repens</i> cv. Ar67, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	68
Figura 23	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Ap90, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	68
Figura 24	- Germinação <i>in vitro</i> e coloração de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. Ap7, armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Viabilidade polínica de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi' obtidos com a utilização de diferentes corantes. UFAC, Rio Branco, AC. 2015.....	49
Tabela 2	- Viabilidade polínica de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi' obtidos com a utilização de diferentes corantes. UFAC, Rio Branco, AC. 2015.....	53
Tabela 3	- Receptividade dos estigmas de flores de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', utilizando diferentes reagentes. UFAC, Rio Branco, AC. 2015.....	54
Tabela 4	- Germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>Arachis pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', armazenamentos em diferentes temperaturas: 33, 10, 20, -22 °C, por 10 semanas. UFAC, Rio Branco, AC. 2015.....	62

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A	- Composição dos meios de cultura utilizados para a germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico (H ₃ BO ₃).....	90
APÊNDICE B	- Análise de variância da germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', submetidos a diferentes temperaturas.....	90
APÊNDICE C	- Resumo da análise de variância dos dados referentes à germinação <i>in vitro</i> de pólen de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em meios de cultura contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.....	91
APÊNDICE D	- Análise do desdobramento da sacarose em cada nível de ácido bórico referente à germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.....	91
APÊNDICE E	- Análise do desdobramento do ácido bórico em cada nível de sacarose referente a germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.....	91
APÊNDICE F	- Análise de variância da germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico	92
APÊNDICE G	- Análise de variância da germinação <i>in vitro</i> de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.....	92
APÊNDICE H	- Análise de variância referente a viabilidade polínica de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', por meio da utilização de testes colorimétricos.....	92

APÊNDICE I	- Análise de variância referente a viabilidade e germinabilidade polínica de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi'.....	93
APÊNDICE J	- Análise de variância referente à receptividade dos estigmas de flores de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', utilizando-se diferentes reagentes.....	93
APÊNDICE K	- Análise de variância referente a viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em diferentes horários do dia.....	93
APÊNDICE L	- Resumo da análise de variância referente a receptividade dos estigmas das flores de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', proveniente de diferentes horários de coleta	94
APÊNDICE M	- Análise de variância referente a receptividade dos estigmas das flores de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', proveniente de diferentes horários de coleta.....	94
APÊNDICE N	- Resumo da análise de variância dos dados referentes ao armazenamento de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em diferentes condições, por 10 semanas.....	94
APÊNDICE O	- Análise do desdobramento da temperatura dentro de cada nível sílica gel no armazenamento de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi'.....	95
APÊNDICE P	- Análise do desdobramento da sílica gel dentro de cada nível de temperatura no armazenamento de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi'.....	95
APÊNDICE Q	- Análise de variância dos dados referentes ao armazenamento de pólenes de <i>A. pintoi</i> cv. BRS 'Mandobi', em diferentes condições no período de 10 semanas.....	95
APÊNDICE R	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Ap55, em diferentes horários de coleta.....	96

APÊNDICE S	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Alqueire-1, em diferentes horários de coleta.....	96
APÊNDICE T	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Ap8, em diferentes horários de coleta.....	96
APÊNDICE U	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Ap56, em diferentes horários de coleta.....	97
APÊNDICE V	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Ap57, em diferentes horários de coleta.....	97
APÊNDICE X	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. repens</i> cv. Ar67, em diferentes horários de coleta.....	97
APÊNDICE Z	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Ap90, em diferentes horários de coleta.....	98
APÊNDICE W	- Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do <i>A. pintoi</i> cv. Ap7, em diferentes horários de coleta.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ASPECTOS GERAIS DO AMENDOIM FORRAGEIRO (<i>Arachis pintoii</i> Krapov. & W.C. Greg.).....	19
2.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DO AMENDOIM FORRAGEIRO	22
2.2.1 Morfologia do grão de pólen e desenvolvimento da semente	23
2.2.2 Técnicas utilizadas em estudo de biologia reprodutiva de <i>Arachis</i>	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PÓLENS.....	33
3.1.1 Efeito da sacarose e do ácido bórico na germinação <i>in vitro</i> de pólenes	34
3.1.2 Efeito da temperatura na germinação <i>in vitro</i> de pólenes.....	35
3.2 VIABILIDADE DO PÓLEN ATRAVÉS DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS	36
3.3 RECEPTIVIDADE DE ESTIGMAS.....	37
3.4 VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM DIFERENTES HORÁRIOS DO DIA.....	38
3.5 MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DO GRÃO DE PÓLEN	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PÓLENS.....	40
4.1.1 Efeito da sacarose e do ácido bórico na germinação <i>in vitro</i> de pólenes	40
4.1.2 Efeito da temperatura na germinação <i>in vitro</i> de pólenes.....	45
4.2 VIABILIDADE DO PÓLEN ATRAVÉS DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS	49
4.3 RECEPTIVIDADE DOS ESTIGMAS	54
4.4 VIABILIDADE POLÍNICA AO LONGO DO DIA.....	56
4.5 RECEPTIVIDADE DOS ESTIGMAS AO LONGO DO DIA.....	59
4.6 ARMAZENAMENTO DE PÓLENS.....	60
4.7 VIABILIDADE E GERMINABILIDADE POLÍNICA DE GENÓTIPOS DE <i>Arachis pintoii</i> EM DIFERENTES HORÁRIOS DO DIA	64
5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	89

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a pecuária brasileira sofreu grande expansão em área de pastagem cultivada, para suprir as demandas por produtos de origem animal. No entanto, a substituição de florestas nativa por pasto tem resultado no empobrecimento dos solos, devido principalmente ao manejo inadequado e ao uso de gramíneas e forrageiras não adaptadas (MENEZES, 2011). A síndrome da morte do capim *Brachiaria brizantha* cv. 'Marandu' é um exemplo típico de não adaptação que resultou na degradação de milhares de hectares de pastagens em diversos estados brasileiros (BARBOSA, 2006).

No estado do Acre, aproximadamente 80% das pastagens são formadas por *Brachiaria brizantha* cv. 'Marandu' (VALENTIM et al., 2000a). Essa baixa diversificação, tem tornado a atividade pecuária pouco eficiente, já que tem se verificado a degradação dessas pastagens e isso tem contribuído para aumentar os índices de desmatamento. De acordo com Assis e Valentim (2009), a recuperação de pastagens degradadas, além de reincorporar a terra ao processo produtivo diminui as pressões de desmatamento, evitando a abertura de novas áreas de floresta. Uma das opções existentes para a recuperação de pastagens degradadas é a introdução de leguminosas e gramíneas adaptadas às condições edafoclimáticas e ao sistema de produção.

O consórcio de plantas forrageiras com gramíneas é uma técnica importante na produção animal, pois minimiza os efeitos negativos causados ao meio ambiente e permite a expressão do potencial genético dos animais, resultando em uma maior rentabilidade dos sistemas de produção (VALENTIM et al., 2008). Dessa forma, é importante a escolha correta da planta forrageira, em um sistema de exploração pecuária baseada no uso de pastos, uma vez que, tanto a rentabilidade quanto a sustentabilidade do sistema dependem dessa escolha (FONSECA et al., 2010).

Existem várias opções de plantas forrageiras disponíveis, no entanto, há um número restrito de espécies propícias a cada ecossistema e perfil de sistema reprodutivo. Devido a essa restrição, o uso de leguminosas em consórcio com gramíneas é uma prática pouco utilizada no Brasil. Apesar dessa baixa utilização, há um crescente interesse por esta família (ARAÚJO et al., 2008), sendo o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) apontado como uma das espécies silvestres mais promissoras do gênero (CARVALHO, 2004).

Apesar das vantagens do amendoim forrageiro, problemas reprodutivos têm sido apontados como responsáveis pelo alto custo na aquisição de sementes. Várias técnicas são utilizadas no sentido de estudar a biologia reprodutiva das espécies, que naturalmente apresentam dificuldades reprodutivas. Essas técnicas estão relacionadas, principalmente ao pólen, no que se refere a germinação *in vitro*, viabilidade polínica, receptividade dos estigmas e seu armazenamento.

De acordo com Debbarama et al. (2013), o sucesso das hibridações envolve uma série de eventos, incluindo germinação do pólen, crescimento do tubo polínico, fertilização, desenvolvimento do embrião e do endosperma e maturação de sementes.

A viabilidade do grão de pólen e a receptividade do estigma afetam diretamente a efetividade da polinização. Em *Arachis* estes fatores apresentam variações conforme a umidade relativa do ar, temperatura, bem como ao genótipo da planta (PRASAD et al., 2000; KAKANI et al., 2002; REIS et al., 2009; ADJOLOHOUN et al., 2013).

O armazenamento de pólen é importante quando se pretende efetuar o cruzamento de espécies com períodos distintos de floração, para o transporte de material biológico e/ou preservação da variabilidade genética (GOMES et al., 2003; DANNER et al., 2011). Para tanto, elementos como umidade do pólen, temperatura de armazenamento e tempo de descongelamento devem ser previamente estabelecidos.

A germinação *in vitro* permite verificar a viabilidade do pólen e fornece informações básicas sobre o potencial reprodutivo de uma espécie (JAYAPRAKASH; SARLA, 2001), sendo muito empregada no monitoramento de pólen armazenado (OLIVEIRA et al., 2001). Dentre as vantagens da germinação de pólen *in vitro*, destaca-se a confiabilidade dos seus resultados, quando comparados com testes histoquímicos, uma vez que o uso de corantes tende a superestimar os valores reais de viabilidade polínica.

De acordo com Stanley e Linskens (1974), um dos fatores que influencia na germinação *in vitro* dos grãos de pólen é o tempo necessário de incubação. Além disso, saber o momento exato em que a germinação *in vitro* ocorre é importante, pois permite determinar o tempo ideal para avaliação dos testes de viabilidade após a inoculação com os pólenes, o que proporciona melhor qualidade das polinizações controladas (CHAGAS et al., 2009). O estudo das condições de germinação *in vitro* e de armazenamento do pólen de uma espécie é importante em programas de melhoramento genético, pois permitem obter maior sucesso nas hibridações (DANNER et al., 2011).

O estabelecimento de metodologias de avaliação de viabilidade do pólen e receptividade do estigma ao longo do dia tem sido realizado, no sentido de aumentar

as taxas de cruzamento de genótipos como ferramenta para auxiliar nos programas de melhoramento genético em *Arachis pintoi* (KAKANI et al., 2002; OLIVEIRA; VALLS, 2003; FÁVERO; SIMPSON, 2004; SILVA, 2008; CUSTODIO, 2009). No entanto, observa-se que todos os trabalhos relacionados à biologia reprodutiva de *Arachis*, incluindo *Arachis pintoi*, encontrados na literatura foram realizados em regiões com características climáticas distintas da região Amazônica, fazendo-se necessário conhecer os aspectos reprodutivos desta espécie nas condições ambientais do Estado do Acre.

Este trabalho teve como objetivo estudar aspectos relacionados à biologia reprodutiva de *Arachis pintoi* cv. 'Mandobi', visando auxiliar na eficiência do programa de melhoramento genético do amendoim forrageiro atualmente desenvolvido no Estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO AMENDOIM FORRAGEIRO (*Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg.)

O conhecimento das diversas características da planta forrageira é importante para sua correta utilização, com o objetivo de garantir a produtividade e a perenidade dos cultivos, além do lucro dos sistemas produtivos que as utilizam (MENEZES, 2011). Existem muitas espécies forrageiras disponíveis aos pecuaristas, no entanto há um número restrito de forrageiras adaptadas a cada ecossistema e perfil reprodutivo (FONSECA et al., 2010). Dentre as leguminosas forrageiras tropicais, o amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) vem despertando maior interesse, contudo, dificuldades na realização de hibridações em programas de melhoramento genético têm inviabilizado a produção de sementes. Essas dificuldades reprodutivas tem elevado o custo de aquisição das sementes e, conseqüentemente, limitado seu uso, fazendo-se necessários estudos relacionados à sua biologia reprodutiva para que se possam desenvolver variedades, adaptadas a cada perfil reprodutivo, via melhoramento genético.

O amendoim forrageiro pertence ao gênero *Arachis* da família das Fabaceae, nativa do Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (RINCON et al., 1992). A Serra do Amambaí, no limite do Mato Grosso do Sul e Paraguai (Figura 1), é reconhecida como seu centro de origem (GREGORY et al., 1980; HAMMONS, 1994).



Figura 1 - Área de ocorrência natural de espécies do gênero *Arachis* e seu provável centro de origem na Serra do Amambaí. Fonte: Elias Melo et al. (2008)

Na década de 60, vários pesquisadores haviam identificado o alto potencial forrageiro de muitas espécies silvestres desse gênero (VALLS et al., 1993). Apesar da existência dessas espécies com potencial forrageiro, pertencentes ao gênero *Arachis*, segundo Valls (1995), os estudos se concentram principalmente em *Arachis pintoii*, *Arachis repens* e *Arachis glabrata*. No entanto, a identificação de novas espécies é previsível, uma vez que não foram realizadas expedições de coletas em importantes áreas de ocorrência de *Arachis* (VALLS; SIMPSON, 1997; 2005). Dentre essas espécies, o interesse dos pesquisadores por *A. pintoii* tem aumentado muito, tanto em âmbito nacional como internacional devido, dentre outros fatores, a sua potencialidade como forrageira e como cobertura verde em cultivos perenes (BARCELLOS et al., 2001).

O nome *Arachis pintoii* é atribuído a Krapovickas e Gregory (GREGORY et al., 1973), pois o primeiro acesso desta espécie foi obtido em uma coleta realizada por Geraldo Pinto em 1954, na foz do rio Jequitinhonha, em Belmonte, no Estado da Bahia.

O amendoim forrageiro é uma leguminosa herbácea, perene que vem sendo bastante utilizada em pastagens consorciadas e em bancos de proteína na alimentação de ruminantes (ASSIS; VALENTIM, 2009). Segundo Paulino et al. (2009) as leguminosas constituem as espécies vegetais mais empregadas como cobertura viva dos solos, principalmente pela alta capacidade de aporte de nitrogênio a este, via fixação biológica. Geralmente, o nitrogênio é um dos elementos mais requerido em grandes quantidades e a utilização de leguminosas consorciada com pastagens é a forma mais econômica de introduzir nitrogênio nos solos.

O plantio do amendoim forrageiro deve ser realizado em épocas com temperaturas superiores a 18 °C, mesmo que haja irrigação (VALENTIM et al., 2000b). A temperatura ideal para seu crescimento esta em torno de 25-30 °C, podendo alcançar de 20 a 60 cm de altura. Normalmente, apresenta densas quantidades de estolões ramificados, que se enraízam até 1,50 m horizontalmente em todas as direções. Segundo Assis (2011), o que difere este gênero dos demais é a produção subterrânea de frutos originários de flores aéreas.

As folhas do *A. pintoii* são alternadas, compostas, com quatro folíolos de cor verde claro a escuro (MONTENEGRO; PINZÓN, 1997; LIMA et al., 2003). Em condições de sombreamento ou em determinada fase do crescimento há um maior alongamento do caule e menor densidade dessas folhas (LIMA et al., 2003).

O amendoim forrageiro apresenta raiz pivotante, com capacidade de extrair água das camadas mais profundas, quando em condições desfavoráveis. O *A. pintoii*

se desenvolve bem em áreas sujeitas a alagamentos temporários, adapta-se a solos pobres em nutrientes e com alta toxicidade de alumínio (RINCÓN et al., 1992; SIMPSON et al., 1994; CIOTTI et al. 2006).

Dentre as vantagens do amendoim forrageiro estão: a) boa adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade; b) alta produção; c) alta capacidade de fixar nitrogênio; c) tolerância ao sombreamento (ANDRADE; VALETIM, 1999); d) diversificação do ecossistema reduzindo a ocorrência de pragas e doenças; e) proteção do solo, evitando a erosão e lixiviação; f) alto valor nutritivo; g) maior resistência à seca, proporcionando uma distribuição mais adequada em qualidade e quantidade durante o ano todo; h) associação estável com as gramíneas; e, i) apresentam boa reserva de sementes enterradas (BARCELLOS et al., 2001.; PEREIRA, 2001.; 2002.; VALETIM; ANDRADE, 2004). Além disso, por ser uma espécie estolonífera e apresentar seus pontos de crescimento fora do alcance dos animais, tolera o pisoteio e a desfolhação, tornando-o resistente ao pastejo (CRUZ et al., 1994). Conforme Valentim e Andrade (2004), essas dentre outras vantagens tem tornado essa leguminosa herbácea tropical, a espécie com o maior número de atributos favoráveis relacionados à persistência sob pastejo.

2.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DO AMENDOIM FORRAGEIRO

O conhecimento do sistema de reprodução de uma espécie é importante para a conservação do germoplasma, o manejo em cultivo e para o melhoramento genético, pois permite definir estratégias de seleção com base em cruzamentos intra e interpopulacionais (DANNER et al., 2011).

Apesar de existirem plantas de fácil hibridação, há espécies em que é difícil realizá-la, devido a barreiras reprodutivas, constituindo em sério problema ao melhoramento genético. Portanto, o mecanismo reprodutivo da espécie deve ser o primeiro fator a ser considerado, quando se objetiva sua conservação e seu melhoramento (FONSECA, 2010). Para garantir o sucesso de hibridações em espécies que naturalmente apresentam dificuldades reprodutivas é preciso conhecer as condições necessárias para maximizar as taxas de cruzamentos entre as plantas (DANNER et al., 2011).

O amendoim forrageiro é considerado uma espécie preferencialmente autógama (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; BERTOZO, 1997). A autopolinização em *Arachis pintoi* é favorecida, pois a flor é hermafrodita e possui uma quilha que protege o estigma e o estilete (Figura 2). Dessa forma, apresenta baixa porcentagem de cruzamentos naturais, podendo apresentar polinização cruzada por ação de diversos insetos (SANTOS; GODOY, 1999; SIMPSON et al., 1994).

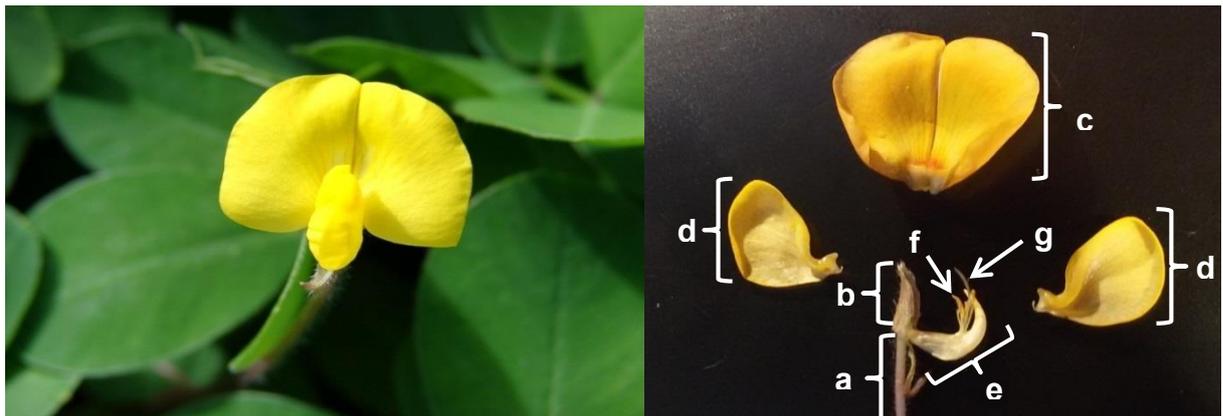


Figura 2 - Estrutura floral de *Arachis pintoi*. a) hipanto; b) sépala; c) estandarte; d) asas; e) quilha f) estames g) estigma e estilete.

O *Arachis pintoi* apresenta florescimento indeterminado e contínuo que tem início entre 14 e 55 dias após o plantio. Suas flores se formam nas axilas das folhas e crescem a partir dos nós reprodutivos em inflorescências, das quais normalmente apenas uma flor se abre, nas primeiras horas do dia (SIMPSON et al., 1994).

2.2.1 Morfologia do grão de pólen e desenvolvimento da semente

Conforme Borém e Vieira (2005), o pólen é definido como um micrósporo produzido nas anteras ou ainda, uma célula reprodutiva masculina que contém metade do número de cromossomos da espécie capaz de fertilizar a oosfera, dando origem ao zigoto. As anteras são expansões do estame, constituídas de duas tecas, cada uma com dois sacos polínicos (microsporângios), onde os grãos de pólen são produzidos (MARCO FILHO, 2005).

Os grãos de pólen maduros são revestidos por uma camada fina de celulose, a intina, e por fora desta há outra camada, a exina, composta principalmente por esporopolenina. Essa substância garante grande resistência ao pólen durante seu movimento dos estames para o pistilo (BELTRATI, 1994).

Durante a antese o pólen cai sobre o estigma, onde germina. A germinação do grão de pólen nada mais é do que o desenvolvimento do tubo polínico, ou seja, é um prolongamento celular do grão de pólen formado após a germinação, no estigma da flor. A função do tubo polínico é transmitir os gametas do pólen até o ovário, permitindo que isso ocorra a longas distâncias (CRESTI et al., 1992). Após a germinação dos pólenes, os tubos polínicos descem rapidamente ao longo do pistilo e emergem através de aberturas na parede do grão de pólen onde a exina encontra-se delgada ou ausente (BELTRATI, 1994), fertilizando os óvulos. Com isso, o hipânquio e a flor murcham. Cerca de 12 horas após a polinização, ocorre a fertilização. Em seguida, o embrião jovem passa por mais quatro ou cinco divisões, ficando, então, em estado latente e posteriormente ocorre o crescimento do “peg” (ASSIS, 2011). O Peg é uma estrutura peculiar do gênero, também denominado *paxillum* no latim, *clavo* em espanhol e garfo em português. Peg é uma estrutura de alongação do ovário que sustenta o gineceu (PELEGRIN et al., 2013) e se desenvolve a partir da expansão do meristema intercalar localizado na base do ovário, após a fecundação (SMITH, 1950; CONAGIN, 1959). O crescimento do “peg” é determinado geneticamente e por fatores ambientais, podendo se alongar verticalmente ou em ângulo (Figura 3), variando entre as espécies de *Arachis* (SIMPSON et al., 1994; ASSIS et al., 2008).

De acordo com Santos et al. (1997), o *A. pintoii* é uma espécie geocárpica, pois se alonga em direção ao solo por geotropismo positivo, com desenvolvimento de frutos e sementes subterrâneos a partir de flores localizadas na parte aérea,

dificultando o estudo fenológico da fase reprodutiva já que seus frutos permanecem enterrados (Figura 3).



Figura 3 - Estrutura do “peg” e do geotropismo em *Arachis pintoi*. UFAC, Rio Branco, AC. 2015

2.2.2 Técnicas utilizadas em estudo de biologia reprodutiva de *Arachis*

Diversas técnicas têm sido empregadas, no sentido de estudar a biologia reprodutiva de várias espécies, principalmente com relação à viabilidade polínica, receptividade do estigma e armazenamento do pólen (DANTAS et al., 2005; FERREIRA et al., 2006; EINHARDT et al., 2006; FONSECA et al., 2010).

De acordo com Oliveira (2009), pesquisas relacionadas à viabilidade dos grãos de pólen são de suma importância para os trabalhos de melhoramento genético, podendo também serem utilizadas no diagnóstico de fatores envolvidos na formação de embriões. Os programas de melhoramento genético vegetal visam à obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no germoplasma de determinada espécie, e dentre os fatores responsáveis pelo sucesso desses programas, destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos cuja eficácia depende, diretamente, da viabilidade do pólen (TECHIO et al., 2006).

A análise da viabilidade polínica é considerada útil na condução de experimentos nas áreas agrícolas e biotecnológica, pois permite correlacionar anormalidades meióticas à infertilidade do pólen, auxiliar na seleção de materiais genéticos e direcionamento entre cruzamentos (TECHIO, 2002).

Segundo Souza et al. (2002), a viabilidade e a germinabilidade polínica constituem-se em fatores importantes para o melhoramento de plantas. A viabilidade

refere-se à fertilidade masculina, considerada como indicativo da capacidade do grão de pólen realizar sua função de liberar as células espermáticas no saco embrionário, permitindo que ocorra a fertilização (SHIVANNA et al., 1991), podendo ser determinada por meio de várias metodologias, entre elas a coloração (OLIVEIRA et al., 2001; GUERRA; SOUZA, 2002). A germinabilidade se refere à capacidade que o pólen tem de emitir tubo polínico. Apesar de o pólen ser viável, não necessariamente indica que ele irá emitir seu tubo polínico. A capacidade de germinação do pólen pode interferir na taxa de frutificação (MONDAL; GHANTA, 2012). Assim, qualquer falha na germinação do grão de pólen e na fertilização do óvulo, resultará em um evento mal sucedido de polinização (DAFNI, 1992).

As informações sobre a viabilidade polínica de uma espécie, além de evidenciar sua potencialidade reprodutora masculina, contribui em estudos taxonômicos, fornece subsídios à conservação genética e ao planejamento de programas de melhoramento (ALEXANDER, 1969; ARROYO, 1981; GUINET, 1989).

A viabilidade tende a diminuir com o passar do tempo, sendo que os fatores ambientais podem estar associados a essa perda (FIGUEIREDO, 2013). Normalmente essa redução da viabilidade em diferentes espécies tem sido relacionada à perda de água e a manutenção do estado de desidratação em condições naturais e de laboratório (LINSKENS; CRESTI, 1988; NEPI; PACINI, 1993). Quando as aberturas das anteras coincidem com a alta umidade, a alta pressão osmótica do conteúdo celular do pólen aliada a baixa resistência de sua parede celular diminui a viabilidade polínica (SOUSA, 1994).

A temperatura também exerce uma grande influência sobre a viabilidade polínica e seus efeitos na reprodução das plantas afetam tanto os órgãos masculinos como os femininos e, no entanto, os pólenes são mais sensíveis a estresse ambiental que os óvulos (PRASAD et al., 2011). Alteração moderada da temperatura pode reduzir o número de pólenes e sua viabilidade podendo gerar problemas durante a fertilização. Em casos mais graves, pode resultar na completa esterilidade do grão de pólen e, ou inibição da deiscência das anteras e, conseqüentemente, nenhuma frutificação. Na fase de pós-polinização, a temperatura pode reduzir a fecundidade e afetar o crescimento do tubo polínico (HEDHLY, 2011).

Conforme Shivanna e Rangaswamy (1992), o período de florescimento, as alterações climáticas e o genótipo podem contribuir para que ocorra uma variação na viabilidade do pólen entre indivíduos de uma mesma espécie. A viabilidade

polínica também é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da flor e pelas condições de armazenamento (STANLEY; LINSKENS, 1974). De acordo com esses mesmos autores, o estado nutricional da planta fornecedora do pólen é, também um fator a ser considerado em relação a viabilidade polínica, já que a nutrição mineral da planta durante o desenvolvimento do pólen pode afetar sua longevidade.

Informações sobre viabilidade e desenvolvimento de grãos de pólen de *Arachis pinto* são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permitem obter maior sucesso nos cruzamentos controlados que tem como objetivo gerar novos híbridos com características de interesse agrônomo.

A viabilidade polínica pode ser determinada por diferentes técnicas as quais podem ser agrupadas em métodos diretos, como a germinação de pólen *in vitro* (DUTRA et al., 2000; GOMES et al., 2003; PIO et al., 2007) ou *in vivo*, pela observação do crescimento do tubo polínico sobre o estigma e o pistilo, e formação de sementes após a polinização (GALLETA, 1983; OLIVEIRA et al., 2001; FERREIRA et al., 2006) ou métodos indiretos baseados em técnicas colorimétricas (SHIVANANA; JOHRI, 1985; SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; KEARNS; INOUE, 1993).

Uma das técnicas utilizadas para testar a viabilidade polínica das espécies, considerando a função do pólen no ciclo de vida de uma planta é a realização da polinização e observação da frutificação. No entanto, devido ao tempo que essa atividade leva, outros métodos são, frequentemente, usados (KARAKAYA, 2011).

A germinação de pólen *in vitro* é o método mais utilizado em programas de melhoramento genético para avaliar a viabilidade do pólen, já que simula as condições naturais do estigma, visto que nestas condições, o estilete supre o grão de pólen com água, açúcares e aminoácidos, induzindo o crescimento do tubo polínico (MARCELLÁN; CAMADRO, 1996). O método da germinação *in vitro* é baseado na determinação da capacidade do grão de pólen desenvolver o tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). Este teste é considerado um dos mais seguros, pois parte-se do pressuposto de que o pólen é capaz de desenvolver o tubo polínico e fertilizar o óvulo (DAFNI, 1992). De acordo com Silva (1996), a emissão, formação e alongamento do tubo polínico permitem verificar a fertilidade do pólen. Com este método é possível verificar a viabilidade do pólen fresco ou armazenado fornecendo informações básicas sobre a reprodução sexual (JAYAPRAKASH; SARLA, 2001).

O sucesso da germinação *in vitro* depende de vários fatores como temperatura, umidade, período de incubação e da concentração de micro e macronutrientes no

meio de cultura (TAYLOR; HEPLER, 1997). Dentre as vantagens da germinação *in vitro*, destaca-se a rapidez e a confiabilidade, quando comparada a outros testes como a viabilidade polínica por meio de corantes, embora esta esteja diretamente relacionada com o sucesso da fertilização e produção de sementes. Resultados de pesquisa mostram que as porcentagens de germinação e de viabilidade do pólen estão em concordância (BOLAT; PIRLAK, 1999).

Os grãos de pólen de algumas espécies podem germinar apenas em água (GUDADHE; FHORAN, 2012). No entanto, conforme Galleta (1983), dependendo da espécie, para uma germinação bem sucedida, é necessário a combinação de diversos constituintes, pois as necessidades nutricionais variam conforme a espécie estudada. Vários estudos têm sido realizados a fim de determinar, qualitativa e quantitativamente, os componentes necessários para a melhor composição do meio de cultura para a germinação dos grãos de pólen.

O açúcar e o ácido bórico são os principais constituintes do meio de cultura para germinação *in vitro* (MIRANDA; CLEMENT, 1990). A função do açúcar na germinação do pólen é promover o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, além de fornecer energia para o desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY; LINSKENS, 1974). O boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade destes se romperem através da interação com o açúcar, formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (PFAHLER, 1967). Vários trabalhos realizados em diferentes culturas têm mostrado que a adição de boro ao meio tem melhorado a germinação dos grãos de pólen (MARTINS, 2014). Portanto, a taxa de germinação do pólen *in vitro* depende, dentre outros fatores, da determinação de um meio ótimo, que deve ser considerado como critério para viabilidade.

Para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen em *Arachis*, a aplicação de corantes, tais como: cloreto de trifeniltetrazólio - TTC, lugol e Baker (DAFNI, 1992), carmin acético (KEARNS; INOUYE, 1993), difeniltetrazólio – MTT (KHATUN; FLOWERS, 1995; NORTON, 1966), Sudan IV (BAKER; BAKER, 1979) e Alexander (ALEXANDER, 1980) tem sido utilizada. Estes corantes reagem com componentes celulares presentes no pólen maduro resultando na mudança de sua cor.

Os testes colorimétricos são métodos rápidos, baratos e seguros para testar a viabilidade de pólen. Além disso, esses auxiliam na análise dos fatores ambientais que afetam o desenvolvimento polínico, na identificação de possível macho-

esterilidade. Também auxiliam no restabelecimento de linhagens e na determinação do período ótimo da polinização de uma espécie (ADHIKARI; CAMPBELL, 1998). Entretanto, de acordo com Galleta (1983), esse método superestima a viabilidade do pólen, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença suficiente de enzimas, amido, ou outras substâncias. Por isso, é importante testar vários corantes, para encontrar o que se aproxime mais dos valores reais.

Os corantes são muito utilizados quando se deseja fazer uma avaliação rápida, pois reagem facilmente com constituintes celulares presentes no pólen maduro (PAGLIARINI; POZZOBON, 2005), enquanto que outros métodos são mais demorados. Apesar dos testes colorimétricos serem práticos, eles não fornecem informações sobre a capacidade germinativa do pólen, por isso é importante sua utilização ser acompanhada da germinação *in vitro*, pois esta se correlaciona diretamente com a habilidade de fertilização.

Na literatura, não há a descrição de um teste de viabilidade universal para todas as espécies, entretanto, dentre os corantes mais utilizados em *Arachis* está o carmim acético (MENDES, 1994). De acordo com Rigamoto e Tyagi (2002), por meio desta técnica são considerados viáveis os grãos de pólen que apresentam coloração avermelhada e inviáveis os de coloração amarronzada.

O teste colorimétrico com trifeniltetrazólio (TTC) evidencia a atividade de enzimas desidrogenases envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. Quando esta enzima está ativa o TTC reage com o hidrogênio produzido pela respiração celular e o pólen adquire a coloração vermelha (HOEKSTRA; BRUINSMA, 1975). Estas enzimas, quando ativas nos tecidos vivos e em contato com a solução salina de 2,3,5 - trifenil cloreto de tetrazólio, reduzem essa solução, resultando num composto chamado formazan, de coloração vermelha carmim. Tecidos mortos apresentam-se descolorados. Com isso, a atividade da enzima do grão de pólen é associada à sua capacidade de germinação (DERIN; ETI, 1999).

O difeniltetrazólio e o Baker também evidenciam a presença da enzima desidrogenase, quando esta enzima está ativa nos pólenes, e em contato com o corante, os pólenes adquirem a coloração roxa.

Corantes como lugol e Sudan IV também são utilizados em estudos de viabilidade polínica (SOUZA et al., 2002; HUANG et al., 2004). Conforme Johansen (1940), estes corantes indicam a presença de amido e lipídios, respectivamente. Com ambos os corantes, os grãos de pólen viáveis adquirem uma coloração marrom. De

acordo com Pagliarini e Pozzobon (2004), a coloração com lugol é resultado de uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido, dando aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e aos inviáveis amarela-clara, devido à ausência de amido. Este corante é indicado para espécies cujo material de reserva do grão de pólen é o amido.

O corante Alexander reflete a integridade das membranas celulares e a presença ou não do núcleo. Devido à presença de seus constituintes permite diferenciar os pólenes viáveis, pela coloração verde da exine e rosa da parede celular devido a ação da fuccina ácida dos pólenes inviáveis, os quais colorem de verde em função da ação do verde malaquita (ALEXANDER, 1980). No entanto, estas substâncias podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000). Nenhum método de viabilidade é completamente satisfatório, pois os corantes reagem com os constituintes químicos podendo não refletir a viabilidade do grão de pólen (STANLEY; LINSKENS 1974). Portanto, qualquer que seja o teste de viabilidade polínico empregado, o mesmo deve avaliar com precisão a potencialidade do grão de pólen recém-colhido ou armazenado.

De acordo com Wang (1975), o armazenamento do grão de pólen permite conservar o material para futura utilização, sob condições ótimas, de forma que mantenha seu poder germinativo, vigor e integridade genética originais.

O armazenamento de pólenes pode ser feito a curto e a longo prazo. Segundo Sousa (1998), o armazenamento a curto prazo visa estudos de genética e melhoramento, e a longo, para a conservação genética. No melhoramento genético, grãos de pólenes são armazenados por vários motivos: devido a não coincidência de florações, facilitar o intercâmbio com outros países ou outras regiões do país, potencializar programas de melhoramento ou apenas conservação do germoplasma (GOMES et al., 2003; EINHARDT, 2006; FERES, 2009).

Em plantas que apresentam épocas de floração diferentes, ter o pólen armazenado, dispensa a necessidade de cultivos alternados de linhagem polinizadora em campo (SOUZA et al., 2002; SOUSA et al., 2010). Além disso, transportar pólenes é mais fácil que transportar plantas vivas. Assim, o armazenamento de pólenes soluciona dois dos maiores problemas da polinização manual, que são tempo e o espaço, permitindo realizar cruzamentos em diferentes localidades (BISSIRI; NIKEJAD, 1976).

Geralmente é necessário armazenar o pólen colhido em um ano, para se utilizar no ano seguinte. No entanto, a viabilidade do pólen pode variar entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo, a exemplo de algumas gramíneas que podem apresentar viabilidade de minutos ou horas, enquanto que grãos de pólen de outras espécies podem permanecer viáveis por vários anos se armazenados adequadamente (BUENO; CAVALCANTE, 2002),

Dentre os fatores que afetam o período de viabilidade do grão de pólen, durante o armazenamento, estão às variações de umidade e temperatura e as embalagens de armazenamento (GOMES et al., 2003). Assim, torna-se importante conhecer esse período, especialmente para utilizá-lo em programas de hibridação, pois fornece informações básicas à conservação genética.

Para assegurar o sucesso em hibridações controladas, é necessário que o pólen a ser utilizado tenha boa viabilidade, por isso deve-se avaliar essa viabilidade com testes antes, durante e depois do armazenamento. Dessa forma, é possível estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008).

A maioria das técnicas empregadas no armazenamento de pólen envolve a redução do teor de água e manutenção dos pólenes a baixas temperaturas, de modo que as oscilações sejam evitadas. Na maioria das espécies, temperatura e umidade relativa baixas favorecem a viabilidade e a longevidade do pólen. Com a redução de ambas a viabilidade dos grãos de pólen tende a aumentar (PICKERT, 1988; GOMES et al., 2003, FONSECA, 2010). Para tanto, devem ser desenvolvidas metodologias para essas técnicas, a fim de possibilitar um maior período de armazenamento, já que cada espécie se porta diferentemente frente aos referidos processos, o que pode comprometer a viabilidade do pólen (SOUSA et al., 2010).

Segundo Sousa (1988), o teor elevado de água do pólen, normalmente esta relacionado negativamente à longevidade, portanto, é um fator a ser considerado durante o armazenamento. Vários métodos têm sido empregados na redução do teor de água dos grãos de pólen. Dentre estes métodos está a utilização de sílica gel (VEIGA et al., 2012). Porém, a desidratação de pólenes deve ser feita de tal forma a manter um equilíbrio entre a umidade do ar e a umidade contida no grão de pólen.

O emprego de baixas temperaturas, normalmente está relacionado a redução do metabolismo do pólen, o que proporciona maior longevidade. Pode se conseguir redução de temperatura por meio de refrigeradores e freezer que são de fácil

acesso. Portanto, técnicas de coleta, secagem, armazenamento e testes de viabilidade são necessários para garantir o sucesso no armazenamento do pólen, a médio e longo prazo. A coloração é uma técnica muito empregada para o monitoramento do pólen armazenado (OLIVEIRA et al., 2001).

Além de estudos de viabilidade e germinabilidade polínica, avaliar a receptividade do estigma é fundamental para auxiliar no melhoramento genético da espécie e no desenvolvimento de hibridizações controladas (OLIVEIRA et al., 2012), pois a partir desses conhecimentos é possível determinar o melhor período de deposição do pólen na flor. Segundo Silva et al. (2010) a receptividade do estigma é resultado da maturação do gameta feminino e pode influenciar na taxa de fecundação e no sucesso da polinização. A receptividade do estigma pode ser um fator decisivo no desenvolvimento de hibridizações controladas, garantindo dessa maneira maior probabilidade de produção de sementes em um cruzamento (OLIVEIRA, 2012).

Fatores como a presença de exsudados, a idade da flor e o horário do dia podem influenciar na receptividade dos estigmas. Normalmente, quando o estigma está receptivo, ocorre a produção de substâncias viscosas que facilitam a aderência do pólen no mesmo, garantindo a fertilização (SOUZA et al, 2002). A receptividade do estigma pode variar de poucas horas a dias, dependendo da espécie (MOURA, 2012).

Existem numerosas técnicas para estimar a receptividade do estigma (DAFNI, 1992; KEARNS; INOUE, 1993, MAUÉS, 1998). A maioria delas são baseadas na verificação da presença da enzima peroxidase, detectada principalmente através do uso de peróxido de hidrogênio (OSBORN et al., 1998). O peróxido de hidrogênio é bastante utilizado para detecção da ação da peroxidase em estigmas por ser um método simples e barato (MAUÉS; COUTURIER 2002). Por este método, a ação da peroxidase é verificada por meio da formação de bolhas de ar sobre o estigma (OSBORN et al., 1998).

O corante Baker utilizado na coloração de pólenes (DAFNI, 1992) e a solução de peroxtesmo (MOTTEN, 1982; SULLIVAN, 1984) também têm sido empregados na determinação de receptividade de estigmas (DAFNI; MAUÉS, 1998). O peroxtesmo também indica a presença da enzima peroxidase, sendo este um método confiável na avaliação da receptividade de estigma. Dentre as vantagens desse método está a simplicidade nos procedimentos e aplicações, obtenção de resultados imediatos e precisos, indicação exata das áreas receptivas e pode ser utilizado tanto para estigmas

secos como molhados (DAFNI, MAUÉS, 1998). O corante Baker apesar de ser um método indicado para a maioria das espécies, requer cerca de 40 minutos para que ocorra a reação (DAFNI, 1992).

O conhecimento do melhor momento de coleta do pólen para a obtenção de maior viabilidade polínica, aliados ao horário de maior receptividade dos estigmas, e, portanto, aptidão à fertilização, é fundamental na produção de sementes híbridas, particularmente em espécies onde há a possibilidade de hibridação artificial, (NASCIMENTO et al., 2003). Quando se sabe o período em que o estigma está receptivo é possível programar o processo de polinização, reduzindo o tempo e a quantidade de pólen utilizado, pois devido à falta de informações sobre o período exato de receptividade do estigma, as polinizações são feitas repetidas vezes, para assegurar a produção de sementes (HODGSON, 1976).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre (Embrapa Acre), localizada em Rio Branco, Acre (9°58'29" S e 67°48'36" W.Gr), no período de outubro/2013 a dezembro/2014.

No município de Rio Branco o clima é caracterizado como quente e úmido. A temperatura média anual da região é de 24,5 °C, com umidade relativa do ar de 80 - 90%, precipitação média anual de 2300 mm (período chuvoso de outubro a abril e déficit hídrico nos meses de junho a setembro) e fotoperíodo constante (ACRE, 2006).

Neste trabalho, foram utilizados genótipos de *Arachis pinto* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* (BAG) da Embrapa Acre. A metodologia foi desenvolvida com *A. pinto* cv. BRS 'Mandobi' e testada em 8 genótipos: Alqueire-1, Ap7, Ap8, Ap55, Ap56, Ap57, Ar67 e Ap90.

3.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE PÓLENS

Para a avaliação da germinação *in vitro* dos grãos de pólen, às 8h30 cerca de 50 flores do *Arachis pinto* cv. BRS 'Mandobi' do BAG foram coletadas e armazenadas em Bequer contendo água, para evitar o ressecamento das anteras (Figura 4A). No laboratório de morfogênese e Biologia molecular, as anteras foram abertas sob lâminas de vidro para a liberação do pólen e observadas com auxílio de uma lupa (Figuras 4B, 4C e 4D).



Figura 4 - Esquema de extração dos pólenes das anteras de flores de *A. pinto* BRS 'Mandobi': A - coleta das flores; B - extração das anteras, C - anteras e D - pólenes liberados sob lâmina. UFAC, Rio Branco, AC, 2015

3.1.1 Efeito da sacarose e do ácido bórico na germinação *in vitro* de pólen

Neste experimento, foram utilizados sais do meio de Niles e Quesenberry (1992), com modificações, composto de 300 mg.L⁻¹ de Ca (NO₃)₄.H₂O (nitrato de cálcio), 200 mg.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O (sulfato de magnésio heptahidratado), 100 mg.L⁻¹ de KNO₃ (nitrato de potássio) suplementado com diferentes concentrações de H₃BO₃ (ácido bórico): 0, 25, 50, 75 e 100 mg.L⁻¹ e de C₁₂H₂₂O₁₁ (sacarose): 0; 100; 200; 300 e 400 g.L⁻¹.

Uma alíquota de 2 mL de meio de cultura foi depositada sobre lâmina de vidro, sendo a mesma transferida para uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido. Posteriormente, pré-incubada em câmara B.O.D a 30 °C por 15 minutos, antes da inoculação do pólen. Em seguida, o pólen previamente isolado, foi depositado sobre o meio com auxílio de um pincel. Posteriormente, as placas, contendo os pólenes, foram transferidas para a B.O.D a 27 °C sob ausência de luz, onde permaneceram por duas horas.

Após o período de incubação, foi colocada uma lamínula sobre a cultura de pólen e, sob microscópio, em objetiva com aumento de 20x, contabilizado o número de pólenes germinados. Cada campo de observação formado por 100 pólenes constituiu uma repetição, totalizando 1000 grãos de pólen por tratamento. A germinação foi considerada quando o tubo polínico alcançou comprimento igual ou maior ao diâmetro do pólen (FONSECA, 2010).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 x 5), sendo cinco concentrações de ácido bórico e cinco de sacarose, com 10 repetições. Esse percentual foi estimado pela relação entre o número de grãos de pólen germinados e pelo total de grãos de pólen contados no campo de observação.

Para a verificação dos efeitos da sacarose e do ácido bórico foi aplicada a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Para a porcentagem de germinação *in vitro* obtida de acordo com as diferentes composições do meio de cultura e temperaturas de incubação foi aplicada a análise da regressão. As análises foram realizadas pelo Programa Computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados foram transformados para $\sqrt{x + 1}$.

3.1.2 Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de pólenes

Estabelecida a composição do meio de cultura, foi testado o efeito das temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C sobre a germinação de pólenes, durante a incubação em câmara de crescimento do tipo B.O.D. O meio de cultura, contendo os pólenes, foi mantido por duas horas no escuro nestas temperaturas e, após este período, foi contabilizada a germinação com auxílio de um microscópio.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, para avaliar os efeitos das temperaturas de incubação da cultura contendo os pólenes, com quatro tratamentos e 10 repetições. Cada repetição foi composta da média de pólenes germinados em campos contendo 100 pólenes.

Para a verificação dos efeitos da sacarose e do ácido bórico, foi aplicada a ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados foram transformados para $\sqrt{x+1}$.

Nos experimentos em que foi avaliada a composição do meio de cultura e a temperatura de incubação foi aplicada a análise da regressão.

As análises foram realizadas com auxílio do Programa Computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.2 VIABILIDADE DO PÓLEN ATRAVÉS DE MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Neste experimento, foi avaliada a eficiência de corantes em determinar a viabilidade do pólen por meio da aproximação com os índices de germinação *in vitro* obtidos com a utilização do meio selecionado no item 3.1.

Os corantes utilizados foram carmim acético 1% glicerinado 1:1 (RESSLAR; GREGORY, 1979), brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio - MTT (KHATUM; FLOWERS, 1995; NORTON, 1966), solução de Alexander (ALEXANDER, 1969), 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio - TTC (DAFNI, 1992), Sudan IV (BAKER; BAKER, 1979), solução de Baker e lugol (DAFNI, 1992).

Sob as lâminas contendo pólenes, foi depositada uma gota de corante e o conjunto fechado com uma lamínula e posteriormente visualizada em microscópio.

Os pólenes em TTC foram acondicionados em temperatura ambiente por cerca de duas horas antes de serem visualizados em microscópio, conforme Munhoz et al. (2008). Já aqueles em solução Alexander foram mantidos em BOD, no escuro, por 24 horas, a 50 °C.

O padrão de coloração e o número de pólenes corados foram verificados, com auxílio de microscópio estereoscópico, em objetiva com aumento de 20x. Em cada lâmina, foram realizadas contagens de 100 pólenes, as quais constituíram a repetição. A porcentagem de pólen viável foi estimada pelo número de grãos corados, de tamanho grande ou médio e formato regular. O cálculo da porcentagem de viabilidade polínica foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade do pólen (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de grãos de pólen corados}}{\text{N}^\circ \text{ de grãos pólen total}} \times 100$$

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos (corantes) e 10 repetições. Foi realizada a análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Tukey (1949) ao nível de 5% de probabilidade e pelo teste de Dunnet (1964) para comparar a germinação *in vitro* (testemunha) com a viabilidade obtida com a utilização dos corantes.

3.3 RECEPTIVIDADE DE ESTIGMAS

Para as avaliações da receptividade dos estigmas foram utilizados os reagentes: peróxido de hidrogênio a 3% (KEARNS; INOUYE, 1993), peroxtesmo (MOTTEN, 1982; SULLIVAN, 1984) e a solução de Baker (DAFNI, 1992).

Os estigmas danificados ou com pólen na superfície não foram utilizados, a fim de se obter resultados confiáveis (DAFNI, 1992). Para a verificação da receptividade, os estigmas foram retirados das flores, observados com auxílio de uma lupa, e transferidos para placa de Petri para posterior contato com o reagente indicativo de receptividade. Em seguida, foram depositadas duas gotas de peróxido de hidrogênio (3%) sobre os estigmas (Figura 5A) e após um minuto, verificada a reação com a utilização de uma lupa. A formação de bolhas de ar sobre o estigma, considerada como atividade da enzima peroxidase, determinou a receptividade.

O peroxtesmo é composto por um conjunto de papeis que sofre modificação em sua cor, ao entrar em contato com determinadas enzimas. Dessa forma, no tratamento em que foi avaliada a receptividade dos estigmas utilizando este reagente, os estigmas foram retirados das flores, umedecidos com água destilada e colocados em contato com estes papeis. Os estigmas receptivos em contato com o peroxtesmo resultaram na coloração verde do papel (Figura 5B).

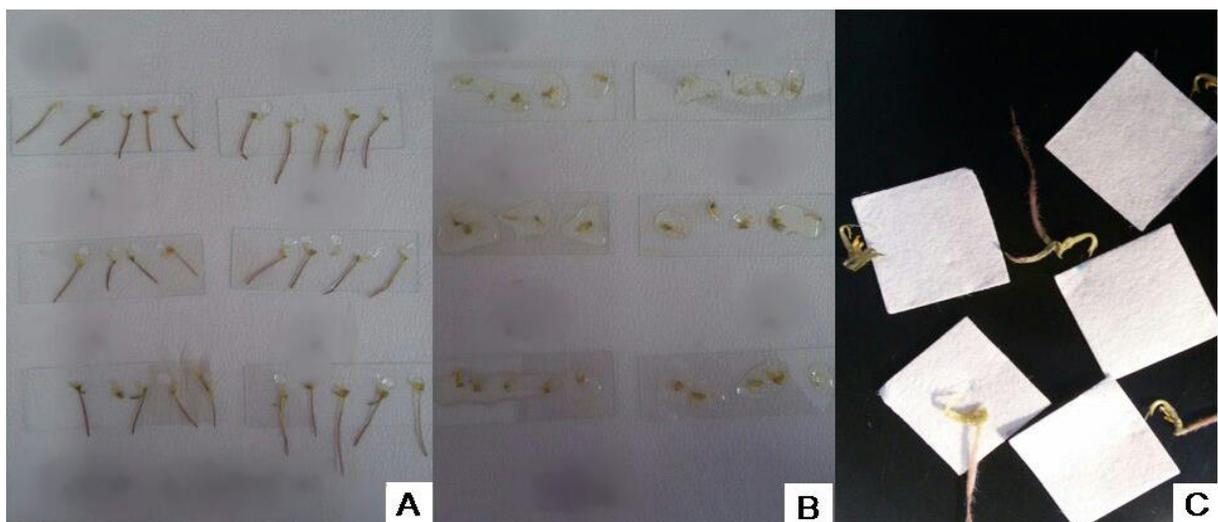


Figura 5 - Reagentes utilizados na avaliação da receptividade dos estigmas de flores de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi': A - Peróxido de hidrogênio, B - Baker e C - Peroxtesmo. UFAC, Rio Branco, AC, 2015

A avaliação da receptividade utilizando-se a solução de Baker foi feita semelhante aos ensaios realizados com a solução do peróxido de hidrogênio. Para tanto, os estigmas foram retirados das flores, observados com auxílio de uma lupa e sobre eles foi depositada uma gota da solução de Baker (Figura 5C) e após 40 minutos foi avaliado o padrão de coloração. O surgimento da coloração roxa foi indicativo de receptividade.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e 10 repetições. Cada repetição constituiu de uma lâmina contendo cinco estigmas. As médias foram agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 VIABILIDADE DOS GRÃOS DE PÓLEN E RECEPTIVIDADE DO ESTIGMA EM DIFERENTES HORÁRIOS DO DIA

Com base nos resultados dos experimentos 3.1, 3.2 e 3.3 a viabilidade do grão de pólen e a receptividade do estigma foram avaliadas em diferentes horários do dia: 6h30, 7h00, 7h30, 8h00, 8h30, 9h00, 9h30, 10h00 e 10h30. As coletas das flores para a verificação da receptividade dos estigmas e da viabilidade polínica foram realizadas nos dias 01/12/2014 e 18/08/2014, respectivamente. A metodologia utilizada neste experimento foram aquelas selecionadas nos ensaios anteriores.

O delineamento experimental utilizado para verificar a viabilidade em diferentes horários, foi o inteiramente casualizado com nove tratamentos (horários de coleta) e 10 repetições. Para a receptividade o delineamento foi inteiramente casualizado com nove tratamentos (horários de coleta) e seis repetições. As variações da receptividade do estigma e da viabilidade do pólen, ao longo do dia, foram demonstradas por análise de regressão.

A partir dos resultados obtidos neste experimento, a metodologia selecionada para avaliar a viabilidade e a germinabilidade ao longo do dia do pólen de amendoim forrageiro cv. BRS 'Mandobi' foi testada em oito genótipos de amendoim forrageiro pertencente ao BAG da Embrapa. As flores dos genótipos foram coletadas em dias distintos, conforme a disponibilidade destas na planta: cv. Ap8 (06/01/2014), Ar67 (03/12/2014), Ap55 (04/12/2014), Ap56 e Ap57 (08/12/2014), Ap90 (10/12/2014), Alqueire-1 e Ap7 (15/12/2014).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove tratamentos (horários de coleta) e 10 repetições. As variações da viabilidade e germinabilidade do pólen, ao longo do dia, foram demonstradas por análise de regressão.

3.5 MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DO GRÃO DE PÓLEN

Cerca de 120 anteras foram coletadas e acondicionadas em microtubulos com capacidade de 10 mL⁻¹, contendo uma camada de sílica gel para a retenção da umidade do meio e algodão para sustentar as anteras (Figura 6). Foram utilizados 80 microtubulos, contendo duas anteras em cada um. O mesmo foi repetido para o pólen fresco, sem sílica gel.

Quatro condições de armazenamento foram testadas: BOD (20 °C), geladeira (10 °C), freezer (-22 °C), e em temperatura ambiente (33 ±1°C). A temperatura ambiente foi monitorada por um termo higrômetro *data logger*, que registrou a temperatura do ar a cada 30 minutos durante cinco dias, na sala na qual os pólenes foram mantidos. Para cada condição foram utilizados 20 tubos de microtubulos. A viabilidade do pólen foi avaliada no dia da coleta (pólen fresco) e até os 70 dias após o armazenamento dos pólenes, com avaliações semanais (1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias). A viabilidade dos pólenes foi verificada por meio da germinação *in vitro* no meio de cultura definido nos ensaios anteriores.

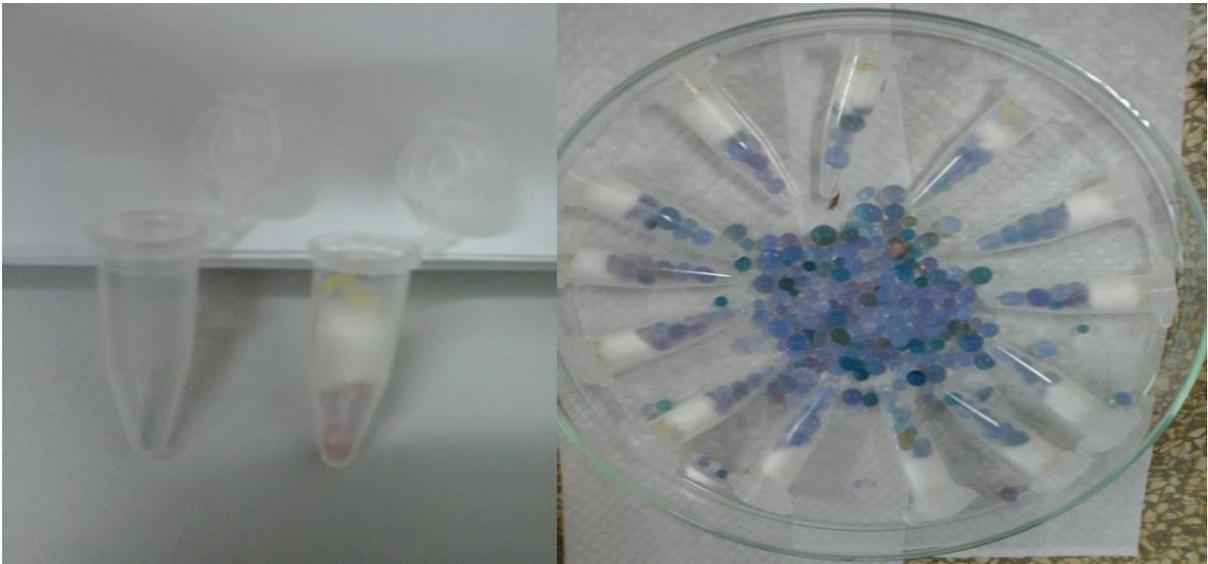


Figura 6 - Armazenamento de pólenes de *A. pintoi* cv. BRS 'Mandobi' em microtubulos contendo algodão e sílica gel. UFAC, Rio Branco, AC, 2015

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial com oito tratamentos (condição de armazenamento) x 10 semanas (tempo de armazenamento) e 10 repetições. A comparação de médias foi realizada por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi efetuada a análise de regressão para verificar o melhor período de armazenamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE PÓLENS

Neste experimento foram testados os efeitos da sacarose e ácido bórico e da temperatura, respectivamente, sobre a germinação *in vitro* de pólenes .

4.1.1 Efeito da sacarose e do ácido bórico na germinação *in vitro*

Foi observado que a interação da sacarose e do ácido bórico exerceu um efeito significativo sobre a germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Esses resultados confirmam a importância do ácido bórico combinado com a sacarose para a germinação dos pólenes do amendoim forrageiro. Segundo Pfahler (1967), o boro estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade deste se romper, uma vez que interage com o açúcar formando um complexo açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. De acordo com Almeida et al. (1987), a combinação do boro com a sacarose aumenta a eficiência desta última em promover a germinação e o crescimento do tubo polínico.

A porcentagem máxima de germinação foi obtida utilizando-se 25 mg.L⁻¹ de ácido bórico combinado com 200 g.L⁻¹ de sacarose suplementados ao meio Niles & Quesenberry (1992), resultando em 49,41% de germinação (Figura 7).

$$\begin{aligned}
 y_{\triangle} &= 1,08 + 0,0041x - 1E-05x^2 \quad R^2 = 47,60\% & y_{\blacksquare} &= 1,89 + 0,053x - 0,0001x^2 \quad R^2 = 76,56\% \\
 y_{\bullet} &= 1,89 + 0,053x - 0,0001x^2 \quad R^2 = 81,72\% & y_{\blacktriangle} &= 2,11 + 0,047x - 0,0001x^2 \quad R^2 = 69,67\% \\
 y_{\blacklozenge} &= 1,78 + 0,057x - 0,0002x^2 \quad R^2 = 73,91\%
 \end{aligned}$$

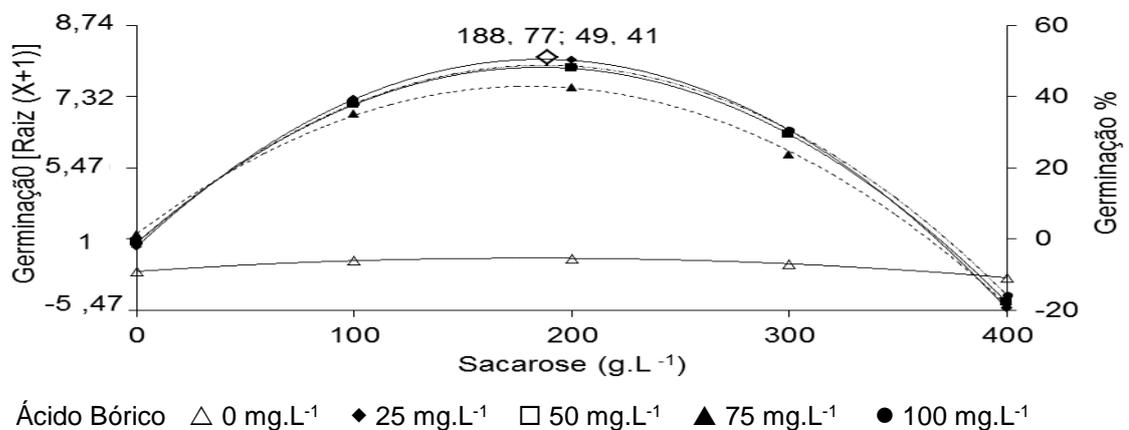


Figura 7 - Germinação *in vitro* de pólen de *Arachis pinto* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de sacarose e de ácido bórico. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância nos APÊNDICES C, E e F).

Custódio (2009) trabalhando com diferentes espécies de *Arachis*, observou taxas de germinação *in vitro* variando entre 41,70% (*A. helodes*) a 88,00% (*A. diogeni*), utilizando meio Niles e Quesenberry (1992), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de ácido bórico e 150 g.L⁻¹ de sacarose. Kakani et al. (2002) observaram taxas de germinação de pólen de genótipos de amendoim comum (*A. hypogea*), em meio Niles e Quesenberry (1992) contendo 100 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de ácido bórico a 2% ágar, variando de 35,7 a 76,3%. Apesar dos autores citados não terem trabalhado com *A. pintoi*, comparando os dados da literatura com os resultados do presente trabalho, pode-se considerar que a taxa de germinação *in vitro* do amendoim forrageiro é baixa. No entanto, conforme observações de Kakani et al. (2002) a germinação de pólen em *Arachis* pode ser uma resposta genótipo dependente. A baixa porcentagem de viabilidade polínica encontradas em híbridos sugere que as espécies cruzadas (*A. pintoi* X *A. repens*) apresentam-se distantes geneticamente, pois de acordo com Krapovickas e Gregory (1994), a viabilidade de pólen obtidos através de cruzamentos pode indicar similaridade ou distância genética.

Em plantas híbridas de outras espécies como *Capsicum* spp., também foi observada uma baixa porcentagem de germinação *in vitro* (35%), resultando em baixa ou ausência produção de frutos. Este problema pode estar diretamente relacionado a viabilidade gametofítica masculina, devido ao desenvolvimento anormal do gametófito, provocando assim, o aborto do pólen (MARTINS, 2014).

Na ausência da sacarose não houve germinação (Figura 8A), independente da concentração de ácido bórico utilizado. A necessidade de suplementação do meio, utilizado na germinação de pólen de *A. pintoi*, com sacarose confirma os resultados observados na literatura em que a sacarose é um dos principais fatores a estimular a germinação do pólen *in vitro* para a maioria das espécies.

Os meios sem a suplementação de ácido bórico em quaisquer das concentrações de sacarose testadas resultaram em baixas porcentagens de germinação (Figura 9). Além disso, na ausência de ácido bórico, os tubos polínicos apresentaram comprimento menor do que quando se utilizou este nutriente. Conforme Wang et al. (2003), a ausência de boro reduz a taxa de germinação conduzindo a inibição do crescimento do tubo polínico além de causar outras anormalidades com a ruptura da extremidade do tubo polínico.

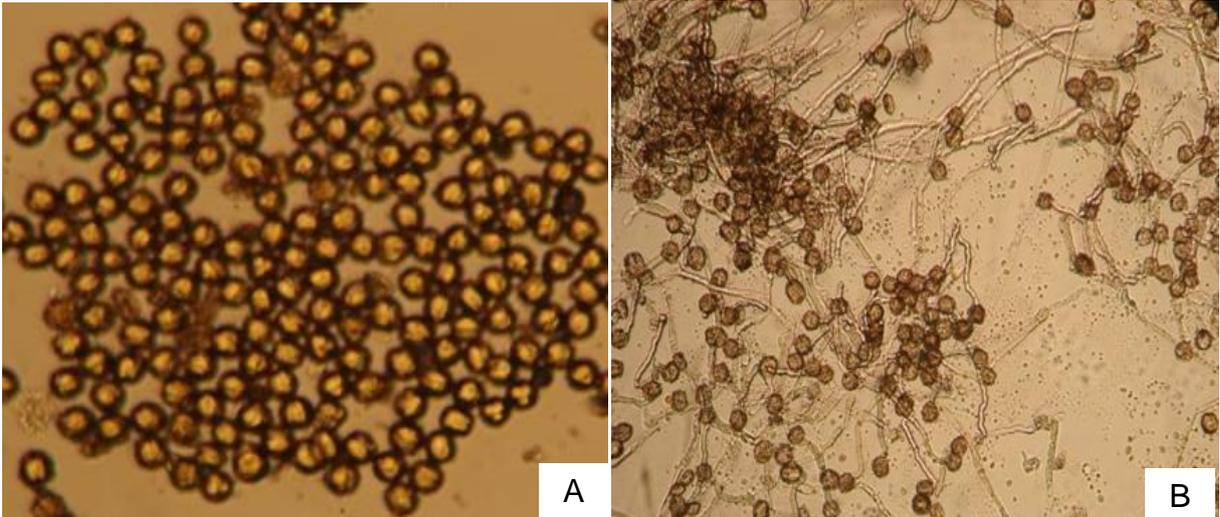


Figura 8 - Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi', em meio de Niles e Quesenberry suplementado com: A) 50 mg.L⁻¹ de ácido bórico sem adição de sacarose; e B) 25 mg.L⁻¹ de ácido bórico combinado com 200 g.L⁻¹ de sacarose. UFAC, Rio Branco, AC, 2015

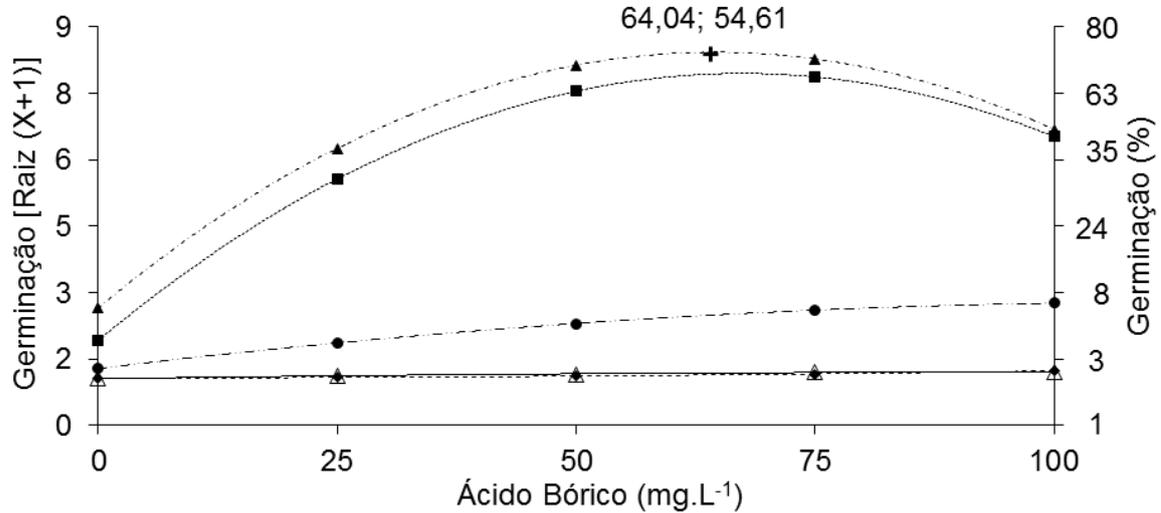
Considerando o efeito da sacarose isoladamente, observa-se que as concentrações que promoveram maior germinação foram em torno de 100 e 200 g.L⁻¹. Maiores porcentagens de germinação *in vitro* com o aumento das concentrações de sacarose podem ser justificadas pela maior oferta de energia na forma de carboidratos favorecendo o crescimento do tubo polínico (ZANBON, 2014). Nessas mesmas concentrações, os grãos de pólen apresentaram tubos polínicos maiores, facilitando a visualização (Figura 8B). Da Luz et al. (2008), avaliando a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cubiu (*Solanum sessiliflorum*) também observaram tubos polínicos maiores em meios suplementados com as mesmas concentrações de sacarose. Segundo Bou Daher (2011), devido ao fato de o pólen ser heterotrófico ele requer um suprimento de carboidratos para a síntese de parede celular e crescimento do tubo polínico, justificando desta forma a sua suplementação no meio de cultura para a germinação.

As concentrações de ácido bórico que promoveram maior germinabilidade dos pólenes foram 50 e 75 mg.L⁻¹. A dosagem ótima deste micronutriente foi em torno de 64,04 mg.L⁻¹, resultando em 54,61% de germinação *in vitro* (Figura 9).

$$y_{\blacklozenge} = 1,06 + 0,0002x - 0,00001x^2 \quad R^2 = 61,34\% \quad y_{\blacktriangle} = 2,65 + 0,18x - 0,001x^2 \quad R^2 = 75,60\%$$

$$y_{\blacksquare} = 1,91 + 0,18x - 0,001x^2 \quad R^2 = 85,23\% \quad y_{\bullet} = 1,28 + 0,026x - 0,0001x^2 \quad R^2 = 54,52\%$$

$$y_{\triangle} = 0,99 + 0,022x - 0,00056x^2 + 0,000004x^3 \quad R^2 = 86,13\%$$



Níveis de Sacarose ◆ 0 g.L⁻¹ ■ 100 g.L⁻¹ ▲ 200 g.L⁻¹ ● 300 g.L⁻¹ △ 400 g.L⁻¹

Figura 9 – Porcentagem de germinação *in vitro* de pólen de *A. pintoi* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido bórico e de sacarose. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância nos APÊNDICES C, D e G).

Em concentrações de ácido bórico superiores a 75 mg.L⁻¹ houve decréscimo na porcentagem de germinação. Segundo Dantas et al. (2005), uma possível explicação para a diminuição da porcentagem de germinação a medida em que se aumenta as concentrações de ácido bórico é que a integridade dos pólenes está relacionada com o equilíbrio osmótico do meio, que é determinada pelas concentrações de sacarose e de outras substâncias contidas, entre elas o ácido bórico. Dessa forma, o aumento do ácido bórico na solução promoveu o rompimento dos grãos de pólen afetando em sua viabilidade e taxa de germinação.

Danner et al. (2011) avaliando a viabilidade polínica em três espécies de jabuticabeira, observaram que o meio de cultura suplementado com ácido bórico foi mais eficiente, com 43% de germinação em média, em relação ao que não incluiu este elemento. Sousa et al. (2010), também fez as mesmas observações ao testar 200 mg.L⁻¹ de H₃BO₃ para a espécie *Syagrus romanzoffiana*. Chagas et al. (2009) avaliando o crescimento do tubo polínico em *Prunus persica* (L.), em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido bórico, constataram que o requerimento deste micronutriente para a ocorrência da germinação *in vitro*, varia de acordo com a espécie.

Observou-se o colapso de alguns pólenes no meio com 400 g. L⁻¹ de sacarose, o que provavelmente foi ocasionado pelo desequilíbrio osmótico causado pelo alto teor de sacarose. De acordo com Loguercio (2002), o pólen se rompe devido ao aumento da pressão osmótica e a baixa resistência da parede celular, o que resulta em rápido influxo de água para dentro do grão de pólen e perda de substâncias solúveis e de íons no citoplasma, que é conhecido como dano de embebição. Conforme Wolters-Artes (2002), esta desidratação da membrana faz com que ocorra a desorganização no metabolismo do pólen, baixando sua viabilidade. Além disso, nas concentrações 0 e 400 g.L⁻¹ de sacarose, os pólenes apresentaram-se pequenos e pouco nítidos, devido à semelhança com a cor do meio de cultura. Resultados similares foram apresentados por da Luz et al. (2008), avaliando a germinação *in vitro* de grãos de pólen de cubiu (*Solanum sessiliflorum Dunal*), em meios suplementados com 0 e 50 g. L⁻¹ de sacarose.

Conforme Soares et al. (2011), a baixa taxa de germinação e o pouco crescimento do tubo polínico podem ser atribuídos a diversos fatores, como o próprio meio de cultura ou a uma excessiva hidratação apresentada pelos grãos de pólen. Segundo Pio et al. (2004), além da composição do meio, a temperatura e a alta umidade podem ocasionar aumento na pressão osmótica e baixa resistência na parede celular, causando assim o rompimento ou eclosão dos grãos de pólen, impedindo-os de germinar.

Verifica-se que a germinação *in vitro* de pólen de *A. pintoii* cv. BRS 'Mandobi' é dependente das concentrações ideais de ácido bórico e sacarose no meio de cultivo, pois valores abaixo ou acima destas concentrações resultariam no efeito negativo desses micronutrientes sobre a germinação.

4.1.2 Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de pólen

Com relação às necessidades térmicas para germinação *in vitro* dos pólen, a temperatura que promoveu o melhor resultado foi a de 30 °C, sendo observados 49,44% de germinação (Figura 10). Este resultado corrobora com aqueles encontrados por Kakani et al. (2002), os quais verificaram que a temperatura média ótima para diferentes genótipos de amendoim comum (*Arachis hypogaea* L.) foi de 30,1 °C, resultando em uma germinação média de 56%.

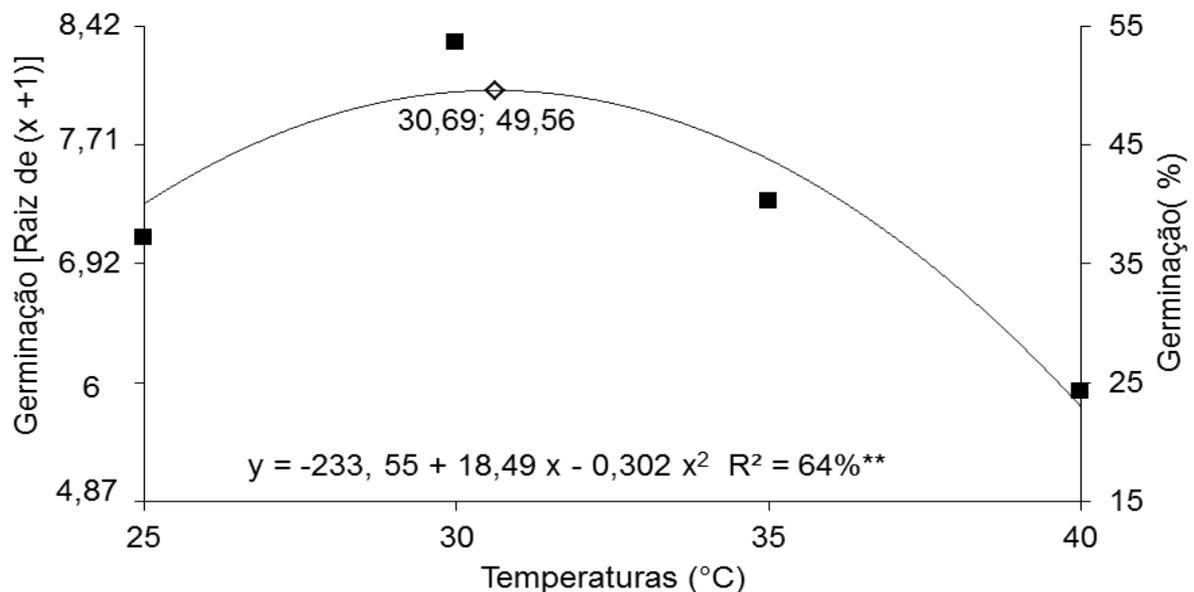


Figura 10 - Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Arachis pintoí* cv. BRS 'Mandobi', incubados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE B).

Em outras culturas também foi verificado a temperatura de 30 °C como a mais adequada para a germinação *in vitro* de pólen. Alcaraz et al. (2011), ao estudarem a influência da temperatura na germinação de grão de pólen em seis genótipos de abacate perceberam que a temperatura de 30 °C forneceu os melhores índices de germinação para a maioria dos genótipos estudados. Freitas (2013) ao avaliar o efeito da temperatura, variando de 10 a 40 °C, na germinação *in vitro* de pólen de dois genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.), observou que houve um crescimento gradativo do percentual da germinação *in vitro* até os 30 °C e após esta, os índices de germinação decresceram nos dois genótipos avaliados.

A germinação *in vitro* decresceu logo após a utilização de temperaturas superiores a 30 °C (30,69 °C). As menores porcentagens de germinação foram observadas quando se utilizou 40 °C (24,17%). De acordo com Oakes (1958) e de Beer (1963), temperaturas superiores a 33 °C reduzem a viabilidade do pólen e a germinação em amendoim comum. Além da baixa porcentagem de germinação, o crescimento do tubo polínico também foi afetado pela temperatura de incubação. Segundo Hedhly (2011), na fase de pós-polinização, a temperatura pode reduzir a fecundidade e afetar o crescimento do tubo polínico.

Nas temperaturas de 25 °C e 30 °C (Figuras 11A e 11B) foram observados tubos polínicos com maior alongamento, enquanto nas de 35 °C e 40 °C, os tubos polínicos apresentaram-se menores (Figuras 11C e 11D). Apesar da baixa porcentagem de germinação *in vitro*, a presença desses tubos polínicos mais alongados e vigorosos sugere que, pelo menos, ocorrerá moderada frutificação efetiva (SCORZA; SHERMAN, 1995). Resultados semelhantes foram descritos por Freitas (2013), avaliando o efeito da temperatura na germinação *in vitro* de pólenes de dois genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) e também por Martins (2014) trabalhando com espécies de pimentas (*Capsicum spp*). Estes autores verificaram que na temperatura de 30 °C houve maior alongamento do tubo polínico.

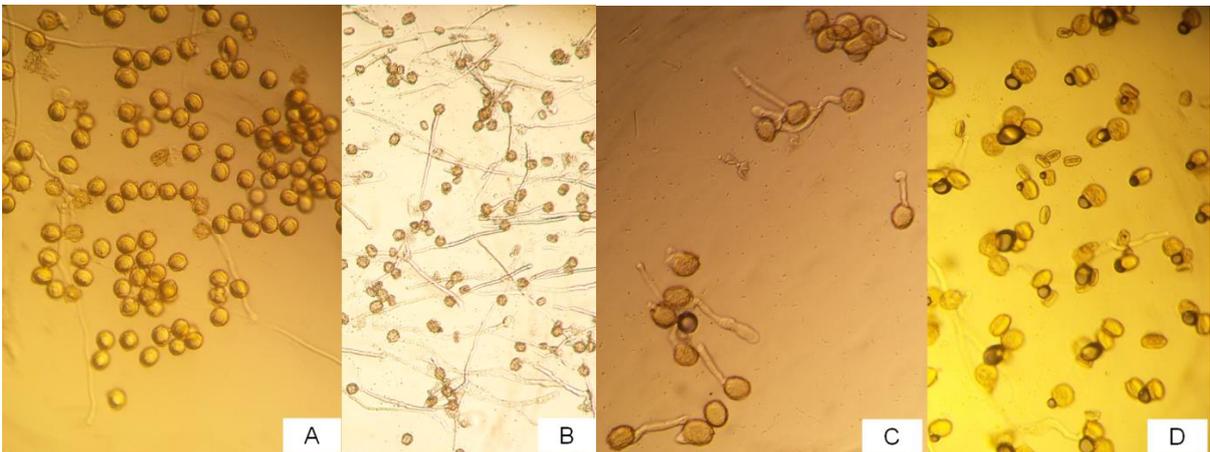


Figura 11 - Efeito da temperatura de incubação na germinação *in vitro* de grãos pólenes de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi'. A) 25 °C, B) 30 °C, C) 35 °C e D) 40 °C. UFAC, Rio Branco, AC, 2015

Observa-se que as temperaturas que proporcionaram menores porcentagens de germinação também promoveram menor crescimento dos tubos polínicos (Figura 11D). Trabalhos têm sido feitos demonstrando a estreita relação entre germinação e porcentagem de germinação *in vitro* (MARTINS, 2014).

De acordo com Freitas (2013), estresses causados por temperaturas altas ou baixas, podem ter um efeito maléfico em todas as fases de desenvolvimento da planta. A fase reprodutiva é uma das mais afetadas pela temperatura, pois seus efeitos comprometem tanto os órgãos masculinos como os femininos (HEDHLY et al., 2008). A parte masculina é a mais afetada, pois o grão de pólen é mais sensível ao estresse ambiental em comparação ao óvulo (KAKANI et al., 2005), principalmente quando submetido a altas temperaturas (ENDO et al., 2009). Isso se deve ao fato de que, uma vez liberado das anteras, os pólenes passam a atuar como unidades independentes ficando expostos ao ambiente.

Young et al. (2004), ao realizarem cruzamentos recíprocos em couza (*Brassica napus*), observaram que a frutificação foi reduzida em 88% quando as plantas doadoras de pólen foram submetidas a altas temperaturas, já para as receptoras a redução foi de apenas 37%. Esse resultado demonstra a maior suscetibilidade do pólen a altas temperaturas, em relação aos órgãos reprodutivos femininos.

Conforme Karni e Alone (2002), o desenvolvimento e a germinação do pólen dependem da captação e metabolismo de açúcar pelo mesmo. Com isso, trabalhos têm sido desenvolvidos para verificar como a temperatura interfere nesses processos e, conseqüentemente, nas porcentagens de germinação *in vitro* e frutificação (ALONI et al., 2001). Esses autores utilizaram o pimentão (*C. annuum*) para verificar como as altas temperaturas (26 °C a 32 °C) afetavam no conteúdo de carboidrato dos pólenes. Foi observada uma baixa porcentagem de germinação *in vitro*, no entanto, estas foram restauradas quando submetidas a concentrações elevadas de CO₂. Em estresses térmicos os pólenes apresentaram um acúmulo de sacarose e amido. Isso sugere que quando os pólenes são submetidos a altas temperaturas há uma redução na utilização de sacarose e amido, fato esse que resulta na baixa porcentagem de germinação *in vitro*. Por outro lado, quando se utilizou concentrações elevadas de CO₂, a redução do metabolismo foi inibida, e dessa forma, ocorreu uma melhor utilização da sacarose e do amido.

Diversos trabalhos, com outras espécies, tem demonstrado a redução na germinação *in vitro* e no crescimento do tubo polínico quando empregadas temperaturas elevadas. Kumar et al., (2013), trabalhando com grão de bico, observaram um declínio na viabilidade polínica, na germinação do pólen, no crescimento do tubo polínico e na receptividade do estigma com o aumento da temperatura. Em arroz

(*Oryza sativa* L.), a viabilidade polínica e a produção declinam quando a temperatura máxima do dia excede 33 °C e vai a zero quando exposto a temperaturas acima de 40°C (Kim et al., 1996). Em tomates, estresse de temperatura torna-os incapazes de produzir pólenes viáveis, o que reduz a frutificação (SATO et al., 2000).

As temperaturas inferiores também influenciam na viabilidade polínica. Neste experimento, quando se utilizou a temperatura de 25 °C, a germinação *in vitro* foi de 37,11%. Embora, a temperatura mínima empregada no presente estudo seja considerada moderada para a viabilidade polínica da maioria das espécies, já foram observadas porcentagens de germinação inferiores com o emprego destas. Em condições de campo, com temperaturas variando de 10 °C (noturna) a 24 °C (diurna), Shaked et al. (2004) trabalhando com quatro cultivares de pimentas, observaram um decréscimo no número de pólenes e na porcentagem de germinação. Por meio das análises dos conteúdos de carboidratos, nos últimos estágios de desenvolvimento do pólen, foi observada uma redução nas concentrações de amido e, posteriormente, de sacarose, glicose e frutose, diminuindo assim a concentração de açúcar solúvel nos pólenes maduro.

A temperatura ótima avaliada neste experimento foi de 30,69 °C resultando em 49,56% de germinação (Figura 10). Reddy e Kakani (2007), observando a resposta da germinação e do crescimento do tubo polínico de diferentes espécies de *Capsicum* à variação da temperatura, obtiveram como temperatura ótima 30, 8 °C para os dois genótipos estudados.

O emprego de temperaturas baixas ou elevadas na germinação *in vitro* de pólenes, pode ter interferido na eficiência de seus processos metabólicos e, conseqüentemente, no aproveitamento de suas reservas, resultando na baixa porcentagem de germinação.

4.2 TESTES COLORIMÉTRICOS

Nos experimentos em que foi avaliada a viabilidade polínica utilizando diferentes corantes, observou-se um efeito altamente significativo do corante utilizado na determinação da viabilidade. Vale ressaltar que esta técnica é considerada um método indireto na determinação de viabilidade polínica, pois a avaliação por coloração e formato dos grãos de pólen é relativa (SILVA, 2008). Apesar da utilização de corantes ser um método bastante atrativo devido sua simplicidade e rapidez na obtenção dos resultados, a validade deste método tem sido questionada devido a ocorrência da coloração de grãos de pólen inviáveis ou grãos de pólen imaturos e abortados (STANLEY; LINSKENS, 1974).

A porcentagem de viabilidade foi alta para a maioria dos corantes (Tabela 1), sendo as maiores observadas com a utilização do corante carmim acético glicerinado, resultando em 98,50% de grãos de pólen corados. Essa técnica está baseada na reação de coloração dos grãos de pólen amiláceos, indicando pólen maduro com protoplasma vivo (OLIVEIRA, 2001; GUERRA et al., 2002).

Tabela 1 - Valores médios referente a viabilidade polínica de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi' obtidos com a utilização de diferentes corantes. UFAC, Rio Branco, AC, 2015⁽¹⁾

Corante	Viabilidade (%)	
Carmim Acético Glicerinado (1:1)	98,50	A
Sudan IV (2%)	80,90	A
Lugol (2%)	83,20	A
Alexander	78,50	A
Baker	53,90	B
MTT sem sacarose	45,40	B
MTT + Sacarose (5%)	44,00	B
TTC (1%)	21,10	C
CV (%)	9,27	

¹⁾ Análise de variância no APÊNDICE H

²⁾ Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (1949) ao nível de 5% de probabilidade

A coloração obtida com a utilização do carmim acético superestima a viabilidade polínica, não apresentando correlação com os testes de germinação

(HESLOP-HARRISON et al., 1984). De acordo com Alexander (1969), o corante carmim acético colore pólenes viáveis e inviáveis, principalmente aqueles que apresentam paredes espessas mucilaginosas e com presença de espículas. A presença dessas espículas e mucilagem dificulta a penetração do corante e conseqüentemente, a coloração do pólen. Dessa forma, pólenes viáveis podem não apresentar coloração e serem equivocadamente classificados como abortados.

Silva (2008), ao avaliar a viabilidade polínica em *Arachis hypogaeae* com o corante carmim acético obteve 84,80% de viabilidade. Fávero e Simpson (2004) trabalhando com a mesma técnica, encontraram valores variando de 73 a 97%. Oliveira e Valls (2003) estudando aspectos reprodutivos de acessos do *Arachis* intra e interespecíficos, com a utilização do carmim acético glicerinado (1:1), obtiveram porcentagem de viabilidade para o *A. pintoii*, variando de 79,5% para o acesso GK 12787 a 99,8% para o V13167 e para *A. repens* de 98,2% para o acesso Nc 1578 a 100% para o Nc 1579. Para a produção de sementes de híbridos intra-específicos de *A. pintoii* (V13167 x V6791 - wf) observaram que embora a corabilidade tenha sido alta para ambos os acessos (97,80%) a produção de sementes em F₂ foi baixa (37%). Esses resultados dentre outras causas pode ser atribuído a baixa confiabilidade do corante empregado.

Assim como o carmim, à utilização das demais soluções histoquímicas avaliadas neste experimento, foram capazes de distinguir os pólenes viáveis dos inviáveis. Dentre as soluções avaliadas, a que permitiu uma melhor distinção entre os pólenes, foi a solução de Alexander, que apresenta uma reação de coloração bastante distinta das demais.

O padrão de coloração obtido pelos pólenes de acordo com o corante utilizado é apresentado na Figura 12. Os grãos de pólen corados com reativo de Alexander diferenciaram-se dos pólenes viáveis pela coloração verde da exina e púrpura da intina. Já os inviáveis apresentaram apenas a exina e a coloração toda verde (Figura 12A). Isso se deve aos componentes utilizados na solução, onde o verde malaquita colore de verde a parede celular e a fucsina ácida colore o protoplasma de rosa. Dessa forma, é possível distinguir os grãos de pólen abortados, pois já que estes não apresentam protoplasma, coram-se de verde (ALEXANDER, 1980).

Souza et al. (2014) trabalhando com quatro soluções histoquímicas para avaliar a viabilidade polínica em *Ceiba speciosa*, também perceberam uma melhor distinção entre os pólenes quando se utilizou a solução de Alexander. De acordo com

Alexander (1980), com a utilização deste corante é possível diferenciar os grãos de pólen abortados dos não abortados, e isso foi verificado no presente estudo (Figura 12A). No entanto, como este corante colore pólenes em diferentes estágios de desenvolvimento (velho e morto), torna-se uma alternativa não muito confiável, por superestimar a viabilidade, que foi em torno de 78,50%. Tiago et al. (2014) avaliando a viabilidade polínica em três genótipos de mandioca obtiveram percentuais variando de 77,5% (IAC-56-170) a 97,35% (IAC - CAAPORA) quando utilizou o corante Alexander. Martins et al. (2010) utilizaram a solução de Alexander para avaliar a viabilidade dos pólenes em acessos de duas espécies de *Capsicum*, também observaram que o corante estimou uma alta viabilidade polínica.

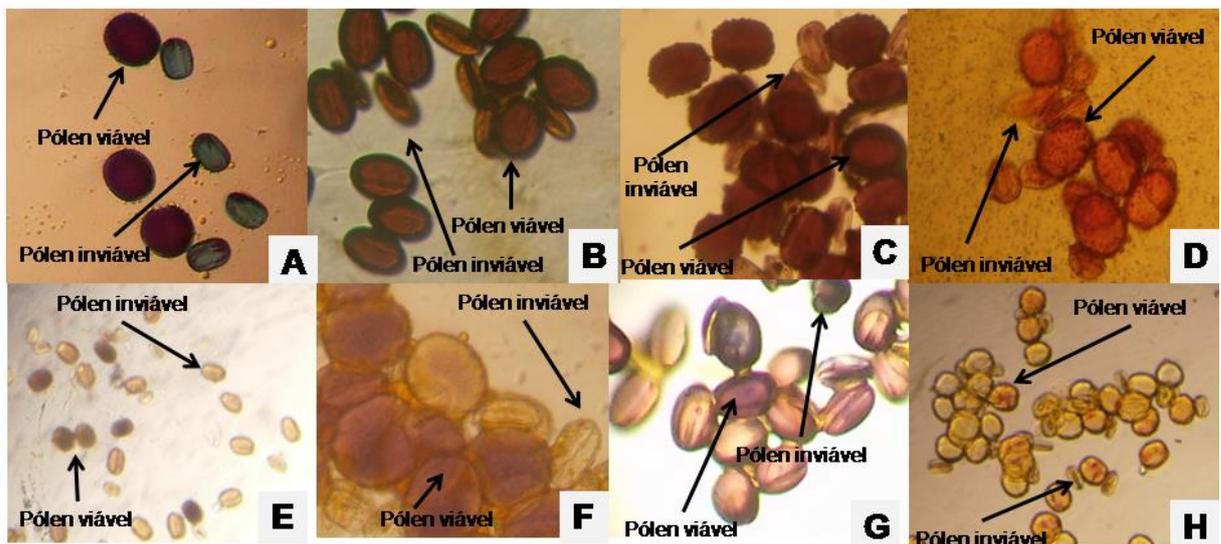


Figura 12 - Coloração de grãos de pólen de *A. pintoii* utilizando diferentes corantes: A) Alexander, B) Lugol, C) Sudan IV, D) Carmim acético glicerinado, E) MTT + Sacarose, F) MTT sem sacarose, G) Baker e H) TTC. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. Visualização em objetiva com aumento de 20X.

O lugol (2%) e o Sudan VI colorem amidos e lipídios, respectivamente. Porém, essas estruturas podem estar presentes tanto no pólen viável como no inviável e isso contribuiu para a superestimação da viabilidade, que foi de 83,20% e 80,90%, respectivamente. O padrão de coloração obtido pelo lugol 2% foi marrom para os pólenes viáveis e não corados para os inviáveis (Figura 12B). Já o Sudan IV proporcionou ao pólen viável uma coloração vermelho escura, enquanto que os inviáveis adquiriram uma coloração mais clara ou não coloriram (Figura 12C).

Gomes et al. (2013) estudando a viabilidade de duas populações de *Mauritia flexuosa*, utilizando carmim acético, lugol e Alexander, também encontraram alta

viabilidade polínica, com estimativas superiores a 90%. Munhoz et al. (2009) utilizando carmim acético (98,2%), lugol (91, 2%), sudan IV (93,3%) e Alexander (92, 6%) para testar viabilidade polínica do mamão também obtiveram resultados elevados. Tiago et al. (2014), utilizando os corantes lugol, carmim acético e Alexander para avaliar a viabilidade polínica em três genótipos de mandioca, observaram que dentre os três corantes os menores valores de pólenes viáveis foram encontrados quando se utilizou o reativo Alexander com 89,53% de viabilidade e os maiores foram obtidos com a utilização do carmim acético com 94,38%. Observações semelhantes foram feitas neste experimento.

Em gramíneas, como o capim elefante e o milho, também foi observada alta viabilidade polínica de até 100%, em alguns acessos, quando se utilizou o carmim propiônico (2%) e o reativo Alexander (TECHIO et al., 2006). A viabilidade da *Brachiaria ruziziensis* também foi alta, de 76,8 a 99, 6%, com a utilização do corante Alexander (PAULA et al., 2014). De acordo com Silva (2008), a alta taxa de viabilidade de grão de pólen, além de indicar uma provável terminalização meiótica regular, pode, também, apontar alguma proximidade entre as espécies genitoras.

Os grãos de pólen viáveis, na presença do carmim acético adquiriram coloração vermelha com membranas íntegras e os inviáveis apresentaram coloração com menor intensidade ou não coloriram (Figura 12D). Já o MTT independente da adição de sacarose, assim como o Baker, coloriram os pólenes viáveis de roxo e os inviáveis não coloriram ou ficaram pretos. De acordo com Norton (1966), esses pólenes pretos estão em estado de degeneração (Figuras 12E, F e G).

O teste com o corante TTC indicou a presença de enzimas desidrogenases ativas através da coloração rosa dos grãos de pólen. Os pólenes inviáveis permaneceram na cor amarela (Figura 12H). Com a utilização deste teste foram obtidas as menores porcentagem de viabilidade. (21,10%). Lins et al. (2010) utilizando corantes para verificar a viabilidade polínica em diferentes genótipos de bananeira também obtiveram menores porcentagens (53,37%) de viabilidade quando utilizaram o corante TTC.

Comparando os corantes utilizados na determinação da viabilidade com a germinação *in vitro* dos pólenes, os que permitiram a obtenção de viabilidade semelhante a germinação *in vitro* foram: Baker e MTT sem e com sacarose, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios referente a viabilidade e a germinabilidade polínica de *A. pintoi* cv. BRS 'Mandobi' obtidos com a utilização de diferentes corantes e meio de cultura contendo 200 g.L⁻¹ de sacarose e 25 mg.L⁻¹ de ácido bórico, respectivamente. UFAC, Rio Branco, AC, 2015⁽¹⁾

Técnica utilizada	Germinabilidade /Viabilidade (%)	
Germinação <i>in vitro</i>	50,80	A
Baker	53,90	A
MTT sem sacarose	45,40	A
MTT + Sacarose (5%)	44,00	A
Carmim Acético Glicerinado (1:1)	98,50	B
Sudan IV (2%)	80,90	B
Lugol (2%)	83,20	B
Alexander	78,50	B
TTC (1%)	21,10	B
CV (%)	9,27	

¹⁾ Análise de variância no APÊNDICE I

²⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Dunnett (1980) ao nível de 5% de probabilidade

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, percebe-se ainda que a viabilidade foi maior quando se utilizou o corante carmim acético com 98,5%. No entanto, como mencionado anteriormente, embora este corante seja muito empregado em estudos de biologia reprodutiva em *Arachis*, ele superestima a viabilidade polínica. Como a germinação *in vitro* é considerada umas das técnicas mais confiáveis na determinação de viabilidade polínica, por simular as condições naturais do estigma (MARCELLÁN; CAMADRO, 1996), a solução de Baker e o corante MTT seriam os mais recomendados, pois a viabilidade obtida com estes corantes não diferiram estatisticamente dos valores observados na germinação *in vitro* (Tabela 2). Além disso, a utilização desta técnica é bem mais prática que a germinação *in vitro*, tendo em vista sua simplicidade e custo.

4.3 RECEPTIVIDADE DOS ESTIGMAS

Quanto à viabilidade do órgão feminino, neste trabalho foi estudada apenas a receptividade do estigma. Com relação aos reagentes utilizados, não houve diferenças pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A receptividade variou entre 76% a 84% (Tabela 3). De acordo com Silva et al. (2010), as análises de receptividade estigmática são essenciais, pois a fecundação só será obtida com sucesso quando o pólen desenvolver seu tubo sob a superfície estigmática receptiva.

Tabela 3 - Valores médios da receptividade dos estigmas de flores de *A. pinto* cv BRS 'Mandobi', utilizando diferentes reagentes. UFAC, Rio Branco, AC, 2015⁽¹⁾

Reagente	Receptividade (%)	
Baker	84,00	A
Peroxtesmo (2%)	80,00	A
Peróxido de hidrogênio (3%)	76,00	A
CV (%)	8,57	

¹⁾ Análise de variância no APÊNDICE J

²⁾ Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (1949) ao nível de 5% de probabilidade.

Na determinação de receptividade, a solução de Baker proporcionou 84% de estigmas receptivos, isso foi determinado de acordo com a coloração roxa adquirida pelos estigmas (Figura 13A). Já para o peroxtesmo, o estigma receptivo coloriu o papel de verde (Figura 13B), a receptividade foi de 80%.

Com o uso do peróxido de hidrogênio a 3%, houve formação imediata de bolhas na cavidade estigmática (Figura 13C), indicando a atividade da peroxidase, concordando, assim, com diversos autores (PIO, 2007; FONSECA, 2010), os quais relatam que a reação enzimática da enzima peroxidase baseia-se na hipótese que a presença desta enzima reflete a receptividade do estigma. A receptividade adquirida por esse reagente foi de 76%. Tiago et al. (2014) avaliando a receptividade de estigmas em três genótipos de mandioca, com a utilização do reagente peróxido de hidrogênio a 3%, obtiveram valores acima de 75% para ambos os genótipos.

Para obter o sucesso nas fertilizações é necessário depositar o pólen em estigmas receptivos (FONSECA, 2010). Entretanto, a fertilização pode ocorrer

mesmo quando o pólen é depositado antes do período de receptividade dos estigmas, desde que ele se mantenha viável em tempo suficiente, até que a flor se torne receptiva (RAMOS, 2008).

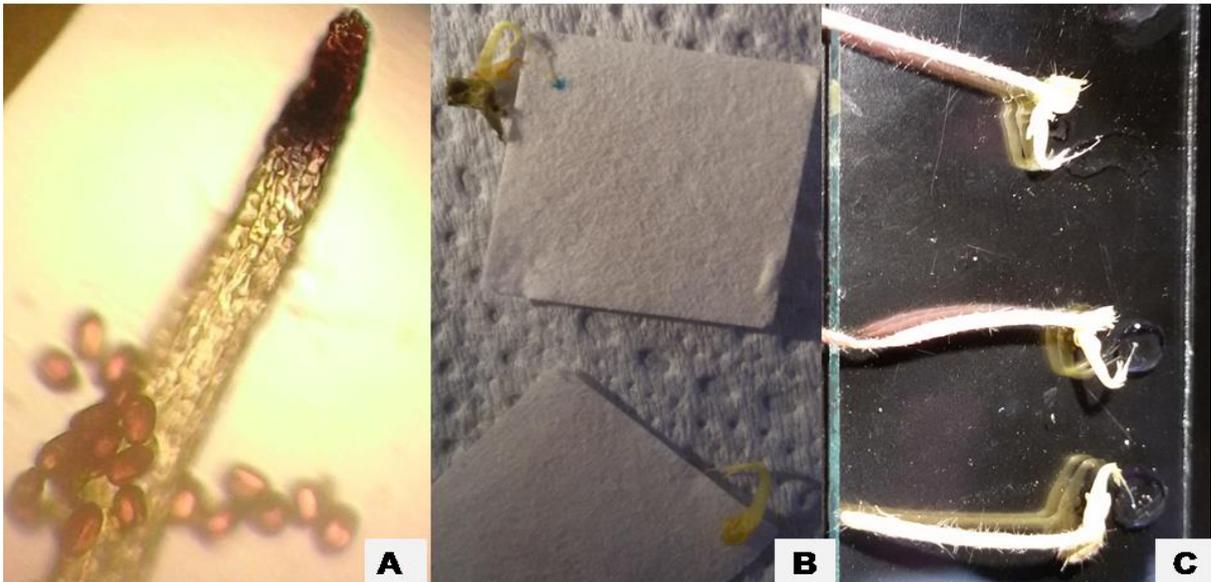


Figura 13 - Receptividade dos estigmas de flores de *Arachis pintoii* BRS 'Mandobi' utilizando diferentes reagentes: A) Baker, B) Peroxtesmo KO e C) Peróxido de hidrogênio (3%). Fonte: Capistrano (2014)

4.4 VIABILIDADE POLÍNICA AO LONGO DO DIA

Com relação à viabilidade polínica ao longo do dia, observou-se que a maior porcentagem de germinação *in vitro* de pólen de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi' (52,62%) foi obtida quando estes foram coletados às 06h46min da manhã. Após este horário, a viabilidade diminui gradualmente (Figura 14). Conforme Costa et al. (2009), dentre outros fatores, o horário de coleta da flor influencia na perda de viabilidade. Essa diminuição pode estar associada a fatores edafoclimáticos, como alterações na temperatura e umidade, bem como característica do próprio genótipo, já que de acordo com Sukhvibul et al. (2000), a perda de viabilidade em função do tempo pode estar associada ao aumento da temperatura, e isso é dependente da espécie ou do genótipo estudado. Os resultados encontrados são concordantes com Costa et al. (2009) e Sukhvibul et al. (2000).

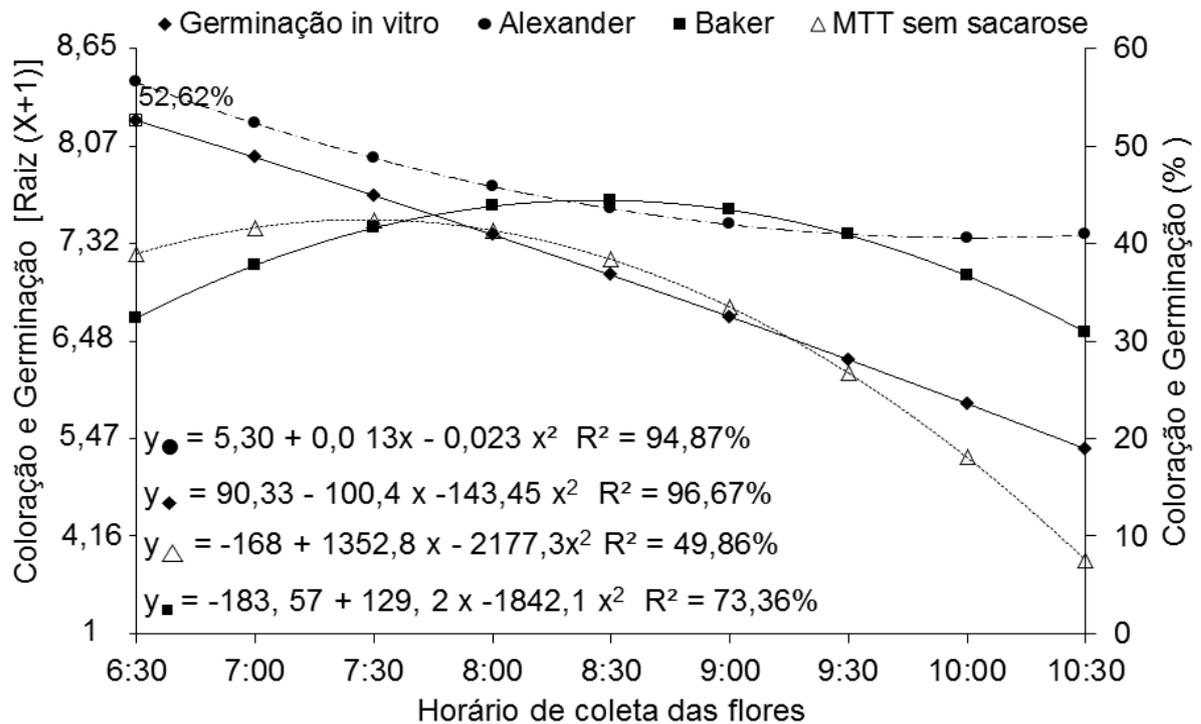


Figura 14 - Viabilidade de pólen de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi' em função do horário de coleta das flores. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE K).

A diminuição do percentual da germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoi* ao longo do dia, pode estar associada ao aumento da temperatura e diminuição da umidade relativa do ar. Conforme a literatura, as alterações na temperatura, ao longo do dia, constituem um dos principais fatores responsáveis pela perda da

viabilidade (STANLEY; LINSKENS, 1974). À medida que esta aumenta, diminui o número de pólen por antera (FREITAS, 2013) e a fertilidade dos grãos, especialmente na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (ALLAN, 1963). Isso foi observado, no presente estudo, a partir das 09h30 da manhã, onde a quantidade de pólenes por antera já estava bastante reduzida, bem como a porcentagem de germinação *in vitro*, (26,1%). Nesse horário, a temperatura local estava entre 35 a 38 °C e conforme Parzies et al. (2005), temperaturas altas (40 °C) reduzem significativamente a viabilidade do pólen.

A perda da viabilidade ao longo do dia, em relação ao aumento da temperatura, pode ser explicada pelo fato de temperaturas altas afetarem a deiscência das anteras, a arquitetura da parede do grão de pólen, a quantidade e morfologia do pólen, bem como sua composição química e o metabolismo (ALONI et al., 2001, PRASAD et al., 2002, KOTI et al., 2005). A temperatura também pode afetar na formação dos gametas e diminuir sua qualidade, podendo até provocar a completa esterilidade dos mesmos. Fato este que pode ser comprovado no último horário de coleta (10h30) em que a germinação *in vitro* já estava em torno de 20,8%.

Observou-se também, nos últimos horários de coleta, que as flores estavam danificadas pela ação de insetos e de altas temperaturas. Conforme Zinn et al., (2010), altas temperaturas ocasionam defeitos nos tecidos parentais (corolas, carpelos e estames), como deformidades e redução de número e tamanho dos órgãos florais, que acabam por contribuir com a baixa produção de sementes.

O grão de pólen é sensível a mudanças de temperatura desde seus primeiros estádios de desenvolvimento na antera até a ocorrência da dupla fertilização no gametófito feminino (HEDHLY, 2011). Os maiores danos causados pelas alterações de temperatura ocorrem durante o desenvolvimento do grão de pólen. Trabalhos indicam que a antese é a fase mais sensível da planta, dessa forma, o aumento da temperatura pode ocasionar queda da fertilidade da flor (WALTER, 2010). Portanto, flutuações sutis de temperatura afetam de maneira negativa características como a viabilidade do pólen (ERICKSO; MARKHART, 2002), a capacidade germinativa (JÓHANNSSON; STEPHENSON, 1998; KOTI et al., 2005), a taxa de crescimento do tubo polínico e produção de sementes e frutos (SATO et al., 2002).

A perda da viabilidade polínica em função do tempo após a abertura da flor, também foi observada em outras espécies. Souza et al. (2002), trabalhando com maracujá, através de análise colorimétrica (solução de Alexander e lugol), observou

a queda da viabilidade desses pólenes, porém o índice ainda se manteve alto, superior a 75%, mesmo 24 horas após a antese. Em trabalhos conduzidos por Nunes (2004), com grãos de pólen de flores de atemoeira coletados em diferentes horários (7 - 10 horas), e inoculados em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose, observaram que os grãos de pólen coletados às 7 horas e inoculados em meio de cultura com concentração de sacarose de 10%, apresentaram maior percentagem de germinação, com média de 12,25%. Nietzsche et al. (2009) avaliando a viabilidade de grãos de pólen de pinheira (*Annona squamosa*) coletados de flores em diferentes horários (0 - 7 horas), em intervalos de 1 h, verificaram a mesma percentagem de germinação, indicando que a coleta das flores de pinheira, para a polinização artificial, pode ser realizada às 7 horas, sem redução da viabilidade dos grãos de pólen. Jesus et al. (2011) trabalhando com viabilidade polínica de maracujá proveniente de coleta de flores realizadas em diferentes horários e estágio de desenvolvimento, com a utilização do corante TTC, observou que a viabilidade decresce ao longo do dia, sendo maior nas primeiras horas da manhã (8 horas), e na antese ocorre maior percentagem de germinação, indicando que a coleta das flores para a polinização artificial pode ser realizada neste horário. De acordo com Souza (2002) essa redução de viabilidade ao longo do tempo, reduz sua eficiência na fertilização.

4.5 RECEPTIVIDADE DOS ESTIGMAS AO LONGO DO DIA

Foi observada a queda da receptividade do estigmas ao longo do dia e isso pode estar associado ao aumento da temperatura de acordo com o horário de coleta das flores (Figura 15). Segundo Hedhly (2011), dentre outros fatores, a temperatura influencia na receptividade estigmática.

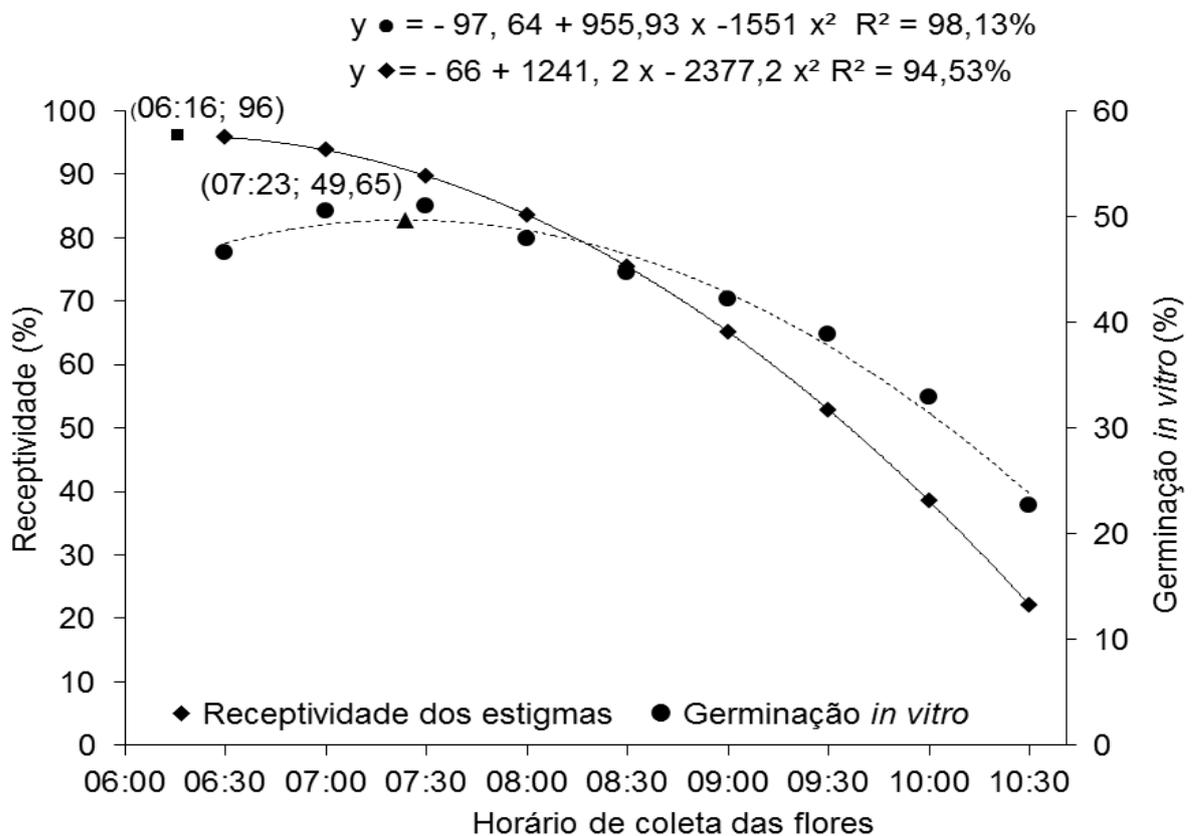


Figura 15 - Porcentagem de receptividade dos estigmas de flores de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi', em diferentes horários de coleta das flores. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância nos APÊNDICES L e M).

Em amendoim comum a receptividade do estigma persiste por quase 12 horas após da abertura de suas flores (HASSAN; SRIVASTAVA, 1966). A receptividade estigmática é indicativa da maturação do gameta feminino, podendo influenciar na taxa de fecundação e no sucesso da polinização (FONSECA, 2010). Como no presente trabalho, a receptividade caiu ao longo do tempo, esses resultados sugerem que os cruzamentos em campo com *A. pintoi* devem ser realizados nas primeiras horas da manhã, pois é o horário em que os estigmas estão mais receptivos e dessa forma, se obterá maior sucesso nos cruzamentos.

4.6 ARMAZENAMENTO DE PÓLENS

Analisando o ambiente externo, caracterizado pela temperatura ambiente ($33 \pm 1^\circ\text{C}$), observou-se uma perda rápida de viabilidade logo após a segunda semana de armazenamento, onde a viabilidade caiu de 50,2% para 7,2% (Figura 16). De acordo com Souza et al. (2014), ao armazenar pólen em temperaturas externas, deve-se levar em conta que estes ficam expostos a fatores bióticos e abióticos como: temperatura, pH, polinizadores, pressão, umidade, entre outros, interagindo; podendo resultar na baixa viabilidade polínica.

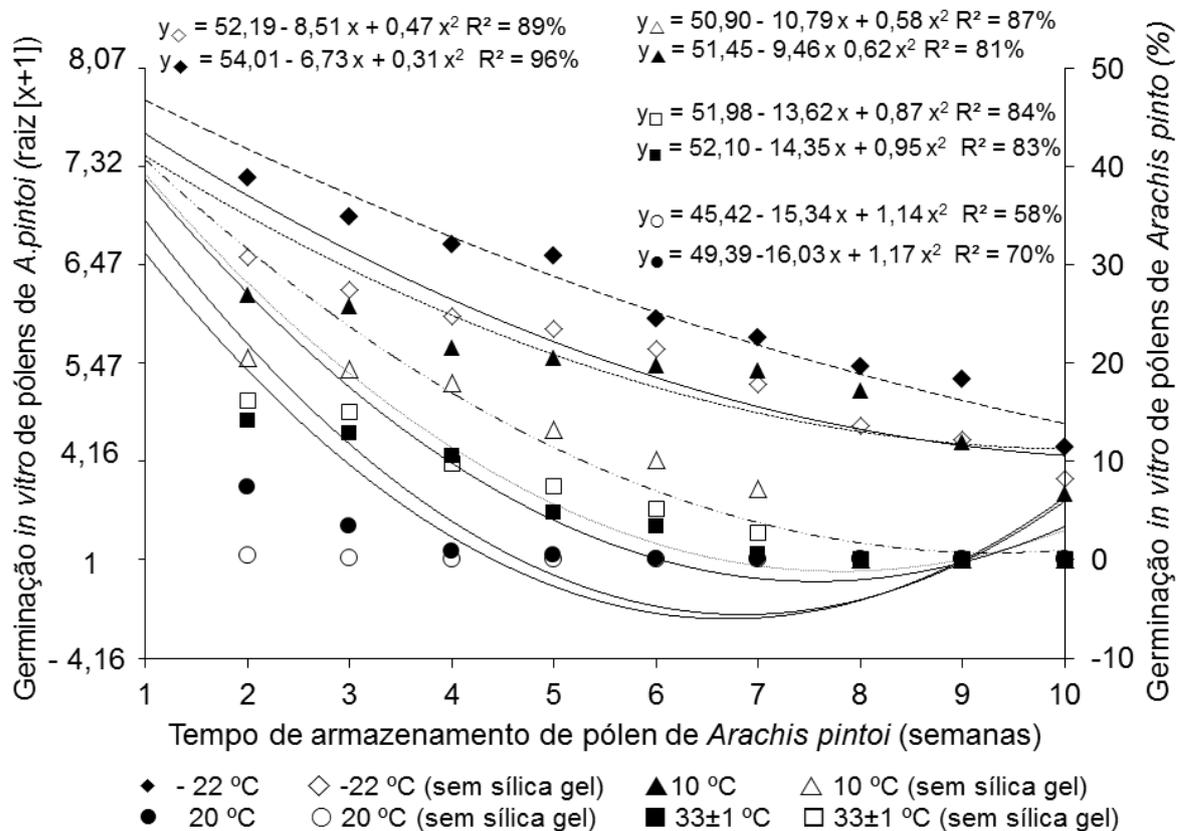


Figura 16 - Porcentagem da germinação *in vitro* de pólenes de *Arachis pintoi* cv. BRS 'Mandobi', armazenados em diferentes temperaturas. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância nos APÊNDICES N, O, P).

O armazenamento de pólenes a 20 °C também apresentou grandes diferenças na viabilidade logo na segunda semana, caindo de 50,2% para 14,2 e 16,2%, 58% (com sílica e sem sílica, respectivamente).

Não foram encontrados trabalhos na literatura relacionados com a necessidade térmica para o armazenamento de pólenes do amendoim forrageiro.

Portanto, esse aspecto foi comparado com o de outras culturas, nas quais os pólenes foram armazenados em condições semelhantes às desenvolvidas neste estudo. Oliveira (2009) avaliando o armazenamento de pólenes de meloeiro observou a perda rápida de viabilidade destes pólenes, quando armazenados em temperatura ambiente.

Pio et al. (2007) observaram que o armazenamento de pólenes de laranja cv. 'Pêra' a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi mais eficiente do que a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, no período estudado (9 semanas) e que o armazenamento em temperatura ambiente não é eficiente. No presente trabalho, o armazenamento dos pólenes em temperatura ambiente ($33 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) também foi inadequado para a manutenção da viabilidade polínica, pois foi observada uma redução drástica nessa viabilidade, ao longo do tempo, comparado com a percentagem de germinação de pólen fresco que foi 50,2%. Observou-se também, a inviabilidade no armazenamento de pólenes acondicionados a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 16).

Com relação aos pólenes armazenados a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi verificada uma viabilidade maior que os acondicionados em temperatura ambiente ($33 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), embora com um decréscimo de viabilidade ao longo do tempo. Esses resultados concordam com Oliveira (2009), ao estudar a viabilidade e armazenamento de grãos de pólen de cultivares de meloeiro (*Cucumis melo* L.).

Os grãos de pólen armazenados a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram percentagem de germinação superior aos armazenados a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 16). Esses resultados corroboram com os encontrados por Cuchiara et al. (2012) trabalhando com pólen de dois cultivares de mamoneira. Esses autores observaram que as temperaturas inferiores possibilitaram a melhor conservação dos pólenes, resultando em percentagens consideráveis de germinação polínica.

Normalmente a viabilidade polínica é maior quando se empregam baixas temperaturas devido à redução do metabolismo do pólen armazenado, o que resulta numa maior longevidade. No entanto, nem sempre o acondicionamento de pólenes em temperaturas negativas é capaz de manter a viabilidade polínica, conforme verificado por Oliveira (2009). Este autor observou que a germinação de pólenes de meloeiro da cultivar 'Vereda', após quatro dias de armazenamento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi superior a germinação dos pólenes mantidos a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, neste mesmo período.

Em relação ao tempo de armazenamento, os grãos de pólen de *Arachis pintoi*, apresentaram maior percentagem de germinação *in vitro* na primeira semana, quando os pólenes ainda estavam frescos. A partir daí, foi verificada uma redução na viabilidade polínica (Figura 16). De acordo com Stanley e Linskens (1974) há

tendência na redução de viabilidade polínica ao longo do armazenamento. Isso pode ser explicado devido à ocorrência de alterações fisiológicas durante o armazenamento do pólen. Essas alterações envolvem modificações na velocidade de respiração e conversão dos açúcares em ácidos orgânicos, acúmulo de produtos metabólicos secundários, como os ácidos orgânicos, dentre outros. Além da redução da viabilidade dos pólenes, o comprimento dos tubos polínicos também foi menor com o passar do tempo. À medida em que o pólen envelhece, o comprimento do tubo polínico e a porcentagem de germinação decrescem (SCORZA;SHERMAN, 1995; EINHARDT et al., 2006).

A utilização de sílica gel foi eficiente apenas quando os pólenes foram armazenados a 10 °C (Tabela 4), nas demais temperaturas seu efeito não interferiu na longevidade desses pólenes.

Tabela 4 - Valores médios da germinação *in vitro* de pólenes *A. pintoj*, armazenamentos em diferentes temperaturas (33, 10, 20, - 22 °C) por 10 semanas, em ambientes com e sem sílica gel. UFAC, Rio Branco, AC. 2015⁽¹⁾

Temperatura de armazenamento	Condição de armazenamento	
	Com sílica	Sem sílica
-22 °C (Freezer)	28.34 Aa	23.02 Aa
10 °C (Geladeira)	22.00 Ba	13.88 Bb
20 °C (BOD)	9.67 Ca	10.66 Ba
28 ±1 °C (T. Ambiente)	6.18 Ca	5.13 Ca

¹⁾ Análise de variância no APÊNDICE L

²⁾ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (1949) ao nível de 1% de probabilidade

O emprego de sílica gel associado a baixas temperaturas, tem por finalidade reduzir o teor de umidade. Com isso, são minimizadas as variações da taxa respiratória e de outros processos metabólicos. Esses fatores, associados a redução da proliferação de micro-organismos e, conseqüentemente da deterioração dos grãos de pólen aumentam sua viabilidade (FRANÇA, et al., 2010). Outra explicação para a utilização de sílica gel associada a baixas temperaturas, é que a redução da umidade do pólen, diminui os riscos de formação intracelular de cristais de gelo. Segundo alguns autores, esses cristais podem romper os tecidos celulares, possivelmente devido à lesões na membrana celular, o que afeta a viabilidade do pólen (POLITO; LUZA, 1988).

As anteras, contendo os pólenes armazenados a - 22 ° C em ambiente com sílica gel ficaram extremamente secas e quebradiças, dificultando a liberação dos pólenes. Isso pode explicar a ineficiência da utilização de sílica gel no armazenamento de pólenes nessa temperatura, pois conforme França et al. (2010), a redução excessiva de água do pólen torna-o muito seco, e isso reduz sua capacidade germinativa por perder água de sua constituição (FRANÇA et al., 2010).

A quantidade de água retirada do pólen é uma fator que varia conforme a espécie, mas como não foram encontrados trabalhos na literatura mencionado a respeito da dessecação de pólenes de amendoim forrageiro, isso foi observado em outras espécies. Em milho, por exemplo, a retirada de água reduz sua viabilidade (FERREIRA et al., 2007), enquanto em beterraba, essa viabilidade é mantida (HECKER et al., 1986). Dessa forma, é possível que os grãos de pólen apresentem um comportamento variável entre as diferentes espécies com relação à tolerância à dessecação, tendo como consequência a capacidade de armazenamento bastante curta ou a maior longevidade de grãos de pólen.

Um fator importante a ser considerado no armazenamento de pólenes em quaisquer espécies é a porcentagem de germinação *in vitro* inicial. De acordo com Arnaud (1979), pólenes com viabilidade inferior a 40% devem ser descartados do armazenamento. No presente estudo, a viabilidade inicial foi de 50,2% e isso indica que esses pólenes estavam com viabilidade inicial adequada para o armazenamento.

De maneira geral, o armazenamento de pólen de *Arachis pintoi* cv. 'Mandobi' a - 22 °C sem a sílica gel, mantém a viabilidade do pólen até os 70 dias, onde foram observados 11,4% de viabilidade, sendo que a utilização de pólenes armazenados por períodos maiores ocasionaria baixa taxa de pegamento dos cruzamentos em campo e, conseqüentemente baixa eficiência dos programas de melhoramento genético. O recomendável é, portanto, armazenar esses pólenes por no máximo 35 dias, a - 22 °C, pois nessas condições a germinabilidade se apresentou em torno de 30% e segundo Einhardt et al. (2006), para se obter sucesso nas hibridações controladas, é importante utilizar pólen com viabilidade superior a 30%.

4.7 VIABILIDADE E GERMINABILIDADE POLÍNICA DE GENÓTIPOS DE *Arachis pintoi* EM DIFERENTES HORÁRIOS DO DIA

Os protocolos definidos para a avaliação da viabilidade polínica do Amendoim forrageiro cv. BRS Mandobi foram utilizados para verificar a viabilidade ao longo do dia, em diferentes genótipos pertencentes ao BAG da Embrapa – Acre. Para tanto, foram utilizados os corantes Baker, Alexander e MTT sem sacarose e comparados com os valores obtidos na germinação *in vitro*.

A partir dos valores obtidos na germinação *in vitro*, observa-se nas figuras 17 e 8, respectivamente, percentuais compreendidos entre 19,25% (cv. Ap56) a 84,5% (cv. Ap55). Esses resultados podem ser observados nas figuras 20 e 17, respectivamente. Os percentuais de germinabilidade variaram de acordo com o genótipo e horário de coleta das flores. Dentre os genótipos avaliados, o Ap55 (Figura 17) apresentou maior porcentagem de germinação *in vitro*. A germinabilidade desse genótipo foi maior quando as flores foram coletadas às 7h30 da manhã (84,5%) e menor às 10h30 (30,37%). Comparando os corantes utilizados com a germinação *in vitro*, o Alexander apresentou percentuais de viabilidade mais próximos com os de germinabilidade, além de uma melhor distinção entre pólenes viáveis dos não viáveis, conforme a coloração obtida pelo protoplasma.

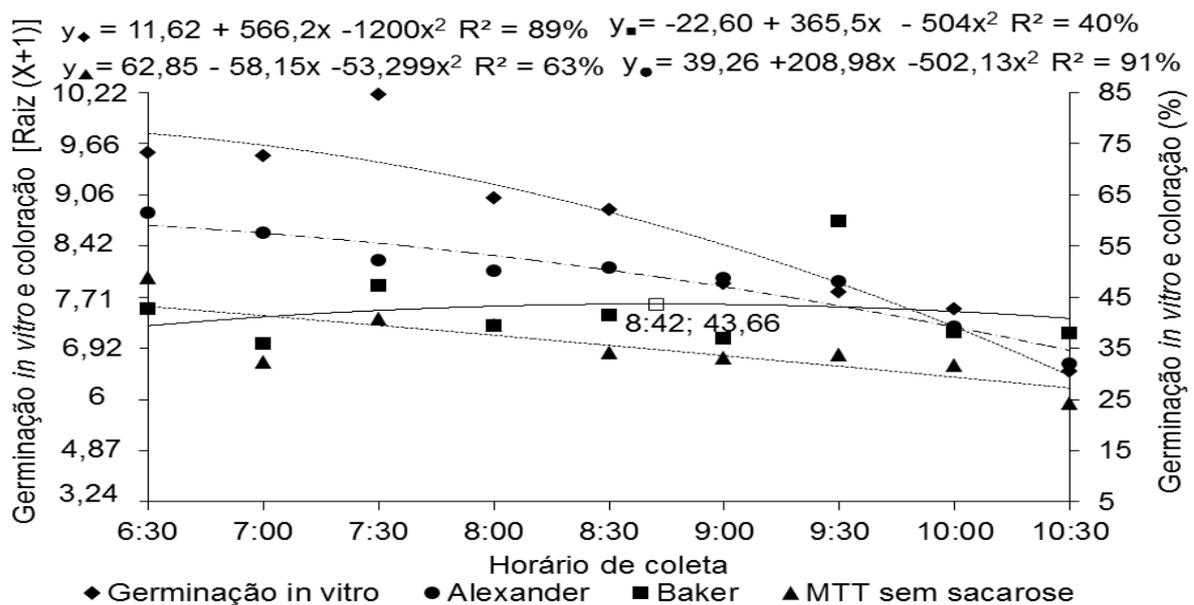


Figura 17 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Ap55, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE R).

Outros genótipos que também apresentaram maior porcentagem de germinação *in vitro* quando as flores foram coletadas neste mesmo horário foram o Alqueire-1 com 69,26% (Figura 18) e o Ap8 com 62,13% (Figura 19). Em ambos os acessos, a menor porcentagem de germinação *in vitro* ocorreu quando as flores foram coletadas as 10h30 da manhã. Neste ultimo horário de coleta (10h30), a maioria das flores apresentavam ausência de pétalas ou estas estavam danificadas pela ação de insetos, com pouca liberação de pólenes. Esses, dentre outros fatores como baixa umidade e alta temperatura, podem justificar a menor viabilidade polínica obtida nestes horários.

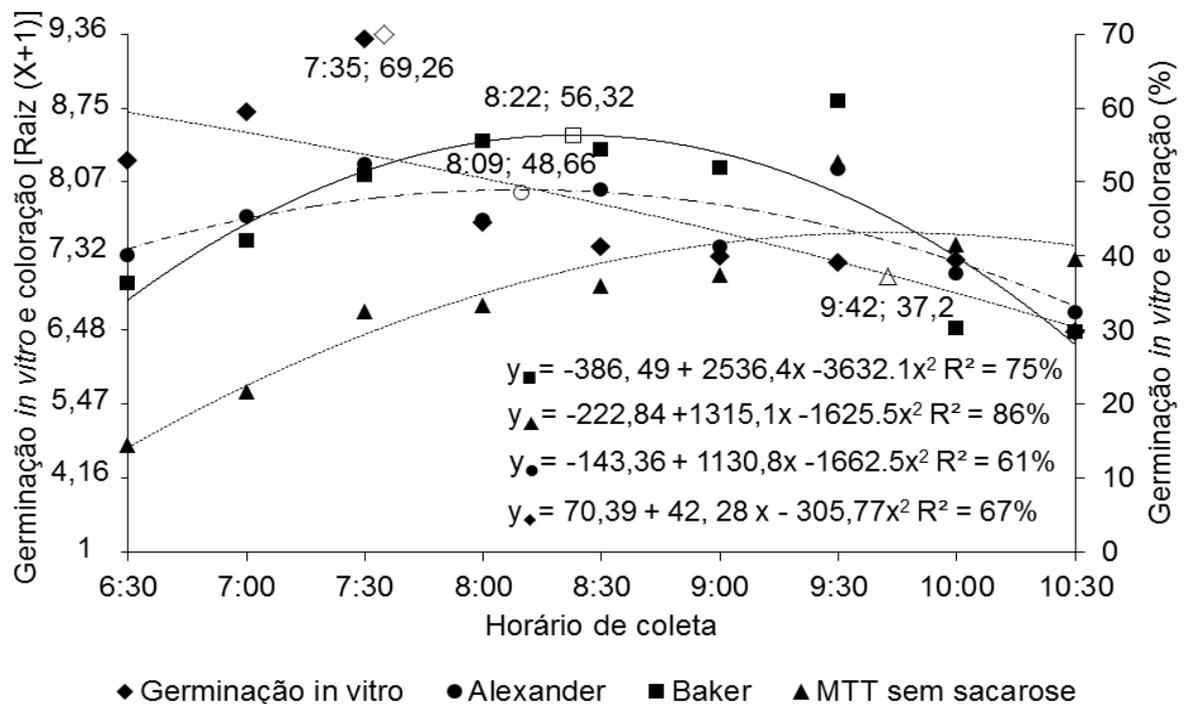


Figura 18 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Alqueire-1, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE S).

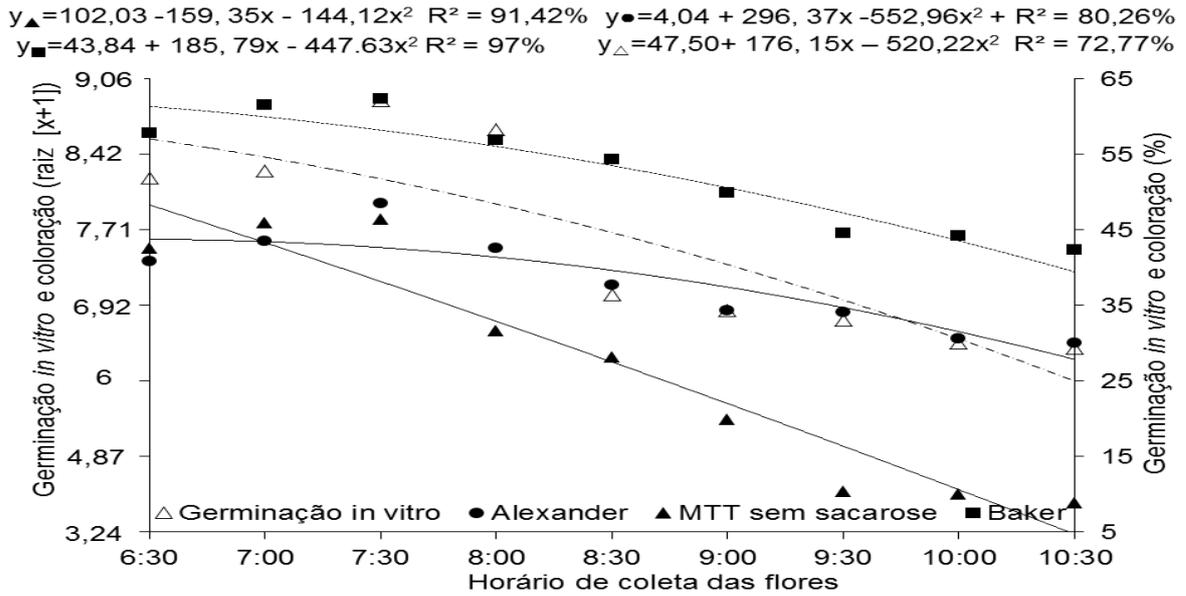


Figura 19 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Ap8, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE T)

Os valores obtidos com a germinação *in vitro* foram semelhantes aos de viabilidade por meio do uso dos corantes Alexander (cv. Alqueire-1) e Baker (cv. Ap8). O genótipo Ap56 apresentou percentagem de germinação variando entre 19,25% a 62%, sendo o melhor horário de coleta às 9:30. Neste horário, a percentagem de germinação *in vitro* foi 62% (Figura 20).

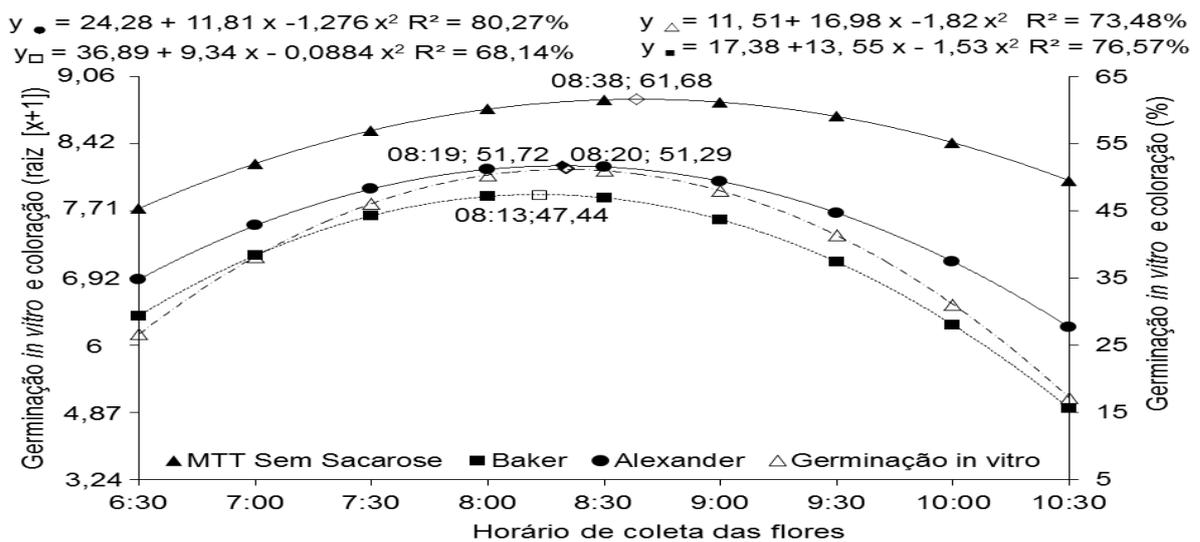


Figura 20 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Ap56, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE U).

A germinabilidade do genótipo Ap57 foi maior quando as flores foram coletadas até as 09:00 da manhã, resultando em 62,38% de germinação *in vitro* (Figura 21). As porcentagens de viabilidade foram semelhantes às de germinação *in vitro*, com a utilização de ambos os corantes avaliados.

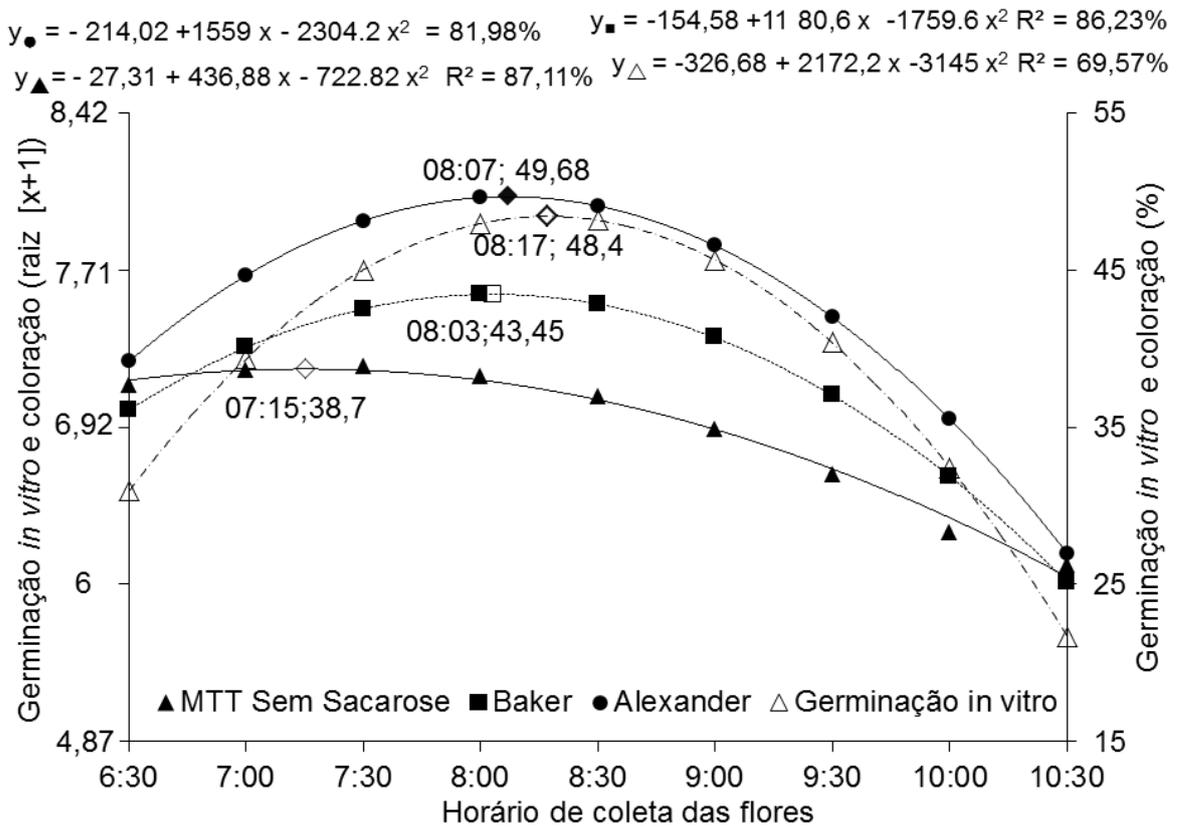


Figura 21 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Ap57, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE V).

O genótipo Ar67 (Figura 22) também apresentou alta taxa de germinação *in vitro* de pólenes. O melhor horário observado para a coleta das flores deste genótipo foi às 08:00 da manhã no qual foi obtido 69,9% de germinação *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados com o emprego do corante Alexander na determinação da viabilidade, onde foi obtido 62,6% de pólenes viáveis, neste mesmo horário de coleta (Figura 22).

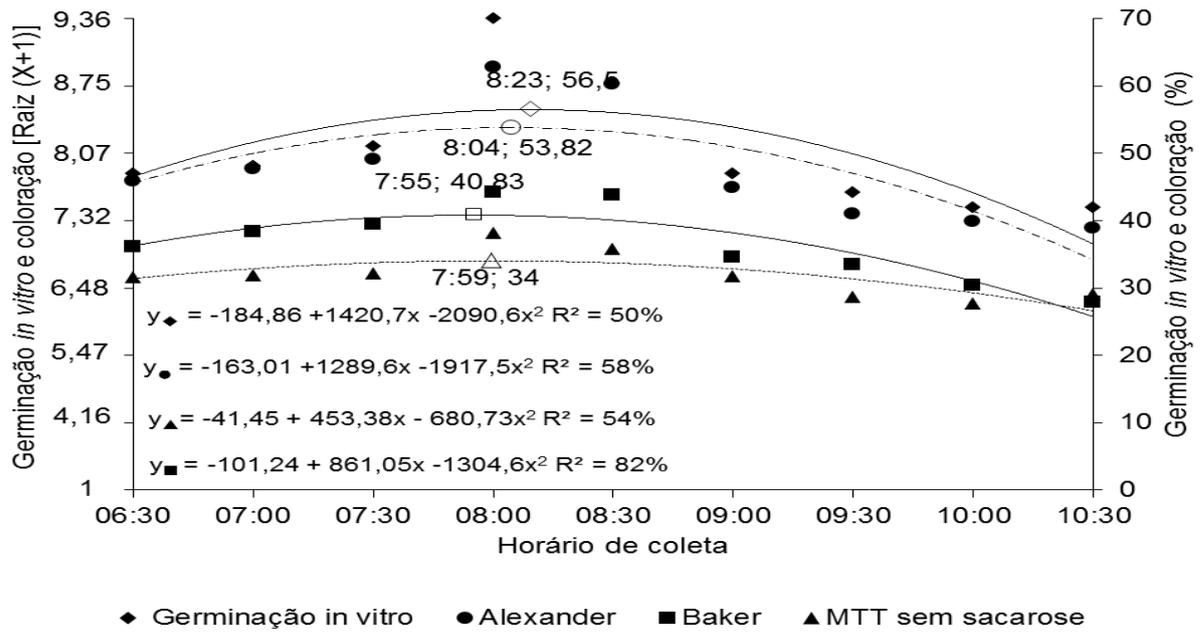


Figura 22 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis repens* cv. Ar67, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE X).

Os pólenes do genótipo Ap90 apresentaram maior taxa de germinação *in vitro* quando coletados as 08:30 da manhã, onde foi obtido 51,13% de germinação (Figura 23). Maiores porcentagens de viabilidade também foram observadas neste mesmo horário, com a utilização de ambos os corantes avaliados.

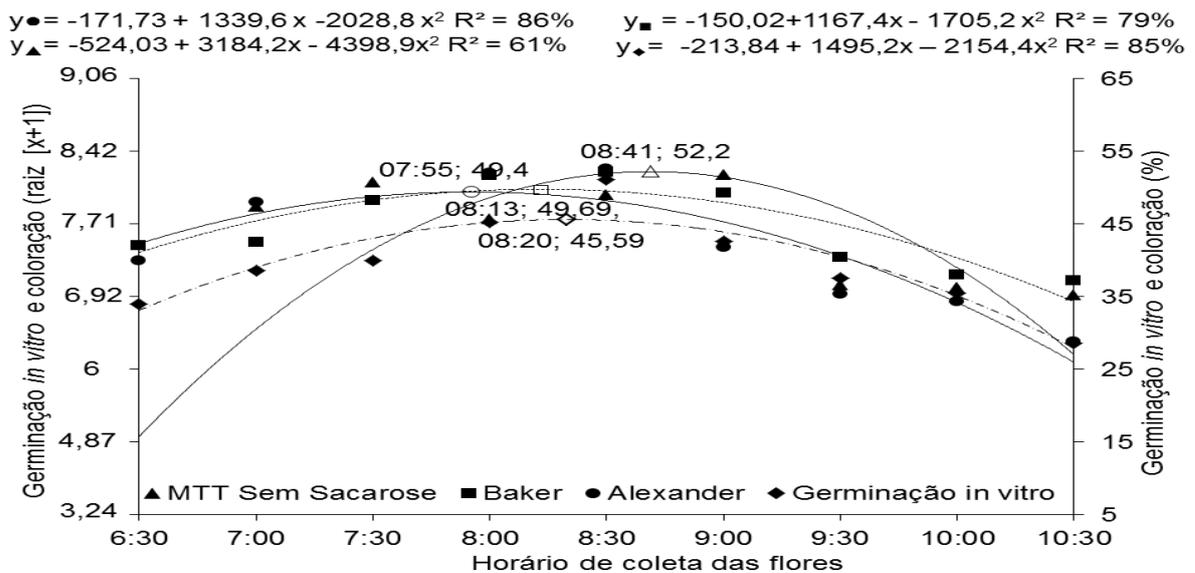


Figura 23 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Ap90, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE Z).

Outro genótipo que também apresentou maior germinabilidade polínica quando as flores foram coletadas as 08:30 da manhã foi o Ap7, resultando em 61% de germinação *in vitro*. A viabilidade neste horário, obtida através da coloração foi em torno de 50%, utilizando-se o Alexander (Figura 24).

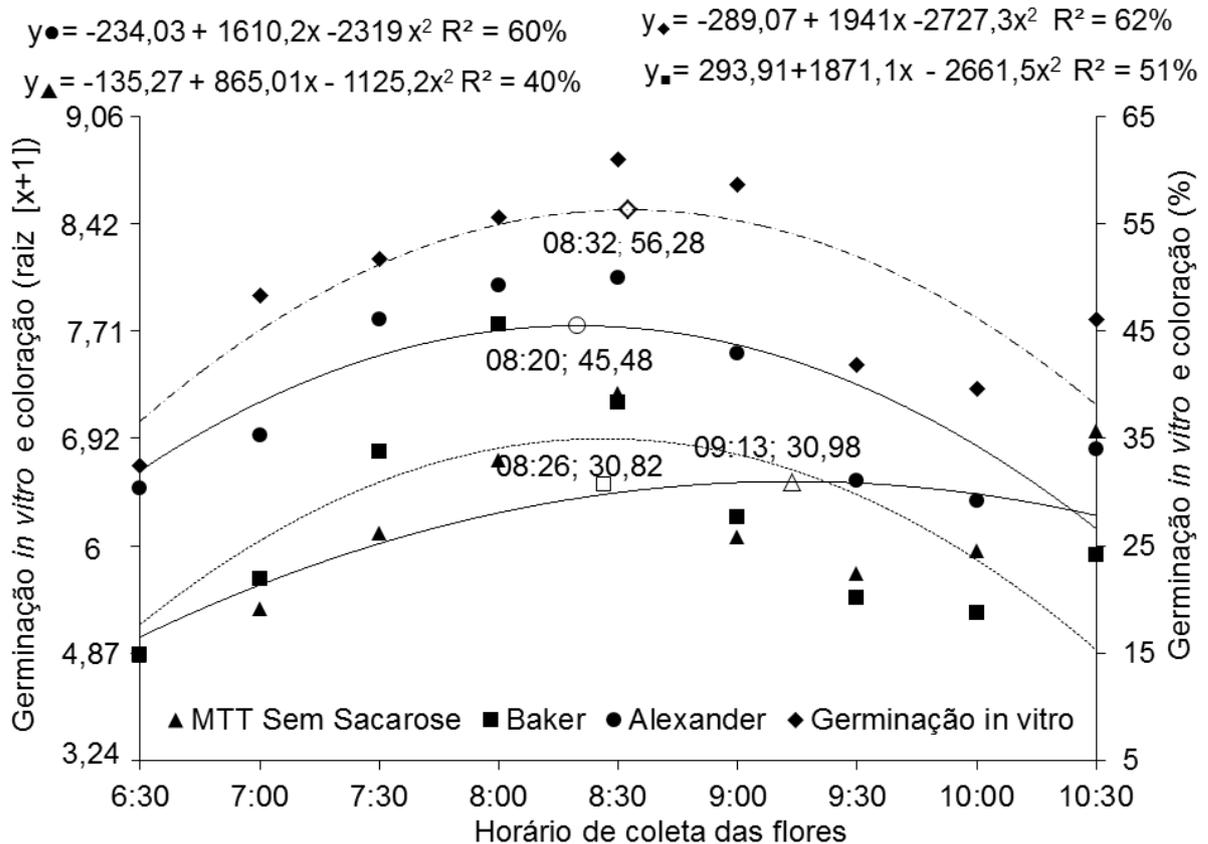


Figura 24 - Germinação *in vitro* e coloração de pólenes de *Arachis pintoi* cv. Ap7, em diferentes horários do dia. UFAC, Rio Branco, AC, 2015. (Análise de variância no APÊNDICE W).

De acordo com os resultados obtidos, observam-se que as maiores porcentagens de germinabilidade e viabilidade variaram de acordo com o horário de coleta e genótipo avaliado. De maneira geral, a viabilidade decresceu ao longo do dia em todos os genótipos. O melhor horário de coleta das flores para a maioria dos genótipos foi entre 7h00 e 9h00 da manhã. Isso pode estar associado a fatores ambientais, principalmente envolvendo o aumento da temperatura no momento da coleta das flores. De acordo com Souza et al. (2002), à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen diminui, e conseqüentemente, reduz sua eficiência na fertilização.

Não foram encontrados trabalhos na literatura com leguminosas, comparando a viabilidade polínica em diferentes horários de coleta. No entanto em gramíneas como o milho, por exemplo, Costa et al. (2012) compararam a viabilidade polínica em diferentes genótipos e horários de coleta utilizando-se a solução de Alexander. Esses autores observaram diferentes respostas de viabilidade de acordo com o genótipo e horário de coleta (COSTA et al., 2012).

Chabdran e Pandya (2003), em estudos específicos sobre a morfologia e a germinação do pólen entre espécies de *Arachis*, observaram que a taxa de crescimento do tubo polínico mostrou-se muito variável entre as espécies e genótipos, podendo isso ser um indicativo de incompatibilidade entre eles. No presente estudo, as taxas de crescimento do tubo polínico também variaram conforme o genótipo.

De maneira geral, os efeitos da temperatura sobre a germinação *in vitro* de pólenes, parecem ser dependentes da cultivar ou espécie avaliada como afirmaram Sukhvibu et al. (2000), por isso em alguns acessos a germinação foi maior em determinados horários de coleta, enquanto que em outros independente do horário, ocorreu baixa porcentagem de germinação *in vitro*.

Quanto a viabilidade, esta foi semelhante a germinação *in vitro* na maioria dos genótipos. De acordo com Galleta (1983), a diferença de valores de 10 a 20% dos grãos de pólen viáveis, entre as técnicas de coloração e germinação é considerada comum e, devem-se mais a diferença de superestimação e de subestimação entre os métodos. Sendo assim, os corantes que mais se relacionaram com a germinação *in vitro* foram o Alexander e o baker, respectivamente, para os genótipos Alqueire-1, Ap8 e Ap56.

5 CONCLUSÕES

A suplementação do meio de cultura com 200 g. L⁻¹ de sacarose e 25 mg.L⁻¹ de ácido bórico, é o mais indicado para a germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoi*.

Com a utilização da temperatura de 30 °C obtém-se a maior porcentagem de germinação *in vitro* nas culturas de pólen de amendoim forrageiro.

O uso dos corantes difeniltetrazólio (MTT) e Baker permitem a verificação da viabilidade do pólen semelhante à germinação *in vitro*.

A receptividade dos estigmas pode ser verificada utilizando-se tanto o peróxido de hidrogênio (3%) como o peroxtesmo ou corante Baker.

O armazenamento de pólenes de *A. pintoi* a - 22 °C assegura maior longevidade destes que aqueles armazenados a 10, 20 ou 33 °C.

A viabilidade, a germinabilidade polínica e a receptividade dos estigmas, decrescem ao longo do dia, sendo ambas maiores nas primeiras horas após o amanhecer. Portanto, realizando as hibridações nestes horários, assegura maior viabilidade e germinabilidade polínica. Dessa forma, é possível aumentar a eficiência das hibridações nos programas de melhoramento genético de *Arachis pintoi*.

REFERÊNCIAS

- ACRE. Governo do Estado do Acre. **Programa Estadual de Zoneamento Ecológico Econômico do Estado do Acre - Fase II: documento síntese - Escala 1: 250.000**. Rio Branco: SEMA, 2006.354 p.
- ADHIKARI, K. N.; CAMPBELL, C. G. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. **Euphytica**, México, n. 102, p. 87-92. May. 1998. Disponível em: <<http://download.springer.com/static/pdf>>. Acesso em: 17 set. 2013.
- ADJOLOHOUN, S.; BINDELLE, J.; ADANDEDJAN, C.; TOLEBA, S. S.; NONFON, W. R.; SINSIN, B. Reproductive phenology stages and their contributions to seed production of two *Arachis pinto* ecotypes (CIAT 17434 and CIAT 18744) in Sudanian savanna region of Benin, West Africa. **Agricultural Science Research Journal**, Ghana, v. 3, n. 6, p. 152- 157, jun. 2013.
- ALLAN, P. Pollen Studies in *Carica Papaya*. I. Formation, development, morphology and production of pollen. **South African Journal of Agricultural Sciences**, United kingdom, v. 6, p. 517-530, ago. 1963.
- ALCARAZ, M. L.; MONTSERRAT, M.; HORMAZA, J. I. *In vitro* pollen germination in avocado (*Persea americana* Mill.): Optimization of the method and effect of temperature. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 130, p. 152–156, ago. 2011.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. **Stain Technology**, Coimbatore, v. 62, p. 107-112, set. 1969.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Coimbatore, v. 55. n. 1, p.13-18, 1980.
- ALMEIDA, F. C. G.; SILVA, J. F. da; ALVES, J. F.; SILVA, F. P. da; ALMEIDA, F. A. G. Estudo da germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*: II efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.18, n.1, p.117-123, 1987.
- ALONI, B.; PEET, M. M.; PHARR, M., KARNI, L. The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. **Acta Physiologiae Plantarum**, Germany, v.112, n.4, p.505–512, ago. 2001.
- ANDRADE, C. M. S.; VALETIM, J. F. Adaptação, produtividade e persistência de *Arachis pinto* submetido a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n.3, p. 439-455, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v28n3/a01v28n3.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2013.
- ARAÚJO, S. A. C; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos Zootecnia**, Córdoba, v. 57, n. 1, p. 69-75, Fev. 2008. Disponível em: <http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/25_13_18_1122REVISIONAvaliacaoAraujo.pdf>. Acesso em: 12 set. 2013.

ARNAUD, F. La pollinisation assistée les plantations de palmier à huile. Réculte et conditionnement du pollen. **Oléagineux**, Paris, v.34, n.4, p.175-176. 1979.

ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: POLHILL, M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 723-69.

ASSIS, G. M. L. de.; VALENTIM J. F.; CARNEIRO, J. M. JR.; AZEVEDO, J. M. A.; FERREIRA, A. S. Selection of forage peanut genotypes for ground cover and aerial biomass production during e establishment period using mixed model methodology. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, p.1905–1911, nov. 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008001100001. Acesso em: 16 fev. 2015.

ASSIS, G. M. L. de; VALENTIM, J. F. Forage peanut breeding program in Brazil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 2., 2009, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. 1 CD-ROM.

ASSIS, G. M. L. de. Principais características de *Arachis pintoï* cv. BRS Mandobi. In: **Produção de sementes de Arachis pintoï cv. BRS Mandobi no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2011. (Sistemas de produção, 4). Disponível em: <http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaoSementesArachisAcre/principais_carac_mandobi.html>. Acesso em: 15 fev. 2015.

BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, New York, v. 66, p. 591-600, Oct. 1979.

BARBOSA, R. A. **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 206 p.

BARCELLOS, A. O.; ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T.; VILELA, L. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 17, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p.365-426.

BELTRATI, C. M. **Morfologia e anatomia de sementes**. Rio Claro: Departamento de Botânica da UNESP, 1994. 108 p.

BERTOZO, M. R. **Estudo da variabilidade genética das espécies de Arachis da secção Caulorrhiza e Krap. & Greg. Por meio de proteínas de reserva, isoenzimas e RAPD**. 1993. 133 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 1997.

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

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.

BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. Glossário de biotecnologia. Disponível em: < <http://www.conselhodeinformaçõessobrebiotecnologia.htm>>. Acesso em 15 fev. 2014.

BOU DAHER, F. **Actin cytoskeleton regulates pollen tube growth and tropism**, 2011, 229 f. (Doutorado em Biologia Vegetal) - Université de Montréal, Montreal, 2011.

BUENO, D. M.; CAVALCANTE, K. L. Estudo da viabilidade de grãos de pólen de flores de melão (*Cucumis melo* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, **17**, Belém, **Anais...** N.4, CBF, Belém, 2002.

CARVALHO, M. A. **Germplasm Characterization of *Arachis pinto* Krap. and Greg. (Leguminosae)**. 2004. 140 f. Tese (Doutorado em Filosofia)- University of Florida, 2004.

CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; PIO, R.; DALL'ORTO, F. A. C.; TIZATO, L. H. G.; SAITO, A.; CHAGAS, P. C.; SCARPARE FILHO, J. A. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus persica* (L.) *Batsch vulgaris*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 8-14, 2009.

CHANDRAN, K.; PANDYA, S. M. Relationships among species of *Arachis* based on morphology and germination studies of pollen grains. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n.133, p.22-26, 2003.

CIOTTI, E. M.; BERG, C. H.; CAUTELAN, M. E. Efecto Del encharcamiento temporário sobre el rendimiento y La nodulación de *Stylosanth esguianensis* y *Arachis pinto*. **PasturasTropicales**, Cali, v. 28, n. 1, p. 52-56, 2006.

CONAGIN, C. H. T. M. Desenvolvimento dos frutos nas espécies selvagens de Amendoim (*Arachis* spp.). **Bragantia**, Campinas, v.18, p.51-70, set. 1959.

COSTA, R. S.; MORO, F. V.; OLIVEIRA, J. C. Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata curtis*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n. 4, p. 956-961, abr. 2009.

COSTA, A.; ROMANI, I.; MAGALHAES, J. V.; BERTI, L. F.; MARTINS, W. J. ; GONELA, A. Efeito do horário de coleta sobre a viabilidade do pólen de milho (*Zea mays* L.). In: XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO - Diversidade e Inovação na Era dos Transgênicos, 2012, Águas de Lindóia - SP. ANAIS DO XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2012. p. 2751-2757.

CRESTI, M.; BLACKMORE S.; VAN WENT J. L. **Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants**, Springer, Berlin, 249p. 1992.

CRUZ, M. C. P. da; FERREIRA, M. E.; LUCHETTA, S. Efeito da calagem sobre a produção de matéria-seca de três gramíneas forrageiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.8, p. 1303-1312, ago. 1994.

CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 1, p. 82-87, 2012.

CUSTÓDIO, A. R. **Relações de cruzabilidade entre espécies e acessos de germoplasma do gênero *Arachis* associados ao genoma B do amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) –Departamento em Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

da LUZ, C. L.; SCHUELTER, A. R.; da LUZ, C. L.; DAL'MASO, A.; VIEIRA, E. S. N.; BARRETO, R. R. Germinação in vitro de grãos de pólen e efeito da proteção das plantas na frutificação de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 539-545, 2008.

DAFNI, A.; **Pollination ecology**: a practical approach. IRL, Oxford, 1992.

DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, Germany, n.11, p 117-180, jul. 1998.

DAMASCENO JUNIOR, P. C., PEREIRA, T. N. S., PEREIRA, M. G., SILVA, F. F. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ceres**, Rio de Janeiro. n. 55, v. 5, p. 433-438, set. 2008.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; MALAGI, G. Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jaboticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, vol.33, n.2, pp. 345-352. Jul. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33n2/aop06211.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2014.

DANTAS, A. C.; PEIXOTO, M. L.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n. 3, p. 356-359, dez. 2005.

de BEER J.F. Influences of temperature on *Arachis hypogaea* L. with special reference to its pollen viability. Thesis, **State Agricultural University**, Wageningen, The Netherlands, 1963.

DEBBARAMA, C.; KHANNA, V. K.; TYAGI, W.; RAI, M.; MEETEI, N.T. Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Capsicum*. **Agrotechnology**, Foster, v.3, dez. 2013.

dela CRUZ, R., SUÁREZ, S., FERGUSON, J. E. The contribution of *Arachis pinto* as a ground cover in some farming systems of Tropical America. In: KERRIDGE, P. C. e HARDY, B. (Ed.). **Biology and Agronomy of Forage *Arachis***. Cali, Colombia: CIAT, Chapter 9, p.102-108.1994.

DERIN, K.; E. T. I, S. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal Pollination ecology of Agriculture and Forestry**, Çucurovav, v. 25, p. 169-173, nov. 1999.

DUNNETT, C. W. New tables for multiple comparisons with a control. **Biometrics**, Washington, v. 20, n. 3, p. 482-491, set. 1964.

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, jul. 2000.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p. 5-7, Abr. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v28n1/29678.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

ENDO, M.; TSUCHIYA, T.; HAMADA, K.; KAWAMURA, S.; YANO, K., OHSHIMA, M.; HIGASHITANI, A., WATANABLE, M., KAWAGISHI-KOBAYASHI, M. High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. **Plant Cell Physiology**, Japan, v.50, n.11, p.1911–1922, out. 2009.

ERICKSON, A. N.; MARKHART, A. R. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. **Plant, Cell and Environment**, Cambridge, v. 25, n. 1, p. 123-130, Jan. 2002.

FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade Federal de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) –Universidade de São Paulo, 2009.

FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. R.; ALVIM, P. O.; SILVA, T. T. A. Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO, 26, 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABMS/EMBRAPA-CNPMS, 2006.

FERREIRA, C. A.; VON PINHO, E. V. R.; ALVIM, P. O.; ANDRADE, V.; SILVA, T. T. A.; CARDOSO, D. L. Conservação e determinação da viabilidade de grãos de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete lagoas, v. 6, n. 2, p.159-173, abr. 2007.

FERREIRA, D. F. **SISVAR: a computer statistical analysis system**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FIGUEIREDO, M. A. **Descrição floral, polínica e carpométrica de cultivares de amoreira-preta**. 2013. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Lavras, Lavras : UFLA, 2013.

FONSECA, D. M.; SANTOS, M. E. R.; MARTUSCELLO, J. A. Importância das forrageiras no sistema de produção. In: FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. p. 13-29.

FONSECA, J. W. S. **Sistema reprodutivo de *Portulaca grandiflora* Hook com vistas ao melhoramento vegetal**. 2010. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2010.

FRANCA, L. V.; NASCIMENTO, W. M.; CARMONA, R.; FREITAS, R. A. Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. **Revista brasileira de sementes**, Londrina, vol. 32, n.1, p. 53-59, abr. 2010.

FREITAS, L. L. **Efeito da temperatura sobre a germinação in vitro de grãos de pólen em dois genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) - Universidade Estadual do Norte do Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

GALLETA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983.p. 23-47.

GOMES, P. R.; RASEIRA, M. do C.B.; BAUDET, L.L.; PSKE, S.T. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, Londrina, v. 25, n. 1, p. 14-17, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v25n1/19624.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2013.

GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R.J., BUNTING, A. H. **Advances in legume Science**, Kew, Royal Botanic Gardens, 1980. p. 469-481.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos – Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**, Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 131p.

GUDADHE, S. P.; DHORAN, V. S. Observations on pollen viability, *in vitro* pollen germination and pollen tube growth in *chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq. and *Asparagus officinalis*, L. **International Journal of Current Research**, n.4, p.22-27, 2012.

GUINET, P. H. **Advances in legume biology: agronomia evolution, and biology of pollen in Leguminosae**. Saint Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842p.

HAMMOONS, R. O. The origin and history of the Groundnut. In: SMARTT, J. **The Groundnut Crop: as scientific basis for improvement**. London: Chapman & Hall, 1994, Chap. 2, p.24-42.

HASSAN, M. A.; SRIVASTAVA, D. P. Floral biology and pod development of peanut studied in India. **Journal of the Indian Botanical Society**, Bangalore, v. 45, p. 92-102, 1966.

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

HEDHLY, A.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Global warming and plant sexual reproduction. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 30-36, 2008.

HEDHLY, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 74, p.9-16, dec. 2011.

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

HODGSON, L. M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at J.D.M. Keet Forest Research Station (Formerly Zomerkomst Forest Research Station): 3 - relative yield, breeding systems, barriers to selfing and general conclusions. **South African forestry journal**, Pretoria n. 99, p.53-58, set. 1976.

HOEKSTRA, F. A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 34, p. 221-225. Jul. 1975.

HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**. V. 93, p. 295-301. Marc. 2004

JAYAPRAKASH, P.; SARLA, N. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Pollen *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v. 52, n. 357 p. 851-855, 2001. Disponível em; <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/52/357/851.full.pdf>>. Acesso em 10 set. 2013.

JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; OLIVEIRA, E. D.; MARTINS, C. A. D.; SANTOS-SEREJO, J. N. Comportamento germinativo e viabilidade polínica de *Passifloras* oriundos de flores coletadas em diferentes estádios e horários. In: VI Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Búzios-RJ. **Resumos...** Campos dos Goytacazes-RJ: SBMP, 2011. v. 6. p. 1- 4.

JÓHANNSSON, M. H.; STEPHENSON, A. G. Effects of temperature during microsporogenesis on pollen performance in *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae). **International journal of plant sciences**, Pennsylvania, v. 159, p. 616-626, jul. 1998.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.

KAKANI, V. G.; PRASAD, P. V. V.; CRAUFURD, P. Q.; WHEELER, T. R. Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. **Plant, Cell and Environment**, Cambridge, v. 25, p.1651–1661, 2002. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3040.2002.00943.x/pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.

KAKANI, V. G.; REDDY, K. R.; KOTI, S.; WALLACE, T.P.; PRASAD, P. V. V.; REDDY, V.R.; ZHAO, D. Differences *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of botany**, v.96, p. 59-67, 2005.

KARAKAYA, D. Effects of inflorescence on pollen viability and morphology of strawberry (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Science and Technology**, V.1, p.43-47. 2011.

KARNI, L.; ALONI, B. Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.): Possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO₂ enrichment. **Annals of Botany**, England, v.90 n.5, p.607-612, nov. 2002.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 579 p, 1993.

KHATUM, S.; FLOWERS, T. J. The estimation of pollen viability in rice. **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v. 46, p.151–154, Sep. 1995.

KIM, H. Y.; HORIE, T.; NAKAGAWA, H.; WADA, K. Effects of elevated CO₂ concentration and high temperature on growth and yield of rice. II. The effect of yield and its component of Akihikari rice. **Japanese Journal of Crop Science**, v.65 p.644-651, 1996.

KOTI, S.; REDDY, K. R.; REDDY, V. R.; KAKANI, V. G.; ZHAO, D. Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v. 56, n. 412, p. 725-736, feb. 2005.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, p. 1-186, 1994.

KUMAR, S.; THAKUR, P.; KAUSHAL, N.; MALIK, J. A.; GAUR, P.; NAYYAR, H. Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59. p.823-843, 2013.

LEITE, V. do S. **Determinação do grau de heterozigose de progênes do acesso BRA 041122 da espécie *Arachis pinto* Krapov. & Gregory por meio de marcador molecular SSR. 2008.** 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

LIMA, J. A.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R. **Amendoim forrageiro (*Arachis pinto* Krapov. & Greg)**. 2003. UFLA/CNPq. Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/upload/boletim/extensao-tmp/boletim-extensao-001.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

LINS, L. C. R. de; SOARES, T. L.; COSTA, M. A. P. de C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SILVA, S. de O. e. Viabilidade de grãos de pólen de bananeira com diferentes corantes. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 4., 2010, Cruz das Almas. [**Anais...**] Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 190). 1 CD-ROM.

LINSKENS, H. F.; CRESTI, M. The effect of temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers. **Proc. K. Ned. Akad. Wet.**, Amsterdam, v. 91, p. 369-375, 1988.

LOGUERCIO, L. L. Pollen treatment in high osmotic potencial: a simple tool for in vitro preservation and manipulation of viability in gametophytic populations. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 65-70, Jan./April, 2002.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 67, p.101-104, Nov.1996.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARTINS, K. C. **Cruzabilidade, tamanho do genoma e viabilidade polínica em *Capsicum* sp.** 2014. 121 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, RJ, 2014.

MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dúbia* (H. B. K.) Mc Vaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo v.25, n. 4, p. 441-448, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v25n4/a08v25n4.pdf>> Acesso em: 15 out. 2013.

MENDES, M. da S. **Viabilidade do grão de pólen de *Solanum* spp.** 1994. 75 f. Dissertação (Mestrado em Fitomelhoramento) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 1994.

MENEZES, A. P. M. **Caracterização morfológica, divergência genética e correlação entre caracteres em genótipos de amendoim forrageiro.** 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal do Acre. Rio Branco, Acre, 2011.

MIRANDA, P. A., CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, v.38, p.29-33, 1990.

MONDAL, S.; GHANTA, R. Effect of sucrose and boric acid on *in vitro* pollen germination of *Solanum Macranthum* Dunal. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v.2, p.202-206, 2012.

MONTENEGRO, R.; PINZÓN, B. **Maní forrajero (*Arachis pinto* Krapovickas e Gregory):** Una alternativa para el sostenimiento de laganaderia en Panamá. Panamá: IDIAP, 1997. 20p.

MOTTEN, A. E. Autogamy and competition for pollinators in *Hepatica Americana* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 69, p.1296–1305, 1982.

MOREIRA, L. M. Aspectos fisiológicos e ambientais importantes para o manejo de forrageiras. 2001. Disponível em: <80 gro://www.sbz.org.br/scripts/comunidades/msgcontent.asp?ID=145&GroupID=49>. Acesso em 05 jun. 2013.

MOURA, H. C. P. **Caracterização da fenologia reprodutiva e da viabilidade gamética associada ao tamanho do botão floral em genótipos elite de mamoeiro (*Caricapapaya* L.).** 2012. 70 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P. E.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Caryca papaya* L.: Uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.31, n.2, p.209-214, abr./jun. 2008. Disponível em :<<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v31n2/v31n2a03.pdf>>. Acesso em 14 jun. 2013.

NASCIMENTO, W. M.; TORRES, A. C.; LIMA, L. B. Pollen viability in hybrid seed production off eggplant under tropical conditions. **Acta horticulturae**, Bélgica, p. 37-39, 2003.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**. Massimo Nepi, v. 72, p. 527-536, 1993.

NIETSCHKE, S.; PEREIRA, M. C. T.; OLIVEIRA, C.; DIAS, M. M.; REIS, S. T. Viabilidade dos grãos de polens de flores de pinheira (*Annona squamosa*) em diferentes horários. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 527-531, mar./abr., 2009.

NILES, W. L.; QUESENBERRY, K. H. Pollen germination of Rhizomapeanut cv. Florigraze. **Peanut Science**, Gainesville, v.19, p.105-107, Jul. 1992.

NORTON, R. B. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. **American Society of Horticultural Science**. v.89, p.132–134, 1966.

NUNES, C. F. **Polinização artificial e natural de atemóia cultivar “Gefner”, viabilidade do grão de pólen e correlação entre comprimento de flor e número de carpelos**. Janaúba. 2004. 55p. (Monografia de Conclusão de Curso) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2004.

OAKES A. J. Pollen behaviour in peanut *Arachis hypogaea* L. **Agronomy Journal**, v.50, n.10, p. 387-389, jul.1958.

OLIVEIRA, M. A. P; VALLS, J. F. M. Morphological characterization and reproductive aspects in genetic variability studies of forage peanut. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 299-304, Abr./Jun. 2003.

OLIVEIRA, M. A. P; VALLS, J. F. M. Produção de híbridos de amendoim forrageiro por meio de hibridação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 6, p.885-888, jun. 2002.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. de A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v.15, n.1, p.27-33, jul./set. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abb/v15n1/5158.pdf>>. Acesso em 14 set. 2014.

OLIVEIRA, S. K. L. de. **Viabilidade e armazenamento de grãos de pólen de cultivares de meloeiro (*Cucumis melo* L.)**. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Área de concentração Cultura de tecidos, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.

OLIVEIRA, T. da S.; VIEIRA, L. J.; PASSOS, R. R.; SANTANA, J. R. F. de.; MARTINS, M. L. L.; LEDO, C. A. da S.; ALVES, A. A. C.; SOUZA, F. V. D. Avaliação da receptividade de estigmas de *Manihote succulenta* spp. Flabellifolia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2012, Belém, PA. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, set. 2012.

OSBORN, N. M.; KEVAN, P. G.; LANE, M. Pollination biology of *Opuntia Polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. **Plant Systematics and Evolution**, 159: 85-94, set. 1998.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília, DF, 2004.

PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um foque para caracterização de germoplasma. In:CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADO A RECURSOS VEGETAIS, 2., 2004, Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2005. p. 37-39. (Documento, 154).

PAULA, C. M. P.; TECHIO, V. H.; BENITES, F. R. G.; SOBRINHO, F. S. Intra-inflorescence pollen viability in accessions of *Brachiaria ruziziensis*, **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 209-213, Apr/June, 2014.

PARZIES, H. K.; SCHNAITHMANN, F.; GEIGER, H. H. Pollen viability of *Hordeum* spp genotypes with different flowering characteristics. **Euphytica**, México, v. 145, p. 229–235, out. 2005.

PAULINO G. M.; ALVES B. J. R.; BARROSO D. G.; URQUIAGA, S.; ESPINDOLA J. A. A. Fixação biológica e transferência de nitrogênio por leguminosas em pomar orgânico de mangueira e gravioleira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.44, p.1598-1607, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v44n12/v44n12a06.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2014.

PELEGRIN, C. M. G.; VALLS, J. F. M.; MARIATH, J. E. A. Pericarp ontogenesis in wild species of *Arachis* L. (Leguminosae; Papilionoideae). *Flora* (208), v. 2 p. 118-127, 2013.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B. do; FERREIRA, R. de P.; MILES; J. W. Melhoria de Forrageiras Tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento - Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 549-601.

PEREIRA, J. M. Leguminosas forrageiras em sistemas de produção de ruminantes: Onde estamos? Para onde vamos? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 2002, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 2002, p. 109-148.

PFAHLER, P. L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium e boron effects. *Canadian Journal of Botany*, Toronto, v. 45, n. 6 p. 839-845, 1967.

PICKERT, M. *In vitro* germination and storage of trinucleate *Arabidopsis thaliana* (L.) pollen grains. **Arabidopsis Information Service**, v.3, p.39-42,1988.

PIO, L. A. S.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol.31, n.1, pp. 147-153, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n1/v31n1a22.pdf>>. Acesso em 21 de Ago. 2014.

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A.G. Germinação in vitro de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Goiânia, v.10, n.3, p.293-296, 2004.

POLITO, V. S.; LUZA, J. G. Low temperature storage of pistachio pollen. **Euphytica**, México, v. 39, n. 3, p. 265-269, dec. 1988.

PRASAD, P. V. V.; CRAUFURD, P. Q.; SUMMERFIELD, R. J.; WHEELER, T. R. Effects of short episodes of heat stress on flower production and fruit-set of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v.345, p.777-784, abr. 2000.

PRASAD, P. V. V.; BOOTE, K. J.; ALLEN, L. H. Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.139, p. 237-251, out. 2006.

PRASAD, P. V. V.; BOOTE, K. J.; ALLEN JR, L. H. Longevity and temperature response of pollen as affected by elevated growth temperature and carbon dioxide in peanut and grain sorghum. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 70, p.51-57, jan. 2011.

RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; RUFINI, J. C. M. Produção de mudas de plantas frutíferas por semente. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 23, n. 216, p. 64-72, 2002.

REDDY, K. R.; KAKANI, V. G. Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v. 112, n. 2 p. 130-135, mar. 2007.

REIS, S. S. O.; AZEVEDO, J. M. A. de; SILVA, L. M. da; CUSTODIO, D. P.; SILVA, H. S. F. da; SANTOS, L. F. A.; ASSIS, G. M. L. de Receptividade do estigma de amendoim forrageiro ao longo do dia. In: **Congresso brasileiro de melhoramento de plantas**, Guarapari. Anais...Vitória: SBMP: Incaper, 2009. CD ROM.

RESSLAR, P. M.; GREGORY, W.C.A cytological study of three diploid species of genus *Arachis* L. **Heredity**, v.70, p.13-16, 1979.

RIGAMOTO, R.R.; TYAGI, A. P. Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. **South Pacific Journal of Natural Science**, v. 20.p. 30-33. Dec. 2002. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=SP02007.pdf>. Acesso em: 14 set. 2013.

RINCÓN, C. A.; CUESTA, M. P. A.; PEREZ, B. R. et al. Maní forrajero perenne (*Arachis pintoii* Krapovickas e Gregory): Uma alternativa para ganaderos e agricultores. Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario, 1992. 23p. (Boletín Técnico, 219)

RODRIGUEZ-RIANO, T; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sex Plant Reprod**, v. 12, p.241-244, maio 2000. Disponível em: <<http://www.plantstress.com/methods/2%20Pollen%20Staining%20-RodriguezDafni%202000.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2013.

SANTOS, R. C.; GODOY, I.J. Hibridação em amendoim. In: Borém, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, p.83-100.

SANTOS, R. C. dos; FILHO, P. de A.M.; BRITO, S. de F.M. de; MORAES, J. de S. Fenologia de Genótipos de Amendoim dos Tipos Botânicos Valência e Virgínia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 6, p. 607-612, jun. 1997.

SANTOS, A. C. S. dos; MAUÉS, M. M.; CORRÊA, F. da S. C. Viabilidade e germinação. In: Congresso Nacional de Botânica, 64., 2013, Belo Horizonte -MG. **Anais...** Belém- PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2013. Disponível em: <<http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumoin19795id3593.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

SATO, S.; PEET, M. M.; THOMAS, J. F. Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under chronic, mild heat stress. **Plant Cell Environment**, v. 23, p. 719-726, 2000.

SATO, S.; PEET, M. M.; THOMAS, J. F. Determining critical pre and post anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v. 53, p. 1187-1195, 2002.

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

SHAKED, R.; ROSENFELD, K.; PRESSMAN, E. The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of pepper in relation to their number and functioning. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 102, p. 29–36, 2004.

SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. **The angiosperm pollen**: structure and function. New Delhi: Wiley Eastern Ltd., 1985. 374p.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen Biology**: a Laboratory Manual. Oklahoma: Springer, 1992. 119 p.

SILVA, G. S. **Contribuição à taxonomia do gênero *Arachis*– secção *Arachis* à luz do estudo de espécies e híbridos interespecíficos**. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2008.

SILVA, M. M. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólenes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. 1996. 59 p. Dissertação (mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

SILVA, L. A. C da.; PAGLIARINI, M. S.; SANTOS, S. A.; VALLE, C. B do. Receptividade dos Estigmas de Acessos da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* *Luces*), Pantanal. 5º Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal. Corumbá, MS (2010). Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/869600/1/038R.pdf>> Acesso em: 27 de jan. 2015.

SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; MILES, J. W. Reproductive biology and the potential for genetic recombination in *Arachis*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. (Ed.). **Biology and agronomy of forage *Arachis***. Cali, Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1994. 209 p.

SMITH, B. W. *Arachis hypogaea*. Aerial flower and subterranean fruit. **American Journal of Botany**, New York, v. 37, p.802-815, dez. 1950. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2437758?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21106169770911>>. Acesso em: 12 de dez. 2014.

SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; ROSSI, M. L.; SOUZA, F. V. D. Morfologia e viabilidade de grãos de pólen de acessos silvestres de abacaxi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.10, p. 1744-1749, out. 2011.

SOUSA, P. J. S. Polinização em maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1994. p. 65-70.

SOUSA, V. A. de. **Manejo e viabilidade do pólenes de *Eucalyptus* spp.** 1988. 155 p. 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 romanzoffii* ana (S.) Cham) **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 86, p. 147-151, ago. 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* Sims *flavicarpa degener*). **Ciência Agrotecnica**, Lavras. v.26, n. 6, p.1209-1217, nov./dez. 2002.

SOUZA, M. D. A.; MACEDO, D. G. C.; SILVA, M. S A.; KARSBURG, I. V. Germinação *in vitro* e viabilidade do pólen de *Ceiba speciosa* A. St. Hil. (Malvaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 10, n. 18; p. 1854-1861, jul. 2014.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer - Verlag, 172 p. 1974.

SUKHVIBUL, N.; WHILEY, A. W.; VITHANAGE, V.; SMITH, M. K.; DOOGAN, V.J.; HETHERINGTON, S. E. Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, United Kingdom, v. 75, p. 64-68, jan. 2000.

SULLIVAN J. R. Pollination biology of *Physalis viscosa* var. *cinerascens* (Solanaceae). **American Journal of Botany**, New York, v.71, n.6, p. 815–820, jul. 1984.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Pulmman, v.48: p.46-491, jun. 1997.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Acta Scientiarum. Biological Science**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, Jan./Mar, 2006.

TIAGO, A. V.; ROCHA, V. D.; TIAGO, P. V.; LIMA, J. S.; ROSSI, A. A. B. Viabilidade polínica e receptividade estigmática em variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v.10, n.19; p. 1958, dez. 2014

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 5 n. 2, p. 99-114, Jun. 1949.

VALENTIM, J. F.; AMARAL, E. F. do C.; MELO, A. W. F de. L. **Zoneamento de risco edáfico atual e potencial de morte de pastagens *Brachiaria brizantha* no Acre.** Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2000a. 28 p. (Boletim de pesquisa, 29).

VALENTIM, J. F.; CARNEIRO, J. da C.; VAZ, F. A.; SALES, M. F. L. **Produção de mudas de *Arachis pintoi* cv. Belmonte no Acre.** Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2000b. 4 p. (Instruções técnicas, 33).

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Perspectives of grass-legume pastures for sustainable animal production in the tropics. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. 1 CD ROM.

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. de; RESENDE, R. M. S.; ASSIS, G. M. L. de; GODOY, R.; EUCLIDES, V. P. B.; SANTOS, P. M. Leguminosas cultivadas. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. da. (Ed.). **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 1111-1132.

VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. TENDÊNCIAS E PERSPECTIVAS DA PECUÁRIA BOVINA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 4, n. 8, jan./jun. 2009.

VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L. de.; SÁ, C. P. de. Produção de sementes de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) no Acre. **Amazônia: Companhia e desenvolvimento**, Belém, v. 4, n. 8, jan./jun. 2009.

VALÉRIO, R. J. Considerações sobre a morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu em alguns Estados do Centro e Norte do Brasil – enfoque entomológico. In: BARBOSA, R. A. (Ed.). **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2006. p. 135-150.

VALLS, J. F. M. Situação atual da coleta e utilização de germoplasma de espécies silvestres de *Arachis*. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3, 2001, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 105-108.

VALLS, J. F. M.; MAASS, B. L.; LOPES, C. R. Recursos genéticos de *Arachis* silvestre y diversidad genética. In: KERRIDGE, P. C. (Ed.). **Biología y agronomía de espécies forrageiras de Arachis**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1995. 227 p.

VALLS, J. F. M. Variability in the genus *Arachis* and potential forage uses. In: SPRINGER, T. L.; VANCOPPENOLLE, B.; WATANABE, I.; VAN HOVE, C.; SECOND, G.; HUANG, N.; MC COUCH, S. R. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. **Genome Manila**, v. 36, n. 4, p. 686- 693.Jul./Sep. 1993.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. Novas espécies de *Arachis* (Leguminosae).In: VEIGA, R. F. A.; BOVI, M.L.A.; BETTI, J.A.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B. SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 1., 1997, Campinas. **Resumos...** Campinas: IAC/Embrapa Cenargen,1997. 27 p.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON. New species of *Arachis* (*leguminosae*) from Brazil, Paraguay and Bolivia, **Bonplandia**, Corrientes, v. 14, n. 2, p 35-63, Jan./Feb. 2005.

VEIGA, P. O. A.; PINHO, R. G. V.; REZENDE, E. V. R. Meios de cultura para germinação de grãos de pólen de milho. **Revista Agrarian**, Dourados, v.5, n.17, p.206-211, jul. 2012.

WALTER, L. C.; STRECK N. A.; ROSA H. T.; KRUGER, C. A. M. B. Mudança climática e seus efeitos na cultura do arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 11, p. 2411-2418, nov. 2010

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

WANG, Q.; LU, L.; WU, X.; LI, Y.; LIN, J. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. **Tree Physiology**, Victoria, Canada, v. 23, p. 345-351, mar. 2003.

WOLTERS-ARTS, M.; LUSH, W. M.; MARIANI, C. Lipids are required for directional pollen-tube growth. **Nature**, v. 392, p. 818-821, abr.1998.

YOUNG, L. W.; WILEN, R. W.; BONHAM-SMITH. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. **Journal of Experimental Botany**, New Delhi, v. 55, n. 396, p. 485-495, Feb. 2004.

ZAMBON, C. R. **Meios de cultura para a germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.)**. 2014. 39 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

ZINN, K. E.; TUNC-OZDEMIR, M.; HARPER, J. F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, United Kingdom, v. 61, n. 7, p. 1959-1968, apr. 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Composição dos meios de cultura utilizados para a germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoii*, contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

Meio de cultura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Sacarose (g.L ⁻¹)	0	100	200	300	400	0	100	200	300	400	0	100	200	300	400	0	100	200	300	400	0	100	200	300	400
H ₃ BO ₃ (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	0	25	25	25	25	25	50	50	50	50	50	75	75	75	75	75	100	100	100	100	100

APÊNDICE B – Análise de variância da germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoii*, submetida a diferentes temperaturas, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos e 10 repetições.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão Linear	1	10.66803	10.66803	93.7586**
Regressão Quadrática	1	16.09791	16.09791	141.4804**
Regressão Cúbica	1	1.21455	1.21455	10.6743**
Tratamentos	3	27.98049	9.32683	81.9711
Resíduos	36	4.09615	0.11378	-
Total	39	32.07664	-	-
CV(%)	-	4,71	-	-

APÊNDICE C – Resumo da Análise de variância da germinação *in vitro* de pólenes de *Arachis pintoi* cv BRS ‘Mandobi’ em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico (H_3BO_3), provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 25 tratamentos quantitativos e 10 repetições

Fator de Variação	GL	SQ	QM	FC
H_3BO_3	4	285.189462	71.297365	85.051**
Sacarose	4	1348.167402	337.041850	402.057**
H_3BO_3 *Sacarose	16	285.712854	17.857053	21.302**
Resíduo	225	188.615870	0.83829	
Total	249	2107.685588	-	-
CV (%) =	-	27.38	-	-

APÊNDICE D - Análise do desdobramento da sacarose dentro do H_3BO_3 , referente a germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoi* em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico (H_3BO_3), provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 25 tratamentos e 10 repetições

Fator de Variação	GL	SQ	QM	FC
Sacarose /1	4	4.273792	1.068448	1.275*
Sacarose /2	4	466.856132	116.714033	139.228**
Sacarose /3	4	399.110352	99.777588	119.025**
Sacarose /4	4	398.934412	99.733603	118.972**
Sacarose /5	4	364.705568	91.176392	108.764**
Resíduo	225	188.615870	0.838293	-

APÊNDICE E - Análise de variância da germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoi* em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico (H_3BO_3), provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 25 tratamentos e 10 repetições (Desdobramento do H_3BO_3 dentro da sacarose)

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC
H_3BO_3 /1	4	0.277048	0.069262	0.083*
H_3BO_3 /2	4	269.602468	67.400617	80.402**
H_3BO_3 /3	4	273.722740	68.430685	81.631**
H_3BO_3 /4	4	26.569468	6.642367	7.924**
H_3BO_3 /5	4	0.730592	0.182648	0.218 ^{ns}
Resíduo	225	188.615870	0.838293	-

APÊNDICE F - Análise de variância da germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoii* em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 25 tratamentos e 10 repetições

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios				
		H ₃ BO ₃ /1	H ₃ BO ₃ /2	H ₃ BO ₃ /3	H ₃ BO ₃ /4	H ₃ BO ₃ /5
Regressão Linear	1	0,16*	132.4801**	101.6064**	13.8235**	0.132496 ^{ns}
Regressão quadrática	1	0,0099 ^{ns}	97.311**	105.3405**	0.6610**	0.009946 ^{ns}
Regressão Cúbica	1	0,0900 ^{ns}	33.5241**	61.9369**	10.5235**	0.465124 ^{ns}
Desvios de regressão	1	0,0171 ^{ns}	6.28714**	4.83891*	1.561377 ^{ns}	0.123026 ^{ns}
Resíduos	225	188.61587	0.838293	0.838293	0.838293	0.838293
Total	229	-	-	-	-	-
CV (%)					27,38	

APÊNDICE G - Análise de variância da germinação *in vitro* de pólenes de *A. pintoii* em meios contendo diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 25 tratamentos e 10 repetições

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios				
		Sacarose/1	Sacarose/2	Sacarose/3	Sacarose/4	Sacarose/5
Regressão Linear	1	0.1945**	19.2633**	17.6736**	32.8214**	712209**
Regressão quadrática	1	1.8400 ^{ns}	325.8010**	287.8898	245.1254**	284.316**
Regressão Cúbica	1	0.1459 ^{ns}	95.6093**	79.3525	109.3698**	61.0899**
Desvios de regressão	1	2.0934 ^{ns}	26.1825**	14.194**	11.6178**	5.5875*
Resíduos	225	0.8383	0.8383	0.8383	0.8383	0.8383
Total	229					
CV (%)					27,38	

APÊNDICE H - Análise de variância da viabilidade polínica de *A. pintoii*, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos e dez repetições

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	7	224,79660	32,11380	48.9869 **
Resíduos	72	47,20022	0.65556	-
Total	79	89.84672	-	-
CV (%)	-	8,92	-	-

APÊNDICE I - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica de *A. pinto*, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e 10 repetições

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	228.13780	28.51723	47.7469**
Resíduos	81	48.37794	0.59726	-
Total	89	276.51574	-	-
CV (%)	-	8.92	-	-

APÊNDICE J - Análise de variância da receptividade dos estigmas de flores de *A. pinto*, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 10 repetições

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	FC
Tratamentos	2	0.8971	0.44854	0.6222 ^{ns}
Resíduo	27	19.464	0.72087	-
Total	29	20.361	-	-
CV (%)	-	8.57	-	-

APÊNDICE k - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pinto*, em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e 10 repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	71.655803**	10.697462**	115.668714**	0.435323 ^{ns}
Regressão quadrática	1	0.291656 ^{ns}	1.12444 ^{ns}	24.963509**	23.613126**
Regressão Cúbica	1	0.139476 ^{ns}	0.511238 ^{ns}	1.019526 ^{ns}	33.97354**
Desvios de regressão	5	0.281539 ^{ns}	0.060416 ^{ns}	20.086817**	2.741221 ^{ns}
Resíduo	81	0.98825	0.345101	1.460666	2.473249
Total	89	-	-	-	-
CV (%)	-	16.65	8.64	22.41	25.83

APÊNDICE L - Análise de variância da receptividade dos estigmas de flores de *A. pinto*, em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e seis repetições

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	8	148.953349	18.6192	28.269**
Resíduos	45	29.639437	0.658654	-
Total	53	178.592786	-	-
CV (%)	-	9,97	-	-

APÊNDICE M - Análise de variância da receptividade dos estigmas de flores de *A. pinto*, em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e seis repetições

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC
Regressão Linear	1	129.44	129.44	196.52**
Regressão quadrática	1	11.371	11.371	17.264**
Regressão Cúbica	1	5.0618	5.0618	7.685*
Desvios de regressão	5	3.0834	0.6167	0.936 ^{ns}
Resíduo	45	29.639	0.6587	-
Total	53	-	-	-
CV (%)	-	9,97	-	-

APÊNDICE N - Análise de variância dos dados referentes ao armazenamento de pólen de *Arachis pinto* cv BRS 'Mandobi', provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos qualitativos cada um com dez repetições

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	FC
Temperaturas	3	1192.506328	397.502109	143.89**
Presença de sílica ou não	1	44.619578	44.619578	16.152**
Temperatura x sílica	3	58.228040	19.409347	7.026**
Resíduos	792	12187.887313	2.762484	-
Total	799	3483.241258	-	-
CV (%) =	-	49	-	-

APÊNDICE O - Análise de variância dos dados referentes ao armazenamento de pólenes de *Arachis pintoi* cv BRS 'Mandobi', provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos qualitativos cada um com dez repetições

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	FC
Temperaturas + sílica	3	758.906154	252.968718	91.573**
Temperaturas sem sílica	3	491.828214	163.942738	59.346**
Resíduos	792	2187.887313	2.762484	-
CV (%)		49		

APÊNDICE P - Análise de variância dos dados referentes ao armazenamento de pólenes de *Arachis pintoi* cv BRS 'Mandobi', provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos qualitativos cada um com dez repetições

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC
Sílica /-22°C	1	14.466934	14.466934	5.237*
Sílica /-10°C	1	82.394086	82.394086	29.826**
Sílica/33±1°C	1	3.813906	3.813906	1.381 ^{ns}
Sílica/20°C	1	2.172693	2.172693	0.786 ^{ns}
Resíduo	792	2187.887313	2.762484	
CV (%)		49		

APÊNDICE Q - Análise de variância dos dados referentes ao armazenamento de pólenes de *A. pintoi*, no período de 10 semanas, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos e 10 repetições

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC
Regressão Linear	1	1372.6	1372.6	619.729**
Regressão quadrática	1	155.57	155.57	70.237**
Regressão Cúbica	1	96.66	96.66	43.641**
Desvios de regressão	6	108.65	18.108	8.175**
Resíduo	790	29.639	0.6587	-
Total	799	1749.7	2.2149	-
CV (%)	-	43.87		-

APÊNDICE R - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pintoi* (cv. Ap55), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	77.66**	24.08**	15.19**	0.004 ^{ns}
Regressão quadrática	1	4.65**	1.16**	0.36 ^{ns}	0.70 ^{ns}
Regressão Cúbica	1	1.21 ^{ns}	2.24**	3.05 ^{ns}	1.86 ^{ns}
Desvios de regressão	5	1.22**	0.06 ^{ns}	0.97 ^{ns}	3.20**
Resíduo	63	0.25	0.16	0.87	0.58
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	6.49	5.79	15.75	11.72

APÊNDICE S - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pintoi* (cv. Alqueire-1), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	34.49**	3.47*	45.59**	2.35**
Regressão quadrática	1	0.31 ^{ns}	7.98**	12.35**	34.69**
Regressão Cúbica	1	1.72 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.51 ^{ns}
Desvios de regressão	5	2.42**	1.19*	1.55 ^{ns}	2.18**
Resíduo	63	0.37	0.35	0.94	0.27
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	8.96	8.87	16.71	7.73

APÊNDICE T - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pintoi* (cv. Ap8), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	45.05**	12.17**	146.39**	16.18**
Regressão quadrática	1	0.71 ^{ns}	1.04 ^{ns}	1.37*	0.78 ^{ns}
Regressão Cúbica	1	7.65**	2.97*	8.45**	1.38*
Desvios de regressão	5	1.38**	0.20 ^{ns}	0.52 ^{ns}	0.06 ^{ns}
Resíduo	63	0.25	0.23	0.19	0.21
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	7.61	7.79	8.75	6.37

APÊNDICE U - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pintoi* (cv. Ap56), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	6.61**	2.66*	0.57 ^{ns}	13.92**
Regressão quadrática	1	53.54**	23.83**	8.56**	41.20**
Regressão Cúbica	1	2.28 ^{ns}	0,007 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.37 ^{ns}
Desvios de regressão	5	2.87*	1.04**	0.71 ^{ns}	2.73 ^{ns}
Resíduo	63	0.45	0.17	0.27	0.25
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	10.98	6.35	7.06	8.38

APÊNDICE V - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pintoi* (cv. Ap57), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e 8 repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	6.18**	6.56**	10.78**	6.70**
Regressão quadrática	1	30.59**	10.58**	2.64**	9.80**
Regressão Cúbica	1	4.00**	2.34**	0.77 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Desvios de regressão	5	2.42**	1.09**	0.24 ^{ns}	0.48 ^{ns}
Resíduo	63	0.21	0.26	0.18	0.19
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	7.26	5.35	7.25	7.16

APÊNDICE X - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. repens* (cv. Ar67), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e 10 repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	4.62**	2.66*	1.32 ^{ns}	7.32**
Regressão quadrática	1	11.43**	23.83**	2.19*	6.44**
Regressão Cúbica	1	3.29**	0,007 ^{ns}	0.62 ^{ns}	0.63 ^{ns}
Desvios de regressão	5	3.89**	1.04**	0.21 ^{ns}	3.69*
Resíduo	81	0.45	0.17	0.27	0.25
Total	89	-	-	-	-
CV (%)	-	8.68	6.35	11.26	8.36

APÊNDICE Z - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pinto* (cv. Ap90), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	1.47*	12.35**	11.00**	1.39 ^{ns}
Regressão quadrática	1	13.76**	12.51**	0.65 ^{ns}	7.78*
Regressão Cúbica	1	0.003 ^{ns}	1.38 ^{ns}	2.43**	0.33 ^{ns}
Desvios de regressão	5	0.45 ^{ns}	0.38 ^{ns}	0.81 ^{ns}	0.57 ^{ns}
Resíduo	63	0.15	0.36	0.67	0.78
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	6.04	9.24	12.43	13.24

APÊNDICE W - Análise de variância da viabilidade e germinabilidade polínica do *A. pinto* (cv. Ap7), em diferentes horários de coleta, provenientes de um experimento realizado no delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos e oito repetições

Fator de variação	GL	Quadrados médios			
		Germinação	Alexander	MTT	Baker
Regressão Linear	1	0.21 ^{ns}	1.65*	10.25**	0.25 ^{ns}
Regressão quadrática	1	18.71**	16.35**	5.05*	29.60**
Regressão Cúbica	1	5.82**	6.11**	10.50**	17.56**
Desvios de regressão	5	1.04 ^{ns}	0.97*	1.64 ^{ns}	1.72*
Resíduo	63	0.48	0.32	0.83	0.57
Total	71	-	-	-	-
CV (%)	-	9.90	9.03	17.73	14.53