



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

Teogene Souza de Sá

**DINÂMICA DA VIABILIDADE DE PÓLEN DE MILHO EM**  
**POLINIZAÇÃO CONTROLADA SOB CONDIÇÕES**  
**SEMIÁRIDAS**

Petrolina

2024

**TEOGENE SOUZA DE SÁ**

**DINÂMICA DA VIABILIDADE DE PÓLEN DE MILHO EM  
POLINIZAÇÃO CONTROLADA SOB CONDIÇÕES  
SEMIÁRIDAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do *Campus* Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup> Vespasiano Borges de Paiva Neto.

Co-orientador: Dr<sup>o</sup> Plínio Tadeu Cristofolletti Junior

Petrolina

2024

S111d

Sá, Teogene Souza de  
Dinâmica da viabilidade de pólen de milho em polinização controlada sob condições semiáridas / Teogene Souza de Sá. – Petrolina-PE, 2024.  
xiii, 54 f.: il.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) -  
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias,  
Petrolina-PE, 2024.

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Vespasiano Borges de Paiva Neto.

Inclui referências.

1. Milho. 2. Tecnologia de sementes. 3. Citometria de fluxo. 4.  
Polinização. I. Título. II. Paiva Neto, Vespasiano Borges de. III. Universidade  
Federal do Vale do São Francisco.

CDD 633.15

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CAMPUS DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Teogene Souza de Sá

DINÂMICA DA VIABILIDADE DE PÓLEN DE MILHO EM POLINIZAÇÃO  
CONTROLADA SOB CONDIÇÕES SEMIÁRIDAS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovado em: 11 de Março de 2024

**Banca Examinadora:**

---

Vespasiano Borges de Paiva Neto, Doutor, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Orientador).

---

Plinio Tadeu Cristofolletti Junior, Doutor, Bayer do Brasil – Crop Science Co-orientador).

---

Izaias da Silva Lima Neto, Doutor, Universidade Federal do Vale do São Francisco.

---

Jeronimo Constantino Borel, Doutor, Universidade Federal do Vale do São Francisco.

*Ao meu pai Nenzinho (in Memoriam)*  
*A minha mãe Marinilde*  
*A minha esposa Sabrina e a minha filha Maria Liz, com todo amor,*  
*dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal do vale do são Francisco, e ao programa de pós-graduação em Agronomia- Produção Vegetal - PPGA-PV da UNIVASF.

À empresa Bayer do Brasil, da qual tenho a honra de fazer parte. Obrigado pelas oportunidades de desenvolvimento, possibilitando o aperfeiçoamento profissional.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, resiliência e coragem. Obrigado por me dar sabedoria, e estar sempre comigo.

À minha amada esposa, Sabrina Gomes de Souza Sá, com quem tenho o prazer de dividir a vida. Obrigado pela compreensão, companheirismo, e amor incondicional. Você é a razão pela qual eu existo.

À minha filha Maria Liz Gomes de Sá, por me trazer um novo propósito de vida. Dizendo apenas “Aghuur”, me transformou como pessoa. Te amo, neném do papai.

Ao professor Drº Vespasiano Borges, pelos ensinamentos e compreensão ao longo dessa jornada emocionante chamada mestrado.

Ao professor Drº Evandro Alves, da Universidade Federal do Vale do São Francisco. Um maestro das derivadas. Obrigado pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao estimado colega Drº Plinio Cristofolletti. Obrigado por estar junto nesse desafio, e por compartilhar seu imenso conhecimento.

Aos mestres de formação que tive ao longo da vida, prof. Drº Delfran Batista; Drº Eliezer Santurbano (meu eterno orientador).

Ao meu amigo Jilcelio Nunes, por todos os bons momentos e boas risadas juntos.

Aos companheiros de caminhada, Vagner Pereira (Gatão) e Osmar Junior (Zoi furado). As pessoas mais inteligentes e esforçadas que conheci na vida.

Aos colegas de trabalho do time de Pre foundation, Maria Rosa e Talita Monteiro, obrigado pela parceria.

Aos colegas do time de Campo Externo da Bayer, o qual tenho o prazer de liderar: Alan Honorato, Alexandre Moreira e Renato Mendes. Obrigado!

Meus mais sinceros agradecimentos,

Grazie Mille!

## RESUMO

O milho (*Zea mays*, L.) é o terceiro cereal em escala de importância econômica a nível mundial. Toda cadeia de melhoramento do milho baseia-se no desenvolvimento de linhagens endogâmicas, onde a polinização controlada é um pré-requisito. Nesse contexto, a viabilidade de pólen é um fator determinante para garantir a máxima taxa de sucesso na produção das sementes. Com o objetivo de modelar a dinâmica da viabilidade do pólen em milho e a relação com as condições ambientais que definem a formação de sementes nas espigas em polinização controlada, foi empregado a tecnologia da Impedância em Citometria de Fluxo (IFC) em um experimento em blocos ao acaso, com 5 blocos e 6 horários de realização de polinização controlada, sendo 7:00 h, 9:00 h, 11:00 h, 13:00 h, 15:00 h e 17:00 h. A viabilidade do pólen foi máxima às 9:00 h da manhã, e decresceu ao longo do dia. O número máximo de sementes formadas por espiga ocorre quando a polinização controlada acontece no intervalo de máxima viabilidade do pólen. Em polinização controlada, atinge-se no máximo 22% do número de sementes potenciais produzidas em relação a polinização aberta. O valor limite de déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV) para a realização de polinização controlada em milho é 1,9 kPa, ou 4,2 kPa acumulado. A partir da análise aqui realizada, pode-se concluir que o ambiente de Petrolina apresenta janelas mais favoráveis para realização de polinização controlada em milho nos meses de maio, junho e julho. Os meses de setembro, outubro e novembro apresentam condições limitantes para manutenção da viabilidade do pólen.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, endogamia, citometria de fluxo, produção de sementes, autopolinização.

## ABSTRACT

Corn (*Zea mays*, L.) is the third largest cereal of economic importance worldwide. The entire corn improvement chain is based on the development of inbred lines, where controlled pollination is a prerequisite. In this context, pollen viability is a determining factor in ensuring the maximum success rate in seed production. With the objective of modeling the dynamics of pollen viability in corn and the relationship with the environmental conditions that define the formation of seeds in ears in controlled pollination, Impedance Flow Cytometry (IFC) technology was used in a block experiment randomly, with 5 blocks and 6 times for controlled pollination, being 7:00 am, 9:00 am, 11:00 am, 1:00 pm, 3:00 pm and 5:00 pm. Pollen viability was maximum at 9:00 am and decreased throughout the day. The maximum number of seeds formed per ear occurs when controlled pollination occurs in the range of maximum pollen viability. In controlled pollination, a maximum of 22% of the number of potential seeds produced is reached in relation to open pollination. The limit value of vapor pressure deficit in the atmosphere for carrying out controlled pollination in corn is 1.9 kPa, or 4.2 kPa accumulated. Though this study we shown that the Petrolina environment presents more favorable windows for carrying out controlled pollination in corn in the months of May, June and July. The months of September, October and November present limiting conditions for maintaining pollen viability.

**Keywords:** *Zea mays*, inbreeding, flow cytometry, seed production, self-pollination.



## Lista de Figuras

- Figura 1:** Temperatura máxima (T), mínima (t), precipitação (r), déficit de pressão de vapor (DPV) e umidade relativa média do ar (Ur) registradas durante a condução do experimento, novembro de 2023 a janeiro de 2024, Petrolina-PE. .... 32
- Figura 2:** Croqui da área experimental ilustrando disposição dos blocos e parcelas experimentais, Petrolina-PE. Foi utilizado uma bordadura (b) de 20 m em relação aos blocos. .... 33
- Figura 3:** Proteção das espigas (a), uniformização no comprimento do estilo-estigma (b, c) e polinização controlada em milho (d), Petrolina-PE. .... 34
- Figura 4:** Curva de liberação de massa de pólen em função da porcentagem de florescimento do pendão de linhagens de milho, Petrolina-PE. .... 35
- Figura 5:** Condições de déficit de pressão de vapor na atmosfera (VDP) (a), e Curvas de temperaturas máxima (T), mínima (t) e do ponto de orvalho (Td) (b) no período de avaliação do experimento. Os pendões foram cobertos às 10h da manhã do dia 03/01/2024 e a última polinização realizada às 17:00 horas do dia 04/01/2024. .... 39
- Figura 6:** Perda de viabilidade de pólen em função do horário de realização da polinização controlada (a). Letras distintas ao longo da curva, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância. Variação do déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV) de acordo com as horas transcorridas no dia (b). Correlação entre o déficit de pressão de vapor acumulado por hora e a viabilidade do pólen, a partir de 7:00 horas da manhã (c). .... 40
- Figura 7:** Caracterização morfológica dos grãos de pólen obtidos em microscopia eletrônica de varredura. Grão de pólen com formato esférico (viável) (a). Grãos de pólen com avaria na exina, e alteração no formato - murcho (inviáveis) (b). .... 42
- Figura 8:** Número de sementes por espiga de milho, em polinização controlada, em função do horário de polinização (a); Impacto do déficit de pressão de vapor acumulado (kPa) no número médio de sementes obtidas por espiga e na viabilidade de pólen com uso de polinizações aberta e fechada em milho (b). Letras distintas nas barras, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. .... 45

<b>Figura 9:</b> Número de sementes formadas por espiga em polinização aberta e controlada em milho, nos diferentes horários do dia, Petrolina-PE.....	46
<b>Figura 10:</b> Histórico das temperaturas máxima (T), mínima (t), e do ponto de orvalho (Td) (a). Histórico do déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV) de 2022 e 2023 (b). T e DPV médio diurno (7:00 às 17:00 h); t e Td média noturna (01:00 às 04:00 da madrugada). .....	47

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Características químicas e de fertilidade do solo da área experimental na qual o experimento foi implantado, Petrolina-PE.....	31
<b>Tabela 2:</b> Marcha de adubação realizada via fertirrigação durante a condução do experimento, Petrolina-PE.....	31

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Milho: Importância econômica</b> .....	16
<b>2.2 Classificação botânica</b> .....	17
<b>2.3 Gametogênese e viabilidade de pólen</b> .....	20
<b>2.4 Condições de clima e viabilidade de pólen</b> .....	24
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
<b>3.1 Variáveis avaliadas:</b> .....	34
3.1.2 Sementes por espiga em polinização controlada .....	34
3.1.3 Viabilidade do pólen .....	36
3.1.4 Sementes por espiga em polinização aberta.....	37
<b>4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>5.0 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

## **Declaração de conflito de interesse**

Para todos os fins, Teogene Souza de Sá e Plinio Tadeu Cristofolletti Junior são funcionários da Bayer Crop Science, a qual promoveu suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho, na forma de salários e equipamentos necessários, portanto, fica declarado que existem conflitos de interesse para a realização deste trabalho entre os autores e a Bayer Crop Science.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*, L.) é o terceiro cereal em escala de importância econômica mundial, tanto em produtividade como em área plantada (NAGY et al., 2020). A produção global atualmente encontra-se concentrada nos Estados Unidos, China e Brasil. Os três países juntos respondem por cerca de 66% do total produzido a nível global (USDA, 2023).

No Brasil, a produção de milho cresceu mais de 40% nos últimos dez anos, passando de 70 milhões de toneladas em 2012 para pouco mais de 138 milhões de toneladas na safra 2022/2023 (CONAB 2013; CONAB, 2022). De acordo com Pereira-Filho e Borgi (2020), cerca de 92,7% das lavouras comerciais de milho são plantadas com sementes híbridas.

A hibridação em milho ocorre com o cruzamento de duas linhagens homocigotas, geneticamente divergentes, obtidas por meio de ciclos de autopolinização (PATERNIANI et al., 2013). Autopolinizar uma planta de milho significa transferir o pólen do seu pendão para o estilo-estigma de maneira controlada, em uma única operação que dura em média 8 segundos.

Desse modo, o sucesso dos programas de melhoramento no desenvolvimento de novas cultivares híbridas, está condicionado aos resultados das etapas iniciais de desenvolvimento parental que ocorrem em polinização controlada (PATERNIANI et al., 2013; ONYISHI et al., 2018), e que dependem da viabilidade do pólen. Essa medida da fertilidade masculina durante o período reprodutivo é um fator determinante para garantir o sucesso na produção das sementes dentro e fora dos programas de melhoramento (ELAZAB et al., 2016; NAVEED et al., 2014).

Pólen viável pode ser definido como aquele que é capaz de transmitir o conjunto gênico do parental paterno ao saco embrionário, e que, portanto, consegue promover a formação das sementes (RECH et al, 2014).

As condições ambientais no momento de realização da polinização controlada são decisivas para viabilidade do pólen em milho (WANG et al., 2018; LIZASO et al., 2018). Entretanto, essa dinâmica ainda não é conhecida para o semiárido brasileiro.

Recentemente um novo método para a determinação da viabilidade do pólen foi descrito por Heidmann et al. (2016). A Impedância em Citometria de Fluxo (IFC) tem se mostrado uma tecnologia versátil, com alto potencial de aplicação na agricultura e no melhoramento genético de milho (ASCARI et al., 2020).

Trata-se de um método rápido e de leitura direta em display digital, que permite significativa economia de tempo para obtenção de resultados. Isso possibilita sua aplicação na tomada de decisão à nível de campo, considerando-se o cenário de máxima viabilidade de pólen para realização da polinização controlada (HEIDMANN & BERARDINO, 2017).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi aplicar a tecnologia de IFC na determinação da viabilidade de pólen em polinização controlada de milho, e modelar a relação da viabilidade de pólen com os parâmetros climatológicos, para definir limites operacionais nos quais se tenha a maior taxa de sucesso na formação das sementes de milho cultivado no semiárido.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Milho: Importância econômica

O milho (*Zea mays*, L.) é o terceiro cereal em escala de importância econômica a nível mundial, tanto em produtividade como em área plantada (NAGY et al., 2020). A produção global atualmente encontra-se concentrada nos Estados Unidos, China e Brasil. Os três países juntos respondem por cerca de 66% do total produzido a nível global, cujo montante produzido ultrapassou 1,15 bilhão de toneladas na safra 2022/23 (USDA, 2023).

O milho pode ser direcionado para vários segmentos de mercado, no qual apresenta grande impacto social e econômico. Segundo a Abimilho (2022), 36% do total de grãos consumidos no Brasil é destinado para a produção de rações, ressaltando a importância desse cereal para a cadeia de produção de proteína animal. Estudos mais recentes destacam também o potencial de uso deste cereal pelo setor sucroenergético, podendo atingir até 425 litros de álcool por tonelada de matéria-prima (NEVES et al., 2021).

No Brasil, a produção cresceu mais de 40% nos últimos dez anos, passando de 70 milhões de toneladas em 2012 para pouco mais de 138 milhões de toneladas em 2022/2023. Comparando-se a produtividade no mesmo período, nota-se incremento de quase 8% na média nacional, saindo de 5,13 toneladas/ha para mais de 5,92 toneladas/ha (CONAB 2013; CONAB, 2022).

Esse crescimento expressivo em volume produzido e em produtividade é estimulado por constantes inovações no ramo da biotecnologia, por meio do lançamento de tecnologias de proteção aos cultivos, bem como, pelo intenso trabalho dos programas de melhoramento genético para o desenho de novos híbridos mais adaptados e de maior potencial produtivo (DA SILVA et al., 2021).

O lançamento comercial do primeiro evento transgênico na cultura do milho no Brasil ocorreu em 2007, com a liberação comercial do evento Bt (*Bacillus thuringiensis*), conferindo às plantas proteção contra a herbivoria da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Dez anos após o lançamento, na safra 2017/2018, mais de 85% das áreas de milho híbrido cultivado no país já contavam com o apoio de algum evento transgênico,



de forma individual ou piramidado (RAMOS, 2018). Segundo a CTNBio (2019), apenas no ano de 2019, cinco novos eventos genéticos foram liberados para comercialização em híbridos de milho no Brasil.

De acordo com Pereira-Filho e Borgi (2020), atualmente no país, 92,7% das áreas comerciais de milho plantados são com sementes híbridas. Desse total, predomina a utilização de híbridos simples, com 86,4%; seguido por híbridos triplos, 5,8% e duplos com 3,9%. Nota-se dessa maneira, o relevante papel desempenhado pelos programas de melhoramento para a concepção de novos produtos ou inserção de novas tecnologias para atender as necessidades do mercado.

A hibridação em milho ocorre com o cruzamento de duas linhagens homocigotas, geneticamente distantes, para potencializar a expressão da heterose na geração subsequente (PATERNIANI et al., 2013). Desse modo, o desenvolvimento de novos híbridos depende do sucesso da cadeia de produção individual de seus genitores, que em muitas etapas do funil de hibridação são produzidos em regime de polinização controlada.

Polinização controlada é um pré-requisito para melhoramento genético de milho, sendo realizada com a finalidade de evitar cruzamentos indesejados, além de ser um passo essencial para o desenvolvimento de novas linhagens por meio do aumento da endogamia (PATERNIANI et al., 2013; ONYISHI et al., 2018).

Em milho, polinização controlada é também conhecida como polinização manual, em função de que a transferência do pólen para o estilo-estigma ocorre por meio da ação humana. A performance da atividade de polinização manual, que dura em média 8 a 10 segundos, define o sucesso dos programas de melhoramento, e é altamente influenciada por fatores ambientais como temperatura e umidade relativa do ar atmosférico (ONYISHI et al., 2018).

## **2.2 Classificação botânica**

O milho é uma planta alógama que pertence à família Poaceae, subfamília: Panicoidea, tribo: Maydeae, gênero: *Zea* e espécie: *Zea mays* L. O seu ancestral comum é conhecido como Teosinto (*Zea mays mexicana*) e estima-se que sua origem tenha

ocorrido há mais de 8000 anos a.C. no México, atual centro de diversidade da espécie (BORÉM, 2005).

É uma planta herbácea, de grande adaptabilidade e plasticidade fenotípica, que pode ser cultivada desde o Equador até altas latitudes, e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3600 metros, sendo a temperatura ótima para seu florescimento em torno de 30,5 °C (SÁNCHEZ et al., 2014).

Botanicamente o milho é uma planta monóica e díclina, possuindo os órgãos reprodutivos masculinos e femininos no mesmo indivíduo. Estes, encontram-se espacialmente separados no corpo da planta, sendo ambos classificados como inflorescências (MILLÉO & CRISTÓFOLI, 2017).

É uma planta de metabolismo C<sub>4</sub>, e desse modo, apresenta em sua estrutura a anatomia de Kranz, a qual situa o processo fotossintético em duas regiões da folha, sendo que a carboxilação ocorre somente nas células da bainha do feixe vascular (TAIZ et al., 2017). Segundo Crafts-Brandner & Salvucci (2002), a atividade da enzima Rubisco decresce na planta de milho quando a temperatura do ambiente ultrapassa 32,5 °C e cessa totalmente caso a temperatura atinja os 45° C. Dentre as culturas agrícolas, o milho é a espécie que apresenta a melhor eficiência na conversão de energia solar em alimento (MILLÉO & CRISTÓFOLI, 2017).

O milho possui raiz fasciculada, com profundidade efetiva de 40 cm (DE SOUZA, et al., 2016). O caule é um colmo ereto, esponjoso e não ramificado que apresenta-se segmentado em nós e entrenós (meritalos). As folhas possuem bordos serrilhados com uma nervura central destacada, bainha invaginante e pilosa, e limbo normalmente na cor verde escuro, estreito e de forma lanceolada. Cada planta de milho desenvolve aproximadamente 20 folhas, e o florescimento ocorre em média por volta de 65 dias após a emergência (PEREIRA et al., 2023; FREIRE, 2020).

A panícula (pendão) é a inflorescência masculina da planta, onde está o conjunto de flores que são responsáveis pela produção de pólen. Localiza-se no ponto apical da planta adulta em florescimento, e em híbridos de milho pode produzir até 50 milhões de unidades de grãos de pólen. Quando a panícula é emitida, o crescimento da parte aérea cessa e o crescimento radicular é bastante reduzido (FREIRE, 2020). Normalmente a

janela de florescimento do milho dura entre 8 e 10 dias, podendo haver encurtamento desse período em condições de estresse térmico e ou hídrico.

A espiga é a inflorescência feminina da planta. É constituída por um eixo central longo (sabugo) no qual se dispõem os alvéolos, onde se desenvolvem posteriormente as espiguetas aos pares. Cada espiguetas é formada por duas flores, uma fértil e outra estéril. Cada flor tem um ovário com um único óvulo e a partir do ovário desenvolve-se o estilo-estigma (FREIRE, 2020; PATERNIANI et al., 2013). O conjunto do estilo-estigma irá constituir o que se conhece como “cabelo” do milho.

O estilo-estigma pode ser considerado como uma estrutura especializada da planta para capturar e receber os grãos de pólen, permitindo a germinação e desenvolvimento inicial do tubo polínico. A superfície do estilo-estigma das diferentes espécies varia de acordo com a presença ou ausência de exsudados, podendo ser considerados como úmidos ou secos, sendo o milho um exemplar deste último grupo (BOAVIDA, 2005).

Em comparação com o pendão do milho, o estilo-estigma é muito mais resistente a condições de estresse térmico. Isso ocorre em função da posição da inflorescência feminina no corpo da planta, naturalmente protegida pela sombra das folhas, e também em função da expressão de proteínas no estilo-estigma que protegem os tecidos femininos contra danos decorrentes de altas temperaturas (WANG et al., 2018; LIZASO et al., 2018).

A polinização do milho se dá por meio da ação do vento que provoca a dispersão aleatória dos grãos de pólen dos pendões das plantas. Aproximadamente 95% da polinização do milho ocorre de forma cruzada. Especialmente, o pendão localiza-se distante e acima da espiga, como estratégia biológica para manter a alogamia.

O fruto do milho é classificado como cariopse, um fruto seco caracterizado pelo elevado conteúdo de carboidratos e proteínas. Na composição dos grãos o teor de carboidratos, proteínas e lipídios é de 71, 10 e 4,8%, respectivamente. Por esse elevado valor nutricional, este cereal constitui-se como a base da alimentação animal e humana (FERRARINI, 2004).

As sementes de milho podem ser encontradas em diferentes colorações, do amarelo, branco, preto até vermelho. Sua estrutura é formada por um endosperma, gérmen e pericarpo, a qual atinge sua maturidade fisiológica aproximadamente 125 dias após a emergência (DE SOUSA et al., 2023; LABEGALINI et al., 2016).

A grande maioria dos estudos disponíveis na literatura e citados no curso dessa dissertação derivam de pesquisas conduzidos milho híbrido. Para linhagens em específico, poucas informações são encontradas. Isso reforça a necessidade desse trabalho e expõe lacunas para que outros estudos possam ser conduzidos na abordagem desse tema tão fundamental para a produção de sementes a nível mundial.

### **2.3 Gametogênese e viabilidade de pólen**

O conhecimento dos mecanismos de reprodução e fertilização em plantas e sua aplicação prática na agricultura e na produção das sementes data de mais de 5000 anos, tendo iniciado com os sacerdotes Assírios. No entanto, a ideia de que o grão de pólen deve atingir o estigma para garantir a formação do embrião e desenvolvimento das sementes só foi generalizada e difundida a nível mundial a partir de 1682 (BOAVIDA, 2005).

Os primeiros relatos que tratam viabilidade de pólen como um limitador para a formação das sementes em milho foram escritos em 1943 (SCHOPER et al., 1987), onde foi evidenciado que ondas de calor no período de florescimento de híbridos de milho limitavam a produção de grãos nas espigas por efeito da dessecação precoce dos grãos de pólen.

Pólen viável é importante para a dispersão das espécies e garantia de existência de uma próxima geração. É essencial também para o melhoramento direto das plantas, e conseqüentemente, condiciona o desenvolvimento de novas cultivares. A viabilidade do pólen compreende diferentes aspectos do desempenho do pólen, como capacidade de fertilização e germinabilidade (RAFIQ et al., 2021).

O grão de pólen é o gametófito masculino da planta de milho, sendo composto por duas células, uma célula vegetativa, da qual posteriormente deriva a formação do tubo polínico, e uma célula generativa, da qual origina-se dois núcleos espermáticos (gametas

masculinos). Dessa maneira, o grão de pólen do milho é considerado trinucleado (ZHOU et al., 2017).

Em 1950 foi evidenciado pela primeira vez que o crescimento do tubo polínico ocorre dentro do estigma das flores, e que esse seria o canal de passagem para os núcleos espermáticos contidos no pólen (BOAVIDA, 2005). Em seguida, foi demonstrado que a ponta do tubo polínico se desintegra possibilitando a fusão dos núcleos espermáticos com o óvulo e com os núcleos polares no saco embrionário (CRESTI & LINSKENS, 1999).

Desse modo, tem-se origem um embrião diploide e um endosperma triploide na semente do milho, por meio de um processo conhecido como dupla fertilização das angiospermas (ZHOU et al., 2017, BOAVIDA, 2005).

Os grãos de pólen do milho possuem uma membrana muito fina com revestimento externo, denominada exina, resultando em baixa proteção ao seu conteúdo (ALMEIDA, 2011). Dependendo da cultivar e das condições ambientais, o número total de unidades de grãos de pólen produzidos em uma planta híbrida em pleno florescimento pode variar de 5 milhões até 50 milhões de unidades (HOFMANN et al., 2014).

Em condições favoráveis de florescimento e regime de polinização aberta, cada estilo-estigma recebe em média 13 unidades de grãos de pólen por dia, durante oito a dez dias de janela de florescimento. Entretanto, quando a planta é submetida a estresse térmico durante o florescimento, pode ocorrer a expressão de “blasting” (anomalia na deiscência da antera que impede a liberação do pólen) no pendão, com redução significativa desse número (SCHOPER et al., 1987).

Comparando-se com outras espécies, o grão de pólen do milho é relativamente grande, com diâmetro variando de 80 a 125  $\mu\text{m}$ . Sua velocidade média em queda livre e condição de ar calmo é de 0,2 m/s. Assumindo-se uma planta com altura entre 2,5 e 3,5 m, com pendão localizado no topo, o pólen tem potencial para se depositar em um raio de 20 a 40 metros no entorno da origem, considerando-se a velocidade do vento limitada em até 2 m/s (HOFMANN, et al., 2014).

A viabilidade do pólen é uma medida da fertilidade masculina durante o período reprodutivo, e é um fator determinante para garantir a produção das sementes em milho dentro e fora de programas de melhoramento (ELAZAB et al., 2016; NAVEED et al., 2014).

Mesmo já estando com o potencial produtivo definido quando atinge o florescimento, altas temperaturas nesse período condicionam baixa produtividade. Isso ocorre em função da dessecação e desnaturação das proteínas dos grãos de pólen, que se traduz em má granação nas espigas (ARAUS et al., 2012; SOUZA et al., 2016). Também pode ocorrer esterilidade das espiguetas induzida pelo excesso de calor (SHAO et al., 2021).

Pólen viável pode ser definido como aquele que é capaz de transmitir o conjunto gênico do parental paterno ao saco embrionário, e que, portanto, consegue promover a formação das sementes (RECH et al., 2014). Já a viabilidade do pólen é entendida como a relação entre o número de grãos de pólen viáveis e o número total de unidades avaliadas em uma amostra conhecida (HESLOP-HARRISON, 1992).

A viabilidade do pólen sofre influência de uma série de fatores. Efeito do manuseio durante a coleta de amostras, bem como efeito do estágio de maturidade do pendão da planta foram relatadas por Martins et al. (2017).

Diferenças na viabilidade também foram observadas considerando-se os dias após a antese do pendão, com tendência linear decrescente. De acordo com Alvin (2008), os grãos de pólen recém-formados apresentam maior viabilidade em relação ao pólen mais envelhecido. Isso ocorre em função de mudanças fisiológicas no grão de pólen, como alteração na velocidade de respiração e conversão dos açúcares em ácidos orgânicos. Também pode ocorrer alterações dos lipídeos da exina e inativação de enzimas e hormônios, além da perda de umidade para o meio externo que provoca dessecação (CRESTI & TIEZZI, 1992).

Para Ferreira et al. (2007) viabilidade do grão de pólen é dependente da interação entre fatores genéticos, climáticos, fisiológicos e agronômicos. Entre os fatores agronômicos, destaca-se a deficiência de micronutrientes como cobre, zinco e boro por

afetarem diretamente o crescimento do tubo polínico (WANG et al., 2003; ALVA, et al., 2015).

A morfologia do pendão, considerando-se a disposição das glumas na raque da inflorescência também afeta a manutenção da viabilidade do pólen. Isso ocorre em função do nível de exposição do pólen às condições do meio externo (MARTINS et al., 2017). Efeitos indesejáveis sobre o pólen decorrentes da interação com moléculas fungicidas aplicadas durante o período reprodutivo em milho híbrido também já foram documentados na literatura (JUNQUEIRA et al., 2016).

A viabilidade do pólen está relacionada de forma direta com o teor de umidade contido no grão de pólen, o qual é dependente da sua tolerância à dessecação (FONSECA & WESTGATE, 2005). Em termos gerais, pólen binucleados são classificados como tolerantes, enquanto pólen trinucleados, como no milho, são mais sensíveis quanto a perda de umidade interna para o ambiente externo, e conseqüentemente, não conseguem manter a viabilidade por longos períodos (ZHOU et al., 2017; KRON et al., 2021).

Outro aspecto importante a ser considerado quanto a acelerada perda de viabilidade em pólen trinucleados está na microsporogênese. Nesses indivíduos, ocorre uma segunda divisão meiótica para a formação do gameta masculino, o que consome parte das reservas e diminui a longevidade e capacidade de germinação (DINATO et al., 2020).

Diferenças na viabilidade de pólen em milho foram verificadas também considerando-se o horário de coleta desse material em campo (KAEFER et al., 2016; MARTINS et al., 2017; WANG, 2018). Maiores valores de viabilidade podem ser observados nas primeiras horas do dia, havendo tendência de decréscimo com o avanço das horas.

Condições externas como temperatura e umidade relativa do ar são decisivas na perda da viabilidade do pólen. Segundo Magalhães & Durães, (2006), temperaturas acima de 35 °C, como as que predominam no vale do submédio São Francisco, afetam diretamente a produção do pólen nas anteras e aceleram a perda da viabilidade por efeito da dessecação. Em linhas gerais, o pólen do milho se mantém viável por mais tempo em

condições de baixa temperatura e alta umidade relativa do ar (FONSECA & WESTGATE, 2005; WANG, 2018).

Em condições normais, o pólen do milho permanece viável por um período que varia entre uma e quatro horas, a contar do momento que se dispersa do pendão para a atmosfera (KAEFER et al., 2016; FERREIRA et al., 2007).

Luna et al. (2001) comprovaram que na faixa de temperatura entre 28 e 30 °C e umidade relativa acima de 53%, o pólen do milho permanece viável por apenas duas horas. Dentro desse curto intervalo, é onde pode-se alcançar o máximo de sementes por espiga em se tratando de polinização controlada de linhagens de milho.

#### **2.4 Condições de clima e viabilidade de pólen**

O conjunto de sementes produzidas por uma planta de milho é dependente de vários fatores, dentre os quais pode-se destacar o potencial genético, tamanho de pendão, crescimento do estilo-estigma, sincronia de florescimento masculino e feminino e viabilidade de pólen (DRESSELHAUS & FRANKLIN-TONG, 2013). Todos esses processos são afetados por estresse térmico, e quando ocorre, aumenta significativamente a complexidade na produção e condiciona redução de produtividade (WANG et al., 2018).

Quando o florescimento do milho coincide com períodos de temperaturas mais elevadas, ocorre redução no número de grãos de pólen produzidos. Também já é documentado que em tais condições o desenvolvimento das anteras é anormal, e frequentemente apresentam problemas quanto a deiscência (GIORNO et al., 2013).

A duração da janela de dispersão de pólen é encurtada em função da aceleração do florescimento da panícula, potencializando o risco de assincronia entre o florescimento masculino e feminino (LIZASO et al., 2018).

Alterações na morfologia do grão de pólen também podem ser verificadas, como espessamento de exina e desintegração de membranas (DJANAGUIRAMAN et al., 2014). O estresse térmico pode inibir também a germinação e crescimento do tubo polínico, tanto in vitro quanto in vivo, em condições de campo (SONG et al., 2015; WANG, 2018).



Para o próximo século é previsto um aumento da temperatura a nível mundial entre 1,5 e 4 °C, e como consequência, é esperado também elevação no déficit de pressão de saturação de vapor de água na atmosfera (DPV) (IPCC, 2014). Estudos com simulação de modelos indicam que a produtividade do milho pode reduzir em até 10% com o aumento da temperatura média no globo terrestre em apenas 1 °C (DONG, et al., 2021).

Ambos os fatores podem impactar significativamente a cadeia de produção e principalmente de melhoramento genético do milho, entretanto, a importância do déficit de pressão de vapor (DPV) é muitas vezes negligenciada ou confundida com a temperatura, devido a estreita correlação prática existente entre eles (HSIAO, 2019).

DPV é um indicador que faz referência ao poder de secagem exercido pelo ar atmosférico, definido como sendo a diferença entre a pressão gerada pela umidade relativa atual e a pressão gerada quando o ar atmosférico encontra-se saturado, ou seja, umidade relativa de 100% (HSIAO et al., 2019, LYRA et al., 2004).

Ao passo que as temperaturas mais altas afetam processos bioquímicos da planta como atividade enzimática, o DPV por outro lado influencia processos fisiológicos como aceleração da perda de água para a atmosfera, o que pode provocar fechamento estomático ou dessecação precoce dos grãos de pólen (HSIAO, 2019).

Segundo Çayli & Baytorun (2021), a condição de DPV ideal para as plantas depende do estágio de desenvolvimento e da espécie cultivada, sendo difícil definir um parâmetro de referência. Entretanto, de maneira geral, condições variando entre 0,2 e 1,2 kPa são consideradas satisfatórias para o desenvolvimento vegetal. Essa condição também é considerada desfavorável para o desenvolvimento de doenças nas plantas.

Níveis elevados de DPV tem um efeito negativo no crescimento das plantas, induzindo alta resistência estomática e gerando estresse. Existe efeito adverso também na condutividade do estroma, reduzindo a fotossíntese. O aumento no DPV de 1,0 kPa para 1,8 kPa leva à depressão da fotossíntese e, por sua vez, grandes reduções no crescimento de algumas plantas (ÇAYLI & BAYTORUN, 2021).

Segundo Ferreira et al. (2007), quando o teor de água no grão de pólen é inferior a 13%, ocorrem perdas na viabilidade em função da transição da fase de gel para a fase cristalina da membrana plasmática das células, demonstrando dessa forma o potencial efeito que o DPV exerce sobre o pólen.

O período reprodutivo do milho é considerado o estágio mais crítico do desenvolvimento da cultura considerando-se o risco de estresse por altas temperaturas (THAYIL et al., 2020). Os tecidos reprodutivos da planta, especialmente o pólen, são os mais impactados (LIN et al., 2022). Esse efeito é potencializado pelo baixo nível de umidade no ar atmosférico, causando elevação no déficit de pressão de saturação de vapor (DPV).

Quando posicionado nesse ambiente, a tendência do grão de pólen é perder água para entrar em equilíbrio com o meio externo. Dessa maneira, nota-se redução de umidade do pólen e consequente aceleração da perda de viabilidade (LOBELL et al., 2013; FONSECA et al., 2005).

Em programas de melhoramento genético de milho, considerando-se a dinâmica operacional para realização de polinização controlada distribuída numa jornada de trabalho de 8:00 horas por dia, faz-se necessário real entendimento do impacto da temperatura e DPV sobre a perda de viabilidade de pólen e como isso se relaciona com o número total de sementes formadas nas espigas em campo.

Tais estudos podem nortear o desenvolvimento de cultivares adaptadas para condições de cultivo com temperaturas e DPV mais elevados, principalmente em regiões tropicais em um cenário de mudanças climáticas. Também possibilita o planejamento operacional dentro dos programas de melhoramento do milho, visando a máxima taxa de sucesso na formação das sementes em polinização controlada.

## **2.5 Métodos de determinação da viabilidade de pólen em milho**

A viabilidade do grão de pólen pode ser determinada por diversas maneiras, seja por métodos diretos, como a técnica de indução à germinação *in vitro* (PIO et al., 2007) e *in vivo* (FERREIRA et al., 2007); ou por métodos indiretos, como a colorimetria (SANTOS et al., 2021) ou usando parâmetros citológicos (HEIDMANN et al., 2016).

A técnica de germinação do pólen *in vitro* já foi amplamente descrita na literatura e frequentemente aplicada para a cultura do milho. Em linhas gerais, amostras de pólen são postas em meio de cultura enriquecido com sacarose e boro, e em seguida é feita a quantificação em microscópio, considerando-se como viáveis os grãos de pólen nos quais houve formação do tubo polínico (MARTINS et al., 2017; NAVEED et al., 2014).

A determinação *in vitro* constitui-se de um método complexo e delicado, que exige intenso trabalho e boa estrutura laboratorial. Coloca-se ainda o tempo necessário para a obtenção dos resultados, que limita sua aplicação como parâmetro para rápida tomada de decisão em campo (HEIDMANN & BERARDINO, 2017).

Entre os fatores que podem provocar variações nos resultados destacam-se a composição e consistência do meio de cultura, o tempo de incubação e a temperatura do ambiente. Os meios de cultura de consistência mais líquida têm como desvantagem facilitar o desprendimento do tubo polínico, dificultando a avaliação e promovendo uma subestimativa da viabilidade polínica. Por outro lado, altas concentrações de sacarose podem servir como barreira física e impedindo a germinação do tubo polínico (DINATO et al., 2020).

De acordo com Ferreira et al. (2007), cada espécie requer um protocolo específico de meio de cultura para a obtenção de boa germinação do grão de pólen, e segundo Lin et al. (2022), o rendimento operacional das sucessivas contagens visuais ao microscópio limita a sua aplicação, destacando ainda a possibilidade de erro humano durante as contagens.

Outro aspecto importante a ser considerado está na limitada quantidade de unidades de grãos de pólen que normalmente são amostrados, ficando em média entre 50 e 100 unidades (FERREIRA 2007). Quando se considera o total de grãos de pólen potencialmente produzidos por uma planta de milho, essa pequena quantidade amostrada pode levar a conclusões imprecisas ou descoladas da realidade (HEIDMANN & BERARDINO, 2017).

Segundo Barnabás et al. (1988) a germinação *in vitro* é uma técnica que apenas simula condições do estigma, por meio da indução da germinação do tubo polínico em

meio de cultura. Mesmo apresentando alta correlação com a fertilização a campo, tende a superestimar a fertilização in vivo porque desconsidera a influência de fatores importantes para a fecundação como a receptividade do estigma, barreiras genéticas (dicogamia) e influência do ambiente externo no qual o pólen se encontra.

A determinação da viabilidade do pólen também pode ser feita pelo método da colorimetria. Nesses estudos, utiliza-se corantes nucleares como 2,3,5-trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio. O teste baseia-se na alteração da coloração dos tecidos, em presença de solução salina de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, o qual é reduzido pelas enzimas funcionais como a desidrogenase em tecidos vivos, resultando num composto chamado formazan, de coloração vermelha carmim (MARTINS et al., 2017).

Tecidos mortos apresentam-se descorados e, desta maneira, com uso de microscópio óptico, o padrão de coloração dos tecidos pode ser utilizado para classificar os grãos de pólen corados como viáveis e incolores como inviáveis (FERREIRA et al., 2007).

Apesar de ser um procedimento simples e de baixo custo, em alguns casos não reflete a real capacidade de germinação dos grãos de pólen viáveis que apresentam exina mais espessa e/ou mucilagínosa, dado que estes não se colorem. Desta forma, tende a apresentar subestimativas da viabilidade (HARSANT et al., 2013, ALMEIDA et al., 2011).

Em outros casos, existem também grãos de pólen que se colorem mesmo sendo incapazes de concluir a fecundação. Isso pode ocorrer em função de problemas no desenvolvimento do tubo polínico ou na dupla fecundação, podendo ocasionar superestimativas da viabilidade do pólen (ALMEIDA et al., 2011).

A determinação da viabilidade in vivo em milho é uma técnica antiga, e consiste em contar o número de sementes formadas nas espigas após polinização controlada com uma amostra de pólen conhecida (FERREIRA et al., 2007).

É um método preciso para tal medida, dado que considera a real interação entre o pólen e o estilo-estigma da planta, além de considerar os efeitos que o ambiente externo exerce sobre o pólen. Entretanto, é necessário esperar de 5 a 10 dias para a

obtenção dos resultados (HESLOP-HARRISON, 1992), o que limita sua aplicação como parâmetro para rápida tomada de decisão a campo.

Outro aspecto importante é que até mesmo na polinização in vivo não se estima a viabilidade com total segurança, já que fertilização e números de sementes na espiga não dependem só da viabilidade e da fertilidade do pólen, mas também do estado nutricional da planta-mãe, receptividade do estilo-estigma e das condições ambientais nas quais a polinização foi realizada (FERREIRA et al., 2007).

Recentemente um novo método para a determinação da viabilidade do pólen foi descrito por Heidmann et al. (2016). Esta técnica utiliza-se de chips microfluídicos em combinação com a Impedância em Citometria de Fluxo (IFC), e é baseado nas propriedades elétricas das células quando submetidas a uma corrente alternada. Variando a frequência da corrente, consegue-se obter informações sobre o tamanho da célula, integridade da membrana e condutividade citoplasmática.

A IFC tem se mostrado uma tecnologia versátil, que permite análises rápidas nos grãos de pólen em várias espécies de plantas, prometendo novas possibilidades de pesquisa na agricultura e no melhoramento genético (ASCARI et al., 2020).

Esta tecnologia tem demonstrado também confiabilidade e flexibilidade para estudar simultaneamente quantidade e viabilidade de pólen (HEIDMANN et al., 2016). Por meio dessa tecnologia é possível detectar pólen viável e inviável em várias culturas de interesse econômico, como milho, avelã, tomate, tabaco e pistache (ASCARI et al., 2020; ZHANG et al., 2019).

Em contraste com os métodos tradicionais, IFC determina a viabilidade por meio de um chip microfluidico, e analisa em alto rendimento os grãos de pólen por triagem em um método padronizado, capaz de avaliar até 10 unidades por segundo. IFC pode ser utilizado no campo ou em estufa para análise de pólen durante as várias etapas do melhoramento genético de milho (RAFIQ et al., 2021).

É um método simples, de leitura direta em display digital, e que permite significativa economia de tempo para obtenção de resultados, possibilitando dessa maneira a tomada de decisão à nível de campo, considerando-se o cenário de máxima

viabilidade de pólen para realização da polinização controlada em milho (HEIDMANN & BERARDINO, 2017).

Nesse método, em cada amostra consegue-se avaliar até 2.000 unidades de grãos de pólen, trazendo mais confiabilidade e aderência nos resultados. Por outro lado, é um método caro, e que demanda certo nível de investimento e treinamento técnico de recursos humanos (HEIDMANN et al., 2016). Entretanto, justifica-se para suportar os programas de melhoramento nas tomadas de decisão a nível de campo em operações envolvendo polinização controlada de linhagem de milho ou hibridação em pequena escala, principalmente se os programas estiverem sediados em ambientes que pode impactar a viabilidade do pólen, como é o caso de ambientes semiáridos.

Considerando as particularidades do vale do submédio São Francisco, é necessário modelar a dinâmica da viabilidade de pólen determinada por IFC e suas interações com as condições de clima que resulta na definição da granação nas espigas, a fim de definir estratégias para realização da atividade de polinização controlada em milho durante a jornada de trabalho e em diferentes períodos ao longo do ano.

### **3.0 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido em um campo de multiplicação de sementes de uma linhagem de milho em Petrolina-PE, posicionado geograficamente nas seguintes coordenadas: latitude de -9.30862; longitude de -40.634805 e altitude de 413 m. O clima da região é classificado como BSh, segundo zoneamento de Köppen (ALVARES et al., 2013).

O plantio do campo foi realizado de forma mecanizada no dia 13/11/2023, com densidade populacional de 95.000 plantas/hectare. Foi utilizado o espaçamento de 0,6 m entre linhas e 5,7 sementes por metro. Na adubação de fundação foram utilizados 26 kg de nitrogênio e 42 kg de fósforo.

A adubação da linhagem foi realizada considerando-se produção potencial de 10 toneladas por hectare. A análise de fertilidade do solo da área experimental, realizada antes do plantio, encontra-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características químicas e de fertilidade do solo da área experimental na qual o experimento foi implantado, Petrolina-PE.

Prof. cm	pH H <sub>2</sub> O	M.O. g Kg <sup>-1</sup>	P mg dm <sup>-3</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	(H + Al)	SB	V
				-----			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----			%
0-30	7,4	12,4	91,46	0,7	0,03	3,6	0,7	0,0	0,0	5,08	100

Prof.: profundidade; M.O.: matéria orgânica; Al<sup>3+</sup>: acidez trocável; (H + Al): acidez potencial; SB: soma de bases; V: Saturação por bases.

Como parâmetros físicos, a densidade aparente do solo da área experimental apresentou valor de 1,4 kg dm<sup>-3</sup> e a textura Franco-arenosa, com 799 g kg<sup>-1</sup> de areia, 83 g kg<sup>-1</sup> de silte e 117 g kg<sup>-1</sup> de argila.

As adubações complementares foram realizadas via fertirrigação considerando-se o desenvolvimento fenológico do milho conforme a Tabela 2.

**Tabela 2:** Marcha de adubação realizada via fertirrigação durante a condução do experimento, Petrolina-PE.

Fase Fenológica	Macro nutrientes (kg.ha <sup>-1</sup> )						Micronutrientes (kg.ha <sup>-1</sup> )					
	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Ca	Mg	S	Zn	B	Mn	Mo	Fe	Cu
P-V6	59	53	33,8	25	10	22	0,23	0,26	1,0	0,03	0,15	0,04
V7-R1	140	43,3	64,4	23,5	6,7	20,1	0,23	0,26	1,0	0,03	0,15	0,04
Total	200	96,33	98,26	48,59	16,74	42,13	0,46	0,52	2,00	0,06	0,30	0,08

\*P-V6: período do plantio até 18 dias após plantio (DAP); V7-R1: Período de 21 à 55 DAP.

Foi utilizado o sistema de irrigação por gotejamento, sendo um conduto para cada linha de plantio. Os emissores encontravam-se dispostos a cada 20 cm na linha, com vazão nominal de 1,06 L.h<sup>-1</sup>. O manejo da irrigação foi realizado por meio da demanda de evapotranspiração diária.

As variáveis meteorológicas como temperatura máxima (T), temperatura mínima (t) umidade relativa (Ur), temperatura do ponto de orvalho (Td), Chuva (r), e o déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV) foram coletadas em escala horária e armazenadas por meio de uma estação automática da marca Arable, instalada nas proximidades da área experimental.

A emergência das plantas ocorreu 4 dias após o plantio (DAP), com o estabelecimento de uma população de 94.200 plantas/hectare. O manejo de plantas

daninhas foi realizado em pré-emergência com aplicação de Atrazina. Em pós emergência foi utilizado o herbicida Glifosato, devido ao fato da linhagem ser resistente a esse herbicida. Ambas as aplicações (pré e pós emergência) seguiram as dosagens recomendadas nas bulas dos fabricantes.

O manejo de lagarta foi realizado via pulverização mecanizada de inseticida, sendo realizadas três aplicações até 35 DAP, considerando-se o nível de dano nas folhas das plantas (12 DAP foi utilizado a molécula Espinetoram; 22 DAP foi utilizado a molécula Clorantraniliprole e 35 DAP foram utilizadas as moléculas Indoxacarbe + Novaluron). Todas as aplicações seguiram as dosagens recomendadas pela bula dos fabricantes.

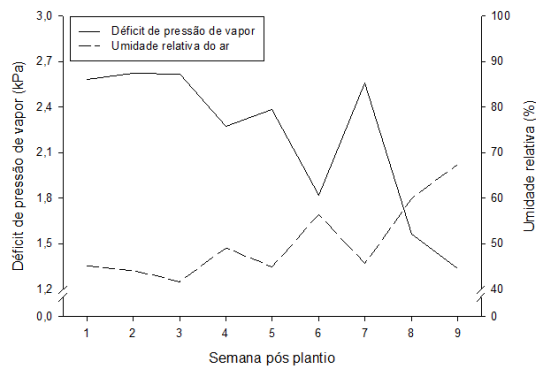
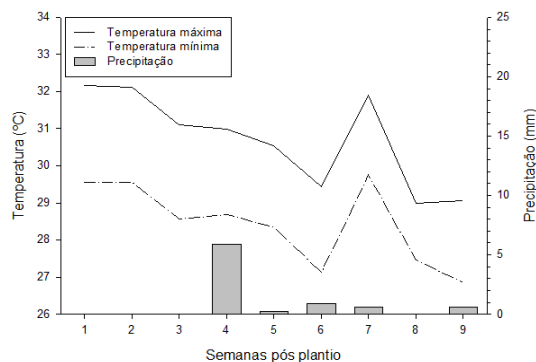
A antese dos pendões ocorreu com 51 DAP, apresentando uma média de 143 glumas, distribuídas ao longo de uma raque principal e uma ramificação secundária. A linhagem é um exemplar morfológicamente representativo do perfil genético do grupo de fêmeas, caracterizadas como materiais de pendão pequeno, e de difícil produção em polinização controlada.

Para mitigar possíveis efeitos indesejados na viabilidade do pólen, não foram realizadas aplicações de moléculas químicas (inseticidas, herbicidas e fungicidas) no intervalo de 16 dias que antecederam o pleno florescimento do campo.

O trabalho foi desenhado para que a janela de florescimento ocorresse em um mês com histórico de altas temperaturas, considerando-se a normal climatológica definida por Teixeira (2009) para a região de Petrolina-PE (Figura 1).

**Figura 1:** Temperatura máxima (T), mínima (t), precipitação (r), déficit de pressão de vapor (DPV) e umidade relativa média do ar (Ur) registradas durante a condução do experimento, novembro de 2023 a janeiro de 2024, Petrolina-PE.





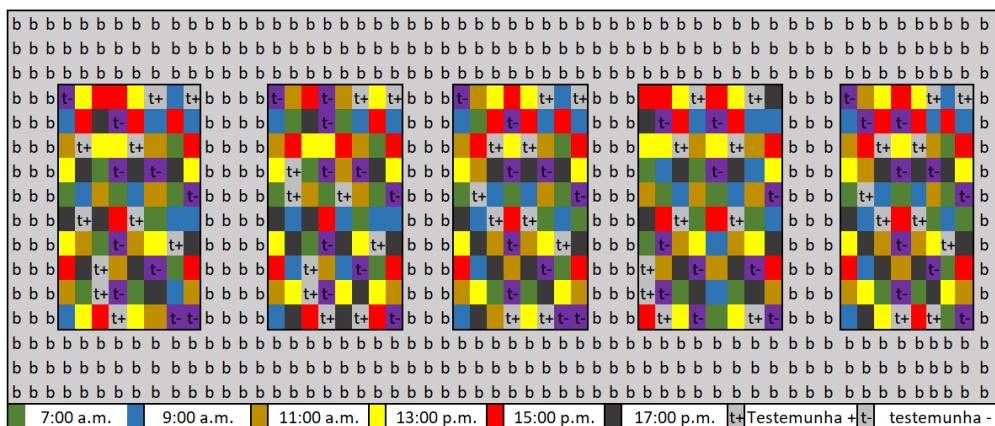
\*média diária considerando-se o período de 7:00 horas da manhã até 5 horas da tarde.

Volume de chuva acumulado em cada semana de desenvolvimento do experimento.

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, com 6 tratamentos e 5 repetições, totalizando 30 parcelas experimentais (Figura 2). Os tratamentos foram definidos como sendo os horários do dia para realização de polinização controlada, sendo: 7:00 h, 09:00 h; 11:00 h, 13:00 h, 15:00 h e 17:00 h.

Como testemunha positiva, plantas foram mantidas em regime de polinização aberta, expostas ao pólen 24 horas por dia, numa janela de 10 dias (polinização natural pelo vento). Como testemunha negativa, 10 espigas por bloco foram mantidas cobertas com saco plástico, sem exposição aos grãos de pólen.

**Figura 2:** Croqui da área experimental ilustrando disposição dos blocos e parcelas experimentais, Petrolina-PE. Foi utilizado uma bordadura (b) de 20 m em relação aos blocos.



Em cada horário definido para realização da polinização controlada, foram utilizados o DPV correspondente e o DPV acumulado (por hora) para análise e interpretação dos resultados, caracterizando desse modo o efeito da condição ambiental do momento em que se realiza a polinização manual.

Para a obtenção das taxas de variação da viabilidade do pólen em função dos tratamentos e da viabilidade do pólen em função do DPV acumulado, foi utilizado a primeira derivada da equação ajustada.

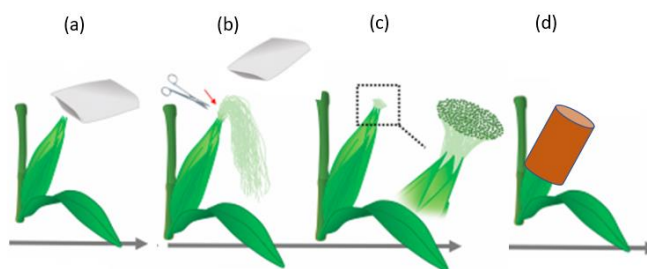
### 3.1 Variáveis avaliadas:

#### 3.1.2 Sementes por espiga em polinização controlada

Para a determinação do número de sementes formadas nas espigas, em cada tratamento, foi realizada a polinização controlada em 10 plantas para compor a média da parcela experimental.

As espigas das plantas foram cobertas com sacos plásticos aos 45 DAP, antes da emissão do estilo-estigma, a fim de evitar fecundação indesejada com pólen disperso na atmosfera (Figura 3a).

**Figura 3:** Proteção das espigas (a), uniformização no comprimento do estilo-estigma (b, c) e polinização controlada em milho (d), Petrolina-PE.



\*Adaptado de Si-Shen et al., (2018)

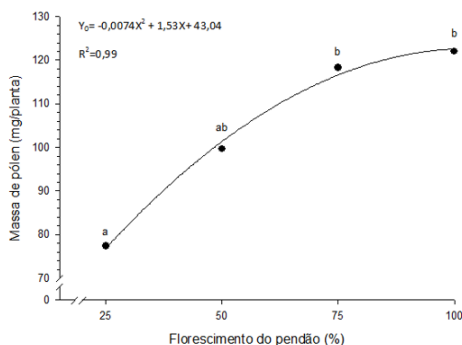
No dia anterior a realização da polinização manual, às 10 horas da manhã, foi realizado um corte perpendicular ao sentido do crescimento do estilo-estigma das espigas cobertas (Figura 3b). Esta prática teve por objetivo uniformizar o conjunto de estilo-estigma e mantê-los com o mesmo comprimento antes da transferência do pólen.

Na ocasião, também foi realizada a cobertura dos pendões das plantas com sacos de papel.

Os pendões selecionados para cobertura apresentavam uniformidade quanto ao tamanho e número de glumas, e que apresentavam 50% de florescimento, ou seja, 50% das glumas liberando pólen.

A Definição da porcentagem para cobertura foi realizada considerando-se a curva de liberação de massa de pólen do pendão de linhagens de milho (Figura 4).

**Figura 4:** Curva de liberação de massa de pólen em função da porcentagem de florescimento do pendão de linhagens de milho, Petrolina-PE.



\*Curva elaborada com oito diferentes linhagens de milho. Letras distintas na curva, indicam diferenças estatísticas significativas entre as médias, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A porcentagem de 50% das glumas liberando pólen é a mais utilizada na polinização controlada em programas de melhoramento de milho, por apresentarem maior chance de sucesso na granação das espigas e ser de fácil compreensão pelos trabalhadores no momento da cobertura. Embora a massa de pólen com o pendão 100% florescido seja maior, grande parte deste é pólen dos primeiros dias de florescimento, e normalmente encontra-se desidratado.

Os pendões foram cobertos com sacos de papel e mantidos em campo aderidos a planta mãe até o momento de sua utilização no dia seguinte, replicando-se o processo de polinização controlada executado em programas de melhoramento de milho. No dia

seguinte, nos horários estabelecidos pelos tratamentos, os pendões foram destinados para polinização manual e determinação da viabilidade do pólen.

No momento da realização da polinização controlada foi observado o aspecto de “pincel” no estilo-estigma (Figura 3c), permitindo máxima exposição aos grãos de pólen no momento da polinização manual.

O pólen foi extraído do pendão por meio de vibração manual, conforme protocolo para produção de sementes de milho em polinização controlada. Após a extração manual e ainda dentro do saco de papel, o pólen coletado foi transferido para o estilo-estigma. Este processo teve duração entre 8 e 10 segundos em cada planta.

Após esta etapa, a espiga foi mantida coberta com o saco de papel (Figura 3d), até o momento da análise da granação, 15 dias após a polinização. Nesse momento foi quantificado por contagem manual o número total de sementes formadas em cada espiga nos diferentes tratamentos, para posterior relação com a viabilidade de pólen e condição ambiental (DPV).

### 3.1.3 Viabilidade do pólen

Para a determinação da viabilidade do pólen em tempo real nos tratamentos, foi utilizado o citômetro de fluxo Ampha P20. O valor da viabilidade do pólen em cada parcela foi obtido através da média de quatro pendões. Também foi quantificado o número total de grãos de pólen analisados em cada amostra.

O pólen foi extraído do pendão por meio de vibração manual, conforme protocolo para produção de sementes de milho em polinização controlada, e depositado em uma folha de papel virgem. Em seguida, uma amostra do pólen foi coletada e acondicionada em um tudo de polietileno.

Posteriormente a amostra de pólen foi colocada em suspensão por meio da adição de 5 ml da solução “buffer” e logo após o pólen diluído passou por um filtro para retirada de impurezas físicas, sendo depositado em um tubo de ensaio e finalmente posto para leitura no Ampha P20 (HEIDMANN et al., 2016).

Os dados de viabilidade de pólen foram armazenados na memória do equipamento e exportados posteriormente. O tempo médio de análise de viabilidade foi de 25 segundos por amostra, com resultado exibido em display digital.

Para evitar interferência entre as várias análises ou entupimento dos condutos internos e do chip do Ampha P20, ao final de cada leitura foi realizada uma autolimpeza no sistema do equipamento, conforme recomendação de Heidmann & Berardino (2017).

A fim de caracterizar grãos de pólen viáveis e inviáveis, a morfologia da superfície do pólen foi investigada por meio de um microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM 1000), operando com uma tensão de aceleração de 10-20 kV.

Antes da observação, o pólen foi dividido em pequenas amostras e posto em uma bandeja metálica circular previamente limpa. Em seguida, uma fina camada de ouro foi depositada uniformemente sobre a superfície do pólen em condições de vácuo (Q150R ES Quorum®). Após isso, os grãos de pólen revestidos com ouro foram então examinados em microscópio eletrônico de varredura.

#### 3.1.4 Sementes por espiga em polinização aberta

Para a determinação do potencial máximo de produção de sementes da linhagem em estudo, 10 plantas em cada parcela experimental foram mantidas em regime de polinização aberta (testemunha). Nessas plantas, não houve cobertura de espigas e pendões e nem interferência manual no estilo-estigma.

A polinização se deu pelo vento, de maneira natural, com uma janela de pressão de pólen de 10 dias (período com liberação de pólen no campo). Após 15 dias do final da polinização, foi avaliada a quantidade média de sementes formadas nas espigas.

Dessa maneira, foi possível comparar o efeito do método de polinização (aberta x controlada) na fecundação dos ovários e consequente formação de sementes nas espigas, bem como comparar o efeito dos diferentes horários de polinização em relação ao máximo potencial produtivo da linhagem estudada.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk), transformados pela função  $x^2$  e em seguida, foi realizada a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e Skott-Knott, a 5% de

significância; também foram ajustados modelos de regressão. As análises estatísticas foram desenvolvidas no programa SISVAR, e os modelos de regressão ajustados no software SigmaPlot.

#### **4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As condições ambientais nas quais o experimento foi desenvolvido encontram-se na Figura 5. No momento da cobertura dos pendões no dia 03/01/2024, o DPV foi de 1,2 kPa, chegando ao valor máximo de 1,5 kPa às 13 h. A temperatura máxima no momento da cobertura foi de 29 °C, chegando a máxima temperatura diária de 30 °C às 12:00 h.

Nota-se na Figura 5b que a temperatura mínima noturna se iguala com a temperatura do ponto de orvalho durante alguns momentos na madrugada. Esse fenômeno provoca condensação do vapor d'água nas superfícies vegetais, o que pode ser considerado um limitante para polinização manual nas primeiras horas da manhã seguinte.

A ocorrência de chuvas bem como a formação do orvalho noturno, impactam diretamente na polinização controlada em milho. A presença de gotas de água provoca umedecimento das paredes dos sacos de papel utilizados para a proteção dos pendões, as quais passam a funcionar como adesivo para os grãos de pólen. Além disso, existe o risco que os sacos se desintegram durante o processo de extração manual do pólen, ocasionando perda da amostra ou contaminação indesejada.

Outro aspecto importante a ser considerado é que com excessiva umidade nos sacos de papel e no seu interior, ocorre um retardo no processo de liberação de pólen pelas anteras. Os mecanismos de deiscência das anteras e consequente liberação dos grãos de pólen em milho resumem-se em uma série de três eventos.

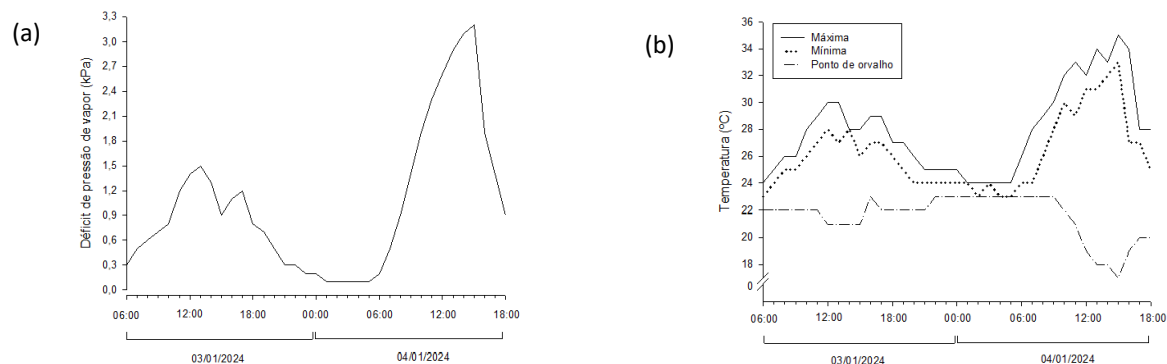
Primeiro as células dos septos existentes entre as tecas das anteras sofrem uma lise. Posteriormente, ocorre a ruptura do estômio pela tensão causada em função do aumento de tamanho dos grãos de pólen e, por fim, as membranas que compõem as paredes das anteras sofrem desidratação e se desintegram, permitindo a liberação dos

grãos de pólen na atmosfera. Hormônios como ácido jasmônico e giberelina são envolvidos na regulação do processo de deiscência (WILSON et al., 2011)

Todo esse processo é altamente influenciado pela umidade relativa do ar, tendendo a ser mais lento em condições de alta umidade e baixo DPV (WILSON et al., 2011). Portanto, após uma noite em que ocorreu a formação de orvalho, é esperado um retardo no início da dispersão de pólen no dia seguinte (ÇAYLI & BAYTORUN, 2021).

Na data de realização do presente trabalho, a condição de temperatura máxima, umidade relativa e DPV às 7:00 horas da manhã foi de 29 °C, 75% e 0,9 kPa, respectivamente. Nesse momento de polinização foi visualizada presença de orvalho nas superfícies das folhas das plantas e dos sacos de papel, os quais apresentavam-se com umidade excessiva limitando liberação do pólen pelas anteras. Desse modo, não foi possível realizar a extração de amostras para análise de viabilidade.

**Figura 5:** Condições de déficit de pressão de vapor na atmosfera (VDP) (a), e Curvas de temperaturas máxima (T), mínima (t) e do ponto de orvalho (Td) (b) no período de avaliação do experimento. Os pendões foram cobertos às 10h da manhã do dia 03/01/2024 e a última polinização realizada às 17:00 horas do dia 04/01/2024.



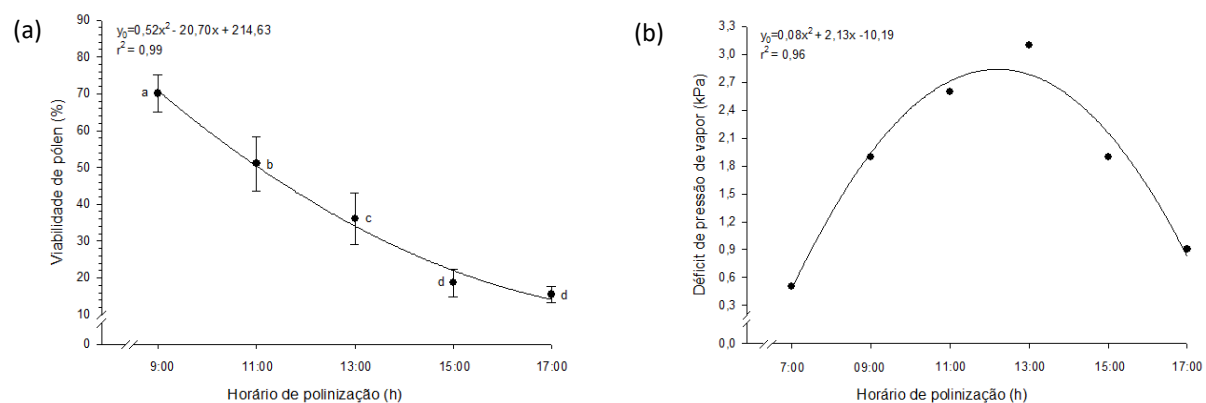
A temperatura ótima para a antese do pendão do milho é 30,5 °C, ocorrendo dispersão de pólen quando o DPV se encontra acima de 0,5 kPa (SÁNCHEZ et al., 2014; ÇAYLI & BAYTORUN, 2021). Entretanto, faz-se necessário a consideração de outras variáveis meteorológicas, como temperatura do ponto de orvalho durante a noite anterior, dado que essa condição limita a realização de polinização controlada na manhã seguinte.

O maior valor de DPV observado ocorreu em conjunto com a menor umidade relativa do ar, sendo ambos registrados às 13:00 h (Figura 6). O máximo DPV ocorrido foi de 3,2 kPa e a mínima umidade relativa foi de 38%. A máxima temperatura registrada no dia do experimento foi de 35 °C, ocorrendo às 14:00 h (Figura 6). Essas condições são consideradas desfavoráveis para viabilidade do pólen e granação das espigas (DONG et al., 2021; WANG et al., 2021).

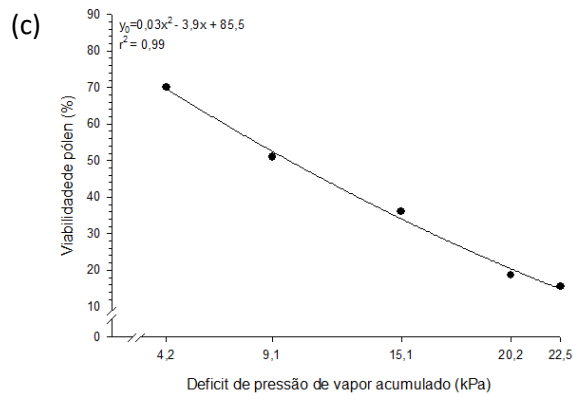
Houve diferença estatística significativa para a viabilidade do pólen nos diferentes horários de polinização, sendo observada uma tendência de decrescimento da viabilidade com o avanço das horas do dia (Figura 6a).

Na média, foram avaliados 1457 grãos de pólen em cada leitura de determinação de viabilidade, o que traz confiabilidade e aderência dos resultados com a realidade. O coeficiente de variação (cv) foi de 13,99%, e o modelo ajustado foi uma função polinomial de segunda ordem com  $r^2=0,99$ . A mesma tendência foi demonstrada por Ferreira et al., (2007), Kaefer et al., (2016) e Martins et al., (2017).

**Figura 6:** Perda de viabilidade de pólen em função do horário de realização da polinização controlada (a). Letras distintas ao longo da curva, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância. Variação do déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV) de acordo com as horas transcorridas no dia (b). Correlação entre o déficit de pressão de vapor acumulado por hora e a viabilidade do pólen, a partir de 7:00 horas da manhã (c).







Tal dinâmica indica a existência de intervalos temporais mais favoráveis ao longo do dia (início da manhã), com maior viabilidade de pólen e, portanto, com melhores chances de fecundação em polinização controlada. Por outro lado, mostra também a existência de uma zona temporal mais crítica (período da tarde), dado que o pólen se encontra com baixa viabilidade. Isso eleva o risco de não haver fecundação e formação das sementes.

Às 9:00 h da manhã, primeiro horário em que foi possível a extração do pólen para análise, a viabilidade foi a máxima observada no experimento, com valor médio de 70,06%, sendo esse valor estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Nesse momento o DPV foi de 1,9 kPa (Figura 6b), temperatura de 32 °C e a umidade relativa de 56%, configurando um bom indicativo para sucesso na fecundação, uma vez que tais condições são favoráveis para manutenção da integridade estrutural dos grãos de pólen, que no caso do milho, devem manter um formato esférico, como ilustrado na Figura 7a.

Ferreira et al. (2007) encontraram viabilidade de 60% para esse mesmo horário de coleta. Martins et al. (2017) em ensaio com diferentes híbridos, constataram diferença na viabilidade do pólen de acordo com genótipos, horários de coleta e dias após o início da antese do pendão. Foram observados valores máximos variando de 45 a 70% para o período das 08:00 h às 10:00 h da manhã.

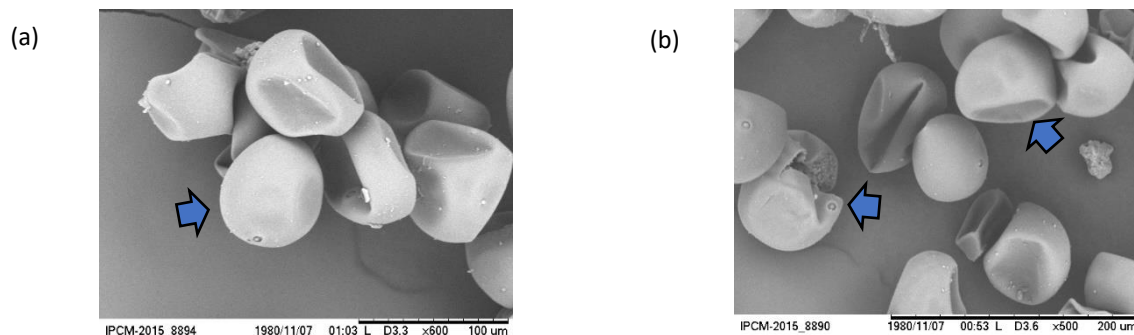
Às 11:00h da manhã a viabilidade do pólen reduziu para 50,98%, decrescendo a uma taxa média de 9,17% por hora e diferindo estatisticamente dos demais horários. Essa taxa de perda foi a maior registrada no experimento. Nesse momento a condição foi 2,6 kPa de DPV, temperatura de 32 °C e umidade relativa de 45%. Kaefer et al. (2016)

visualizaram tendência similar, porém com uma variação ainda mais acentuada. Segundo os autores, após uma hora em temperatura média em 32 °C e umidade relativa de 50%, o pólen perde praticamente metade do seu conteúdo de água, o que afeta drasticamente a viabilidade.

Às 13:00 h foi observado mais um decréscimo na viabilidade do pólen, chegando ao valor de 36,06% e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Nesse momento foi registrado o menor valor de umidade relativa do ar (38%) e, como consequência, o máximo DPV diário, na ordem de 3,2 kPa e temperatura de 33 °C.

De acordo com Wang et al. (2018) o número e tamanho dos grânulos de amido contidos no pólen diminuem com o aumento da temperatura, resultando em menor conteúdo de reserva. Ocorre também alterações na morfologia dos grãos de pólen, caracterizada por um enrugamento na superfície (DJANAGUIRAMAN et al., 2017) e ruptura na exina (Figura 7b).

**Figura 7:** Caracterização morfológica dos grãos de pólen obtidos em microscopia eletrônica de varredura. Grão de pólen com formato esférico (viável) (a). Grãos de pólen com avaria na exina, e alteração no formato - murcho (inviáveis) (b).



Elevadas temperaturas podem inibir a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico, sendo o milho particularmente suscetível a esses dois fatores (LIZASO et al., 2018; SONG et al., 2015). Dessa maneira, reflexos negativos são esperados para o número de sementes formadas em cada espiga.

Na figura 6 (c) observa-se a relação da perda de viabilidade do pólen em função do DPV acumulado, modelada com uma função polinomial de segunda ordem ( $r^2=0,99$ ).

A taxa máxima de variação foi de 3,89 % por kPa acumulado e ocorreu no intervalo entre 9:00 h e 11:00 h. Desse modo, verifica-se que quando ocorre a maior variação no déficit de pressão de vapor acumulado, é também quando ocorre a maior perda na viabilidade do pólen, evidenciando-se desta forma a dependência entre as variáveis.

As viabilidades do pólen determinadas às 15:00 e às 17:00 foram as menores observadas nesse trabalho, com valores de 18,62% e 15,48%, respectivamente. Embora havendo decréscimo com o avanço das horas, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre esses dois tratamentos. A temperatura às 15:00h foi de 34 °C, umidade relativa de 57% e DPV de 1,9 kPa. Às 17:00 h a temperatura foi de 28 °C, umidade relativa de 75% e DPV de 0,9 kPa.

A Figura 8 mostra a variável sementes por espiga em função dos tratamentos estudados e do método de polinização (aberta ou controlada), sendo possível observar que houve diferença estatística significativa para a variável sementes por espigas entre os tratamentos (Figura 8a). Foi verificada uma tendência de redução do número de sementes com o avanço das horas do dia, modelado por uma função polinomial de segunda ordem, com  $r^2=0,92$  e coeficiente de variação de 10,0%.

O número máximo de sementes formadas foi observado às 9:00 h da manhã, com média de 48,56 sementes por espiga, e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Nesse momento a viabilidade do pólen era de 70,06%, DPV de 1,9 kPa e DPV acumulado de 4,2 kPa.

Na literatura são descritas variações entre 200 e 300 sementes por espiga para polinização controlada em milho, sendo superiores aos encontrados nesse experimento (ONYISHI et al., 2018; WANG et al., 2018). Essas diferenças estão relacionadas com efeito genotípico, devido ao predomínio de híbridos nos estudos disponíveis na literatura.

De acordo com Rafiq et al. (2021), o número de grãos de pólen produzidos pelos pendões dos polinizadores, é um fator chave para definição do número de sementes formadas nas espigas. Destaca-se que o material genético utilizado nesse estudo foi uma linhagem, que pode ser caracterizada como material de pendão pequeno e de difícil produção em polinização controlada.

Quando a polinização manual foi realizada às 11:00 h da manhã, o número de sementes formadas decresceu 52%. Às 11:00 h, a granação média obtida foi de 25,46 sementes por espiga, diferindo estatisticamente do tratamento 9:00 h. No intervalo de tempo entre esses dois tratamentos, foi observada a máxima taxa de decrescimento da viabilidade do pólen em função do DPV acumulado, o que corrobora para a redução do número de sementes na espiga. Nesse momento, o DPV foi de 2,6 kPa, e o DPV acumulado de 9,1kPa.

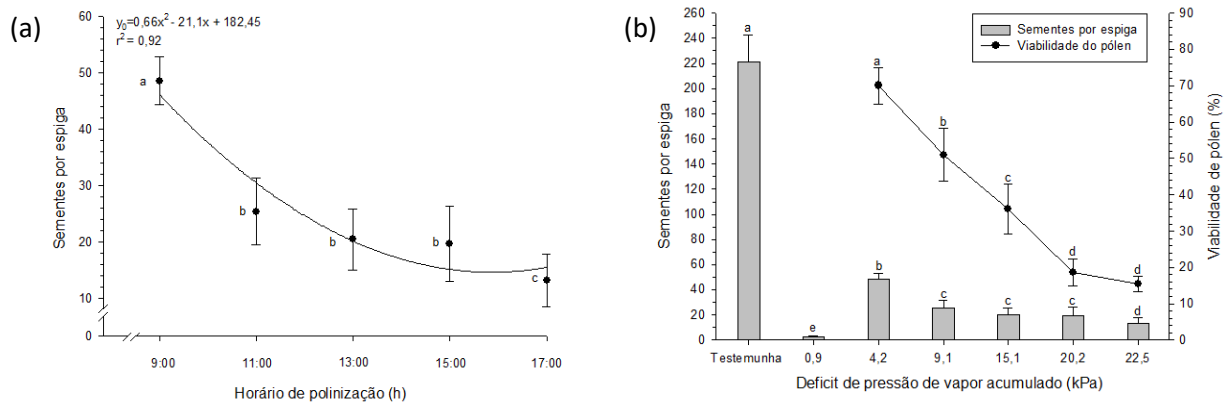
Não houve diferença estatística significativa para o número de sementes por espiga entre os horários de polinização 11:00 h, 13:00 h e 15:00 h, mesmo havendo decrescimento e diferenças estatísticas significativas para viabilidade do pólen (Figura 8 (b)).

Esse descolamento das variáveis se deve a um efeito gerado pela diferença no volume de pólen entre os horários de polinização. A liberação de pólen é contínua ao longo do dia e cumulativa em polinização controlada. Existe aumento de liberação de pólen de acordo com a diminuição da umidade relativa do ar (WILSON et al., 2011). Desse modo, aumenta-se o volume de pólen em cada saco com o transcorrer das horas. Embora havendo diminuição da viabilidade, o maior volume de pólen gera um efeito compensatório para fecundação dos ovários.

A polinização realizada às 17:00 h gerou uma média de 13,24 sementes por espiga. Essa média é estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Nesse tratamento, o efeito compensatório do volume de pólen perde força, dado que a alta umidade relativa do ar desacelera a deiscência das anteras. Nesse momento a condição de umidade era de 75%, com DPV de 0,9 kPa e DPV acumulado de 22,5 kPa.

Vale salientar que o pólen utilizado nesse tratamento passou por todas as condições meteorológicas ocorridas durante o dia, incluindo os extremos de temperatura e DPV, fato que justifica a aderência na análise em função do DPV acumulado. Mesmo havendo uma condição de temperatura amena às 17:00 horas e DPV considerado favorável para polinização controlada, o pólen remanescente nos sacos já havia perdido a maior parte de sua viabilidade.

**Figura 8:** Número de sementes por espiga de milho, em polinização controlada, em função do horário de polinização (a); Impacto do déficit de pressão de vapor acumulado (kPa) no número médio de sementes obtidas por espiga e na viabilidade de pólen com uso de polinizações aberta e fechada em milho (b). Letras distintas nas barras, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.



A Figura 8b mostra um comparativo entre as polinizações aberta (testemunha positiva) e a polinização controlada nos diferentes tratamentos estudados. Foi observado a média de 221,62 sementes por espiga em polinização aberta, sendo muito superior e estatisticamente diferente em relação a polinização controlada, independente dos horários de realização. Na testemunha negativa, não houve formação de sementes, comprovando o sucesso do isolamento do estilo-estigma na polinização controlada (Figura 9).

Considerando o número médio de sementes da polinização aberta como referencial de eficiência de fecundação, pode-se afirmar que o melhor rendimento da polinização controlada alcançou aproximadamente 22% da taxa de sucesso na formação das sementes. Essa resposta gera parâmetro técnico para o correto dimensionamento de campos de melhoramento de milho que podem ser conduzidos em polinização controlada ou em polinização aberta. Optando-se por polinização aberta, tem-se maior número de sementes por espiga, o que resulta na necessidade de plantio de uma área menor.

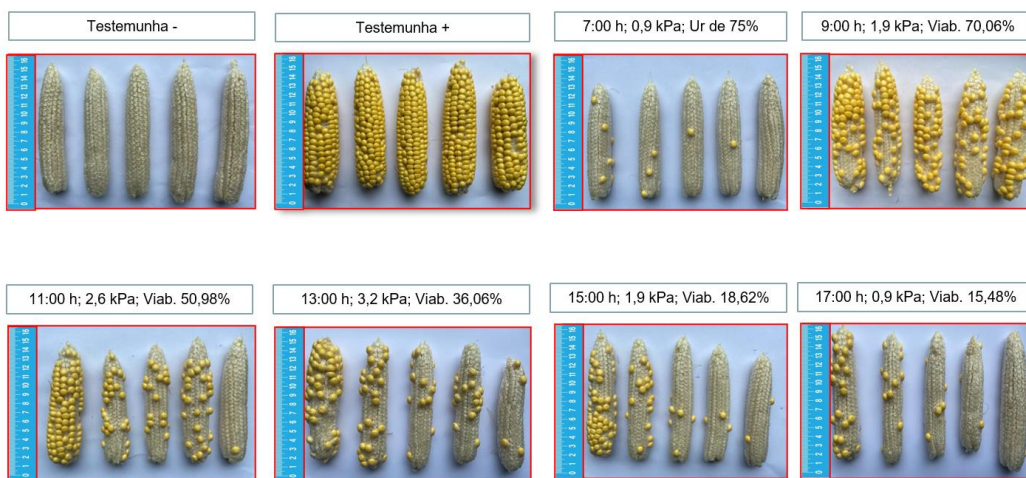
Na polinização aberta, o estilo-estigma das plantas ficou exposto 24 horas por dia por um período de 10 dias com pressão de pólen. Nesse período o vento provocou

movimentação dos grãos de pólen em todas as direções, aumentando as chances que estes atingissem o estilo-estigma. Em média, cada estilo-estigma recebe até 13 unidades de grãos de pólen por dia (SCHOPER et al., 1987), o que torna a fecundação muito facilitada.

Em contraste, na polinização controlada a exposição do estilo-estigma ao pólen se dá apenas por 8 a 10 segundos. Não existe efeito benéfico do vento, dado que o estilo-estigma deve permanecer isolado para evitar cruzamentos indesejados. Desse modo, o sucesso da polinização controlada fica condicionado às condições atmosféricas do momento de realização da polinização que definem a viabilidade do pólen, bem como à maestria do executor da polinização manual.

Para o horário de 7:00 h da manhã, embora com dificuldades operacionais, foi possível realizar a polinização controlada em campo (Figura 9). A granação média obtida foi de apenas 2,76 sementes por espiga, sendo a menor média observada no experimento e estatisticamente diferente dos demais tratamentos. Esse resultado confirma o efeito negativo do orvalho para polinização controlada, bem como, evidencia a influência da umidade relativa do ar na deiscência das anteras.

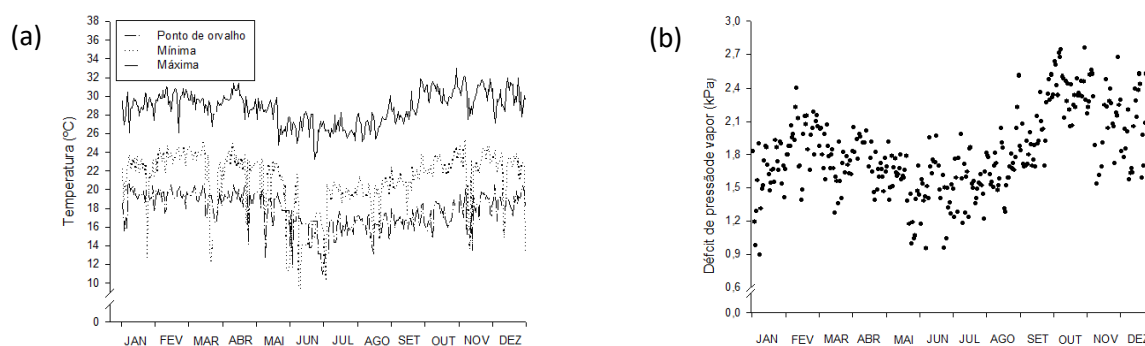
**Figura 9:** Número de sementes formadas por espiga em polinização aberta e controlada em milho, nos diferentes horários do dia, Petrolina-PE.



A Figura 10 mostra o histórico das variáveis temperatura máxima (T), temperatura mínima (t), temperatura do ponto de orvalho (Td), e o déficit de pressão de vapor (DPV) médio diário dos anos de 2022 e 2023 para a cidade de Petrolina-PE.

Os meses com maior tendência a temperaturas amenas são maio, junho e julho (Figura 9a), estando esses dados de acordo com a normal climatológica definida por Teixeira et al. (2009), para a região de Petrolina. Neste mesmo período, caracterizado pelo final do outono e início do inverno no hemisfério sul, é também quando pode ser observada maior tendência para ocorrência de orvalho.

**Figura 10:** Histórico das temperaturas máxima (T), mínima (t), e do ponto de orvalho (Td) (a). Histórico do déficit de pressão de vapor na atmosfera (DPV) de 2022 e 2023 (b). T e DPV médio diurno (7:00 às 17:00 h); t e Td média noturna (01:00 às 04:00 da madrugada).



Os meses com as menores temperaturas anuais coincidem com os menores DPV's. Considerando-se o limiar de 1,9 kPa como bom indicativo para viabilidade de pólen, os meses de maio, junho e julho, estendendo-se até meados de agosto, compõem o período mais favorável para realização de polinização manual do milho em Petrolina.

Nesse período, espera-se uma janela de polinização mais alargada ao longo da jornada de trabalho com pouco ou nenhum efeito negativo do DPV nos grãos de pólen. Em contrapartida, existe a tendência de orvalho nas madrugadas, o que pode limitar as polinizações nas horas iniciais da manhã.

No período de setembro a novembro é quando há registros dos extremos de DPV para o ambiente de Petrolina. A temperatura máxima também é mais elevada, chegando até 34 °C de média diária. Isso nos confirma a existência de picos diários de temperatura e DPV mais elevados, o que resulta em condições limitantes para manutenção da viabilidade do pólen.

Considerando-se um DPV limite em 1,9 kPa, é esperado uma janela ideal diária curta, (primeiros minutos da manhã), onde para maximizar as chances de sucesso, todas as polinizações controladas devem ocorrer dentro desse período. Caso não seja possível a operacionalização, é esperada uma menor taxa de sucesso para a formação das sementes, dado que atividade de polinização manual está ocorrendo em uma janela onde a viabilidade do pólen é baixa. Esse efeito precisa ser considerado no dimensionamento do campo, para garantir o atingimento do número de sementes desejado.

## 5.0 CONCLUSÕES

A tecnologia de IFC pode ser aplicada para determinação da viabilidade do pólen em milho. A viabilidade do pólen é um bom indicador de sucesso na produção de sementes em polinização controlada.

A máxima viabilidade de pólen ocorre pela manhã, às 9:00 h, com valor de 70.06%, e condição de DPV de 1,9 kPa. Nessa condição obteve-se a máxima taxa de sucesso em polinização controlada, com 48, 56 sementes por espiga.

Existe relação da viabilidade de pólen com o DPV acumulado. Os melhores resultados em polinização controlada ocorrem quando a polinização é executada até o DPV limite de 1,9 kPa e DPV acumulado de 4,2 kPa.

Os meses de maio junho e julho apresentam condições climáticas mais favoráveis para polinização controlada em Petrolina, enquanto os meses de setembro outubro e novembro apresentam condições mais abrasivas para viabilidade do pólen.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO 2022: Disponível em: <https://www.abimilho.com.br/estatisticas/consumo>. Acesso em: 15 jan. 2024.

ALMEIDA, C. et al. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Brazilian Journal of Botany**, V.34, n.4, p.493-497, 2011.



ALVA, O. et al. Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139503, 2015.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ALVIM, P. O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 54 f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ARAUS, J. L.; SERRET, M. D.; EDMEADES, G. O. Phenotyping maize for adaptation to drought. IN: MONNEVEUX, P.; RIBAUT, J. M. (Ed.). **Drought phenotyping in crops: from theory to practice**. Texcoco: CGIAR Generation Challenge Programme, 2011.

ASCARI, L. et al. Hazelnut Pollen Phenotyping Using Label-Free Impedance Flow Cytometry. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 615922, 2020.

BARNABÁS, B. et al. Effect of pollen storage by drying and deep freezing on the expression of different agronomic traits in maize (*Zea mays* L.). **Euphytica**, v. 39, p. 221-225, 1988.

BOAVIDA, L. C. et al. Gametophyte interaction and sexual reproduction: How plants make a zygote. **International Journal of Developmental Biology**, p. 615-632, 2005.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. 2ª ed. 817p.

ÇAYLI, A.; BAYTORUN, A. N. Analysis of climate and vapor pressure deficit (vpd) in a heated multi-span plastic greenhouse. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 31, n. 6, 2021.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Conab**, v. 1, n. 2, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Conab**, v.1, n.1, 2023. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 18 jan. 2023.

CRAFTS-BRANDNER, S. J.; SALVUCCI, M. E. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. **Plant Physiology**. v. 129, n. 4, p. 1773–1780, 2002.

CRESTI, M.; LINSKENS, H. F. The discovery of sexual reproduction in higher plants. **Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica**, 41: 19-29, 1999.

CRESTI, M.; TIEZZI, A. **Sexual Plant Reproduction**. 1ª ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992.

CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. 2019. Disponível em:<http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/664456/Relat%C3%B3rio+Anual+2019/990d29e2-582c-48bd-9e0e-34152046160e?version=1.2>. Acesso em 10. jan. 2024.

DA SILVA, R. V.; DE ARAÚJO, J. G.; DE CASTRO, M. T.. Impacto de diferentes técnicas de despendoamento na produtividade de semente de milho. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 5, n. 2021, 2021.

DE SOUSA, J. P. et al. Produtividade do milho em diferentes manejos de adubação com vinhaça e cloreto de potássio. **Brazilian Journal of Science**, v. 2, n. 3, p. 14-23, 2023.

DE SOUZA, T. C. et al. Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 330–339, 2016.

DINATO, N. B. et al. Pollen Cryopreservation for Plant Breeding and Genetic Resources Conservation. **Cryo Letters**, v. 41, n. 3, p. 115–127, 2020.

DJANAGUIRAMAN M, et al. Physiological differences among sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) genotypes under high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 43-54, 2014.

DONG, X. et al. Responses of maize with different growth periods to heat stress around flowering and early grain filling. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 303, p. 108378, 2021.

DRESSELHAUS, T.; FRANKLIN-TONG, N. Male-female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. **Molecular plant**, v. 6, n. 4, p. 1018-1036, 2013.

ELAZAB, A. et al. Detecting interactive effects of N fertilization and heat stress on maize productivity by remote sensing techniques. **European Journal of Agronomy**, v. 73, p. 11-24, 2016.

FERRARINI, H. **Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada**. 2004. 105 f. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2004.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.6, n.2, p. 159-173, 2007.

FONSECA, A. E.; WESTGATE, M. E. Relationship between desiccation and viability of maize pollen. **Field crops research**, v. 94, n. 2-3, p. 114-125, 2005.

FREIRE, M. M. **Aspectos fisiológicos de milho em função do nível de umidade do solo e formas de adubação**. Dissertação de mestrado. 2020. 76 f. Recife, 2020.

GALVÃO, J. C. C. et al. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819–828, 2014.

GIORNO, F. et al. Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. **Plants**, v. 2, n. 3, p. 489-506, 2013.

HARSANT, J. et al. High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 10, p. 2971-2983, 2013.

HEIDMANN, I.; BERARDINO, M. Impedance Flow Cytometry as a Tool to Analyze Microspore and Pollen Quality. **Plant Germline Development: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1669, 25, 2017.

HEIDMANN, I. et al. Impedance flow cytometry: A novel technique in pollen analysis. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0165531, 2016.

HESLOP-HARRISON, Y.; HESLOP-HARRISON, J. Germination of Monocolpate Angiosperm Pollen: Evolution of the Actin Cytoskeleton and Wall during Hydration, Activation and Tube Emergence. **Annals of Botany**, v. 69, n. 5, p. 385–394, 1992.

HOFMANN, F.; OTTO, M.; WOSNIOK, W. Maize pollen deposition in relation to distance from the nearest pollen source under common cultivation - results of 10 years of monitoring (2001 to 2010). **Environmental Sciences Europe**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2014.

HSIAO, J.; ABIGAIL; SUNG HYUN KIM. Maize yield under a changing climate: The hidden role of vapor pressure deficit. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 279, p. 107692, 2019.

IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. Geneva, Switzerland, 151p.

JUNQUEIRA, V. B. **Viabilidade do grão de pólen, fisiologia e produção de plantas de milho sob efeito de piraclostrobina + epoxiconazol**. 2016. 25 f. Dissertação de mestrado. Rio Verde, 2016.

KAEFER, K. A. C. et al. Viability of maize pollen grains in vitro collected at different times of the day. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 12, p. 1040-1047, 2016.

KRON, P. et al. Flow cytometric analysis of pollen and spores: An overview of applications and methodology. **Cytometry Part A**, v. 99, n. 4, p. 348-358, 2021.

LABEGALINI, N. S. et al. Desenvolvimento da cultura do milho sob efeitos de diferentes profundidades de compactação do solo. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 4, p. 7-11, 2016.

LIN, S. W. et al. Impedance Flow Cytometry for Selection of Pollen Traits Under High Temperature Stress in Pepper. **Hortscience**, v. 57, n. 2, p. 181–190, 2022.

LIZASO, J. I. et al. Impact of high temperatures in maize: Phenology and yield components. **Field Crops Research**, v. 216, p. 129–140, 2018.

- LOBELL, D. B.; BALDOS, U. L. C.; HERTEL, T. W. Climate adaptation as mitigation: the case of agricultural investments. **Environmental Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 015012, 2013.
- LUNA, V. S. et al. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. **Crop Science**, v. 41, p.1551-1557, 2001.
- LYRA, G. B. et al. Média diária do déficit de pressão de saturação do vapor d'água do ar e sua influência na vapotranspiração de referência pelo modelo de penman-monteith (FAO 56) em Piracicaba-SP. **Engenharia Agrícola**, v. 24, p. 328-337, 2004.
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. Fisiologia do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 10p. Circular Técnica, 76, 2006.
- MARTINS, E. S. et al. In vitro pollen viability of maize cultivars at different times of collection. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 2, 2017.
- MILLÉO, M. V. R.; CRISTÓFOLI, I.: Avaliação da eficiência agrônômica da inoculação de azospirillum sp. na cultura do milho. **Revista Scientia Agraria**, vol. 17 n. 3, p. 14-23 – Curitiba, 2016.
- NAGY, J. et al. Dynamic imaging in pollen morphology. **Research Square**, 2020.
- NAVEED, M. et al. Genetic Effects conferring heat tolerance in a cross of tolerant x susceptible Maize (*Zea mays* L.) Genotypes. **Front. Plant Sci.** 7, 729. -729, 2016.
- NEVES, M. F. et al. **Etanol de Milho: Cenário atual e perspectivas para a cadeia no Brasil**. Ribeirão Preto, 2021. 1ª ed. 116p.
- ONYISHI, G. C. et al. Optimal time of the day for controlled maize pollination in rain forest agro-ecology of south-eastern Nigeria. **Nigeria Agricultural Journal**, v. 49, n. 1, p. 11-14, 2018.
- PATERNIANI, M. E. A. G. Z. et al. Potencial produtivo e heterose de híbridos de populações F2 de milho no Estado de São Paulo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 27, n. 1/3, p. 29-46, 2013.
- PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. **Sementes de milho: nova safra, novas cultivares e contínua a dominância dos transgênicos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. 59 p.
- PEREIRA, J. et al. Produtividade do milho em diferentes manejos de adubação com vinhaça e cloreto de potássio. **Brazilian Journal of Science**, v. 2, n. 3, p. 14–23, 2023.
- PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 147-153, 2007.

RAFIQ, H. et al. Potential of Impedance Flow Cytometry to Assess the Viability and Quantity of Cannabis sativa L. Pollen. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2739, 2021.

RAMOS, L. N. **Híbridos de milho geneticamente modificados comparados a híbridos de milho convencionais em Terras Altas do Brasil Central**. 2018. 98 f. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

RECH, A. R. et al. **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 1ª ed. 527p.

SÁNCHEZ, B.; RASMUSSEN, A.; PORTER, J. R. Temperatures and the growth and development of maize and rice: a review. **Global Change Biol.** v. 20, 408-417, 2014.

SANTOS, A. C. S. et al. Viabilidade polínica de Eucalyptus spp. com corantes específicos. **Scientia Forestalis**, v. 49, n. 131, 2021.

SCHOPER, J. B.; LAMBERT, R. J.; VASILAS.; B. L. Pollen Viability, Pollen Shedding, and Combining Ability for Tassel Heat Tolerance in Maize. **Crop Science**, v. 27, 1987.

SHAO, R. et al. The effect of elevating temperature on the growth and development of reproductive organs and yield of summer maize. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 20, n. 7, p. 1783-1795, 2021.

SI SHEN, S. et al. Delayed pollination and low availability of assimilates are major factors causing maize kernel abortion. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 7, p. 1599-1613, 2018.

SONG, G. C. et al. Anther response to high-temperature stress during development and pollen thermotolerance heterosis as revealed by pollen tube growth and in vitro pollen vigor analysis in upland cotton. **Planta**, v. 241, p. 1271-1285, 2015.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEIXEIRA, A. H. C. Informações agrometeorológicas do polo Petrolina, PE/Juazeiro, BA 1963 a 2009. Embrapa Semiárido, 21p. Documentos 233, 2010.

THAYIL, M. V. et al. Genotype-by-Environment Interaction Effects under Heat Stress in Tropical Maize. **Agronomy**, v. 10, n. 12, p. 1998, 2020.

USDA 2023: Disponível em: [https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=0440000&sel\\_year=2022&rankby=Production](https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=0440000&sel_year=2022&rankby=Production). Acesso em: 13 jan. 2024.

WANG, Q. et al. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in Picea meyeri. **Tree Physiology**, v. 23, 2003.

WANG, Y. et al. Flowering dynamics, pollen, and pistil contribution to grain yield in response to high temperature during maize flowering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 158, p. 80–88, 2019.

WILSON, Z. A. et al. The final split: the regulation of anther dehiscence. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 5, p. 1633–1649, 2011.

ZHANG, L. et al. Dust Interferes with Pollen–Stigma Interaction and Fruit Set in Pistachio *Pistacia vera* cv. Kerman. **Hortscience**, v. 54, n. 11, p. 1967–1971, 2019.

ZHOU, L.; JURANIĆ, M.; DRESSELHAUS, T. Germline Development and Fertilization Mechanisms in Maize. **Molecular Plant**, v. 10, n. 3, p. 389–401, 2017.