

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SECAGEM E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE  
PÓLEN DE BERINJELA**

**LEOMARA VIEIRA DE FRANÇA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF**  
**FEVEREIRO/2008**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SECAGEM E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE BERINJELA**

**LEOMARA VIEIRA DE FRANÇA**

**ORIENTADOR: RICARDO CARMONA  
CO-ORIENTADOR: WARLEY MARCOS NASCIMENTO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 277/2008**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SECAGEM E CONSERVAÇÃO DE GRÃO DE PÓLEN DE BERINJELA**

**LEOMARA VIEIRA DE FRANÇA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO VEGETAL.**

---

**WARLEY MARCOS NASCIMENTO, PhD. (Embrapa Hortaliças)  
(CO-ORIENTADOR) CPF: 329.264.056-34 E-mail: wmn@cnph.embrapa.br**

**APROVADA POR:**

---

**RICARDO CARMONA, PhD. (UnB)  
(ORIENTADOR) CPF: 183.492.181-34 E-mail: rcarmona@unb.br**

---

**JOSÉ RICARDO PEIXOTO, Dr. (UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF:354.356.236-34 E-mail:peixoto@unb.br**

---

**RAQUEL ALVES DE FREITAS, Dr<sup>a</sup>. (Embrapa Hortaliças)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF:742.399.706-44 E-mail:  
raquel@cnph.embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 14 de FEVEREIRO de 2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

França, Leomara Vieira.

Secagem e conservação de grãos de pólen de berinjela. / Leomara Vieira de França; orientação de Ricardo Carmona. – Brasília, 2008.

93 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. *Solanum melongena*. 2. Híbridação. 3. Armazenamento. 4. Semente. I. Carmona, R. II. Ph.D.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FRANÇA, L. V. **Secagem e conservação de grãos de pólen de berinjela**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 93 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Leomara Vieira de França

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Secagem e conservação de grãos de pólen de berinjela.

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Leomara Vieira de França  
CPF: 955.851.331-87  
SQN 405, Bloco N, apartamento 105.  
70846-140 - Brasília/DF - Brasil  
E-mail: agro\_leomara@yahoo.com.br.

Dedico esta vitória a DEUS  
(fonte inesgotável de amor),  
pais e irmãos (pelo apoio  
incondicional).

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de findar mais essa etapa, sempre me concedendo sabedoria e discernimento.

A meus pais Amaro Almeida de França e Leonor Vieira Soares de França e irmãos (Leonice Vieira de França e Aleomar Vieira de França) que são o alicerce da minha vida, sempre orientando minhas escolhas, aceitando minhas decisões e compartilhando das conseqüências.

Ao Dr. Warley Marcos Nascimento pela co-orientação, amizade e oportunidade de desenvolvimento do trabalho com concessão de autonomia sabendo da responsabilidade a mim confiada, sendo sua colaboração inexplicável.

Ao Professor Dr. Ricardo Carmona pela orientação e experiência profissional compartilhada.

A Dr<sup>a</sup>. Raquel Alves de Freitas pela amizade, paciência e ao grande exemplo de profissionalismo demonstrado em todos os momentos.

Aos pesquisadores Dr. Giovani Olegario da Silva pela ajuda estatística fornecida, Ms. Antonieta Nassif Salomão e Dr. Antonio Carlos Torres pelas sugestões que contribuíram para realização do trabalho e aos Dr. Valter Rodrigues Oliveira e Dr. Ossami Furumoto pela concessão de telados essenciais para desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários (Virgílio, Elias, Valdir, Lourenço, José Getúlio, Jorge e Karlão) e estagiários (Gilmara, Paulo, Felipe, Magnum e Augusto) da Embrapa Hortaliças que ajudaram na condução do experimento, além da experiência prática transmitida.

A Embrapa Hortaliças e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo uso de suas dependências, equipamentos e materiais utilizados na realização do trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos do Laboratório de sementes da Embrapa Hortaliças e da Pós-graduação da UnB pelo companheirismo e momentos de descontração: Elizabeth Azevedo Batista, Karuliny das Graças Coimbra, Karina Pereira de Andrade, Mariana Dierings Croda, Kelita Marques, Raphael Augusto Castro e Melo e Michelle Souza Vilela.

Agradeço a todos, embora não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. A vocês, muito obrigada.

*“A esperança da colheita reside na semente.”*  
(autor desconhecido)

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL	2
Berinjela	2
Biologia floral	4
Grão de pólen	4
Polinização	5
Fertilização	6
Semente	7
Híbrido	8
Cíça	10
Produção de sementes híbridas	11
Conservação de grão de pólen	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
<b>Capítulo 1 – Viabilidade e tolerância a dessecação de pólen de berinjela</b>	<b>21</b>
RESUMO	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	28
Germinação <i>in vitro</i>	28
Germinação <i>in vivo</i> via fluorescência	29
Viabilidade polínica através de solução de tetrazólio	30
Tolerância do pólen a dessecação	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
Germinação <i>in vitro</i>	32
Germinação <i>in vivo</i> via fluorescência	34
Viabilidade polínica através de solução de tetrazólio	34
Tolerância do pólen a dessecação	35
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

TABELAS E FIGURAS	45
<b>Capítulo 2 - Conservação de grão de pólen de berinjela visando a produção de semente híbrida</b>	<b>52</b>
RESUMO	53
ABSTRACT	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
Umidade Polínica	63
Pegamento e Produção de Fruto	64
Produção de sementes	65
Massa de 100 sementes	66
Germinação	67
Vigor	67
Viabilidade Polínica	68
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
TABELAS E FIGURAS	80

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 1

- 1.1. Porcentagem de germinação *in vivo* de grãos de pólen fresco de berinjela ‘Ciça’, Brasília, DF, 2006 45
- 1.2. Valores médios obtidos no número de sementes (NS), massa de 100 sementes (MCS), testes de primeira contagem (PC), germinação (Ger), emergência de plântulas em substrato (Eme) e envelhecimento acelerado (EA) de sementes de berinjela ‘Ciça’ oriundas de cruzamentos utilizando grãos de pólen com diferentes graus de umidade (GU), Brasília, DF, 2006 45

### Capítulo 2

- 2.1. Pegamento de fruto, massa média por frutos e produção de sementes, provenientes do cruzamento utilizando grãos de pólen de berinjela com diferentes graus de umidade e armazenados por diferentes períodos, em diversas condições de armazenamento, Brasília, DF, 2007 80
- 2.2. Massa de 100 sementes (g) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007 81
- 2.3. Massa de 100 sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007 81
- 2.4. Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007 82
- 2.5. Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen

(5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007	82
2.6. Primeira contagem de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007	83
2.7. Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007	83
2.8. Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007	84
2.9. Primeira contagem das sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007	84
2.10. Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007	85
2.11. Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007	85
2.12. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007	86

2.13. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidades iniciais do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007

86

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1

1.1. Área útil de contagem do teste de germinação <i>in vivo</i> via fluorescência	46
1.2. Germinação <i>in vivo</i> via fluorescência de grãos de pólen viáveis de berinjela ‘Ciça’	46
1.3. Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 0% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x	47
1.4. Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 5% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x	47
1.5. Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 7,5% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x	48
1.6. Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 10% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x	48
1.7. Porcentagem de germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ submetido a meios de cultura de Brewbaker e Kwack com diferentes concentrações de sacarose	49
1.8. Grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ em solução de tetrazólio à 1,0%	49
1.9. Grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ em solução de tetrazólio à 0,5% e 0,75%	50
1.10. Solução de tetrazólio à 0,75% e grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ colocados sobre papel filtro e visualizado em lupa	50
1.11. Grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ fresco (extraído em 2006) e armazenado (extraídos em 2004) em solução de tetrazólio à 0,75%	51
1.12. Grau de umidade de grãos de pólen de berinjela desidratados nos diferentes recipientes e períodos de secagem	51

### Capítulo 2

2.1. Massa de 100 sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento	87
2.2. Massa de 100 sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento	87

2.3. Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento	88
2.4. Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento	88
2.5. Primeira contagem de sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento	89
2.6. Primeira contagem de sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento	89
2.7. Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento	90
2.8. Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento	90
2.9. Emergência de plântulas em substrato de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento	91
2.10. Emergência de plântulas em substrato de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento	91
2.11. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura 5°C durante o armazenamento	92
2.12. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento	92
2.13. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento	93

## SECAGEM E CONSERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE BERINJELA

### RESUMO

A utilização de sementes híbridas de berinjela vem crescendo nos últimos anos, devido ao alto vigor, melhor qualidade de frutos, maior produtividade, uniformidade, maior resistência a pragas e doenças e principalmente a facilidade de hibridação, devido ao tamanho do botão floral da espécie, entre outros fatores. Propiciar o cruzamento utilizando pólen armazenado é de grande auxílio para programas de produção de sementes, em especial quando há defasagem no florescimento entre as linhagens de interesse, ou quando as mesmas se encontram em regiões distintas. Assim, este trabalho teve como objetivo otimizar metodologias de viabilidade polínica, desidratação e conservação de grão de pólen de berinjela ‘Ciça’ visando produzir sementes híbridas. Em um primeiro estudo, um trabalho prévio foi realizado para determinar a tolerância de desidratação do grão de pólen e identificar a melhor metodologia entre germinação *in vitro*, *in vivo* e tetrazólio para avaliar a viabilidade polínica. Após isso, foi avaliada a viabilidade polínica, pegamento e produção de fruto e produção e qualidade fisiológica de sementes provenientes de grãos de pólen com três graus de umidade (35,8%, 5,4% e 5,1%), armazenados por 180 dias sob três diferentes temperaturas: geladeira (5°C), freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C). Concluiu-se que: a) o pólen de berinjela tolera dessecação até 4,7% de umidade; b) protocolos para germinação *in vitro* de berinjela devem ser estudados; c) grão de pólen extraído da flor com elevado teor de água (35,8%) se deteriorou independente da condição de armazenamento; d) grãos de pólen armazenados a -20°C e -196°C com aproximadamente 5% de água foram eficientes para produzir sementes por 180 dias com alta qualidade fisiológica.

**Palavras chaves:** *Solanum melongena*, hibridação, armazenamento e semente.

## DRYING AND CONSERVATION OF EGGPLANT POLLEN

### ABSTRACT

The use of eggplant hybrid seeds has increased in the last years, due to high vigor, yield, pest and disease resistance and in special for easy hybridization, because of the flower size of this species. Making the crosses using stored pollen is usefull to seed programs, in special when the plants are in different regions or in different growth stages. Thus, the aim of this study was to find some methodologies for pollen viability, drying and conservation of eggplant pollen to produce hybrid seeds. In the first study, it was determinated the capacity to dry pollen grain and and identifyied the better methodology among *in vitro* germination, *in vivo* germination and tetrazolium test to estimate the pollen viability. In a second study, it was estimated the pollen viability, fruit set, fruit production, seed production and seed physiological quality using pollen grains with different moisture (35,8%, 5,4% e 5,1%) stored up to 180 days at 5°C (refrigerator), -20°C (freezer) and -196°C (liquid nitrogen). This study concluded that: a) eggplant pollen allows drying to 4,7% moisture; b) new methodologies with *in vitro* germination test has been studied; c) pollen with a high percentage of water (35,8%) loses quickly in each condition of storage; d) pollen conserved in -20°C and -196°C with 5% of water are efficient to produce seed with high physiological quality.

**Keywords:** *Solanum melongena*, hybridization, storage and seed.

## INTRODUÇÃO GERAL

No mercado mundial de sementes de hortaliças, as solanáceas representam a família mais importante, com cerca de 25% do faturamento mundial. Atualmente, no Brasil, as cultivares de berinjela comercializadas pelas empresas de sementes são genótipos híbridos. A Embrapa Hortaliças, no seu programa de melhoramento genético de solanáceas, desenvolveu há alguns anos o híbrido de berinjela ‘Ciça’. A participação desse híbrido no mercado nacional vem crescendo anualmente, sendo que atualmente quatro empresas nacionais de sementes o comercializam. No ano de 2005 existiu uma demanda de cerca de 150 kg de sementes híbridas de berinjela ‘Ciça’ por parte dessas empresas, sendo que a Embrapa Hortaliças atendeu apenas 30% a 40% desse volume, em razão de sua capacidade produtiva (W.M. Nascimento, comunicação pessoal).

Alguns importantes fatores fisiológicos durante a produção de sementes híbridas devem ser considerados para a obtenção de uma adequada produtividade e uma aceitável qualidade genética. O conhecimento da viabilidade do pólen, além de estratégico, torna-se fundamental tanto na produção de sementes híbridas como nos programas de melhoramento genético, particularmente em espécies em que existe a possibilidade de hibridação artificial, como é caso das solanáceas.

A produção de sementes híbridas de berinjela requer mão de obra especializada e um controle bastante eficiente nas diferentes etapas, garantindo assim, a obtenção de sementes de alta qualidade genética e fisiológica. A hibridação nesta espécie é feita por meio de emasculação, ou seja, técnica manual de retirada das anteras (parte masculina) das flores do progenitor feminino. Geralmente, faz-se a semeadura prévia do progenitor masculino, retirando-se o pólen por ocasião dos cruzamentos. A coincidência na floração dos progenitores masculinos e femininos é de suma importância na garantia de uma sincronização para os cruzamentos e conseqüentemente produção do híbrido. Isto implica geralmente um maior risco ao produtor de sementes, pois condições edafoclimáticas adversas podem interferir nessa sincronização.

Para evitar essa dependência de sincronismo, garantindo a disponibilidade de grãos de pólen do progenitor masculino na época em que o progenitor feminino estiver receptivo para o cruzamento, uma solução viável seria conservar o pólen para posterior utilização. Essa conservação também permitirá que o produtor tenha maior flexibilidade na produção, podendo receber pólen de outra região produtora. Soma-se a isto, a possibilidade de um aumento na produção de semente em virtude do maior

aproveitamento da área anteriormente utilizada para produção de pólen (progenitor masculino) como área para produção de sementes (progenitor feminino). O armazenamento do pólen pode ser uma técnica benéfica tanto ao produtor de sementes quanto ao detentor da cultivar, uma vez que este evitará entregar aos cooperados e/ou terceiros, as duas linhagens do híbrido. Isto permitirá uma maior segurança e controle dos parentais. Na prática, pode-se então disponibilizar a linhagem do progenitor feminino e o pólen do masculino. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos encontrados na literatura, e precário o domínio da técnica de conservação de grãos de pólen das diferentes espécies olerícolas.

Assim, este trabalho buscou otimizar a desidratação, conservação e germinação do grão de pólen de berinjela visando à produção de sementes híbridas.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL**

### **Berinjela**

A berinjela, botanicamente classificada como *Solanum melongena* L. pertence à família Solanaceae, assim como o tomate, a pimenta, o pimentão, a batata e o jiló (Ribeiro et al., 1998). Estudos de distribuição de variabilidade indicam a Índia e a China como centros de diversidade primária e secundária da espécie, respectivamente. As formas selvagens da berinjela eram de constituição espinhosa e sabor amargo, indicando que as primeiras seleções foram dirigidas contra esses caracteres e possivelmente a favor do maior tamanho de fruto (Nascimento, 2004).

A berinjela foi introduzida no Brasil no século XVI pelos portugueses. Os árabes, os orientais (principalmente os japoneses) e seus descendentes são os maiores consumidores desta hortaliça (Ribeiro et al., 1998) cujo cultivo vem sendo realizado há mais de mil e quinhentos anos (Bonin, 1988, citado por Lanna, 1991). A pesquisa científica com esta espécie teve início em 1937 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), com a introdução de sementes de alguns materiais comerciais. Em 1940, foram realizados os primeiros ensaios para avaliação das cultivares de berinjela recém-introduzidas (Ribeiro et al., 1998).

A planta da berinjela tem porte arbustivo, com caule do tipo semi-lenhoso e ereto, podendo atingir 1 a 1,8 m de altura. A intensa formação de ramos laterais confere a planta o aspecto de arbusto bem copado. O sistema radicular pode atingir profundidades

superiores a 1 m. As folhas são simples, com limbo foliar de formato ovado ou oblongo-ovado, e densa pilosidade, e dependendo da cultivar, pode apresentar espinhos (Ribeiro et al., 1998). Geralmente, os frutos são grandes, do tipo baga, de formato variável (oval, oblongo, redondo, oblongo-alongado, alongado), normalmente brilhante, e também de coloração variada podendo ser branca, rosada, zebrina, amarela, verde, púrpura e várias tonalidades de roxo até o preto (Ribeiro et al., 1998 e George, 2004). No Brasil, a berinjela mais comum é a de cor roxa com formato oblongo (Hortibrasil, 2007).

Embora a área plantada no país perfaça um pouco mais de 1.500 ha, está havendo um crescente aumento no consumo desta hortaliça, motivada pelos consumidores de produtos mais saudáveis e com propriedades medicinais; neste aspecto, a berinjela se destaca pela sua propriedade redutora do nível de colesterol (Filgueira, 2000). O valor nutricional total do fruto da berinjela pode ser comparado ao do tomate (Ribeiro et al., 1998), destacando-se as vitaminas B1 e B2 e os minerais Cálcio, Fósforo, Ferro e Potássio. A medicina popular recomenda esta hortaliça para as enfermidades do aparelho digestivo, dos rins e bexiga, nas afecções cutâneas (Hortibrasil, 2007) e em tratamentos de diabetes e bronquite (Ribeiro et al., 1998). A berinjela apresenta boa qualidade quando consumida imatura, com pedúnculo túrgido e verde, fruto escuro, brilhante e macio, e sementes claras (Hortibrasil, 2007).

O mercado consumidor brasileiro tem-se tornado cada vez mais exigente quanto a qualidade do produto, e quanto ao preço, o que tem levado os produtores de olerícolas a utilização de cultivares e híbridos de alta produtividade, uniformidade e qualidade de frutos. Atualmente, o mercado brasileiro é dominado pelos híbridos, pois além das características acima citadas, estes apresentam tolerância às doenças e pragas. Esse domínio, no caso da berinjela, teve início com a incorporação comercial do híbrido F-100 no início dos anos 60, o que abriu espaço para a introdução de outros híbridos, como ‘Super F-100’, ‘F-1000’, ‘Nápoli’ e ‘Ciça’, todos eles existentes no mercado. Atualmente, o Nápoli tem sido o mais cultivado e comercializado, porém outros híbridos vêm sendo testados e podem tornar-se opções ao uso do ‘Nápoli’. É necessário, entretanto, determinar o comportamento desses novos materiais, no que se refere a produtividade e qualidade dos frutos e, compará-los com os tradicionalmente utilizados (Antonini et al., 2002).

No Brasil, a área cultivada situa-se principalmente no Centro-Sul, apresentando-se em visível expansão. Em consequência, a demanda de sementes, principal método de propagação da berinjela, também apresentou crescimento (Lima, 2000). Em 2003, o

mercado de sementes de berinjela foi cerca de R\$ 2,3 milhões, praticamente referentes a comercialização de sementes híbridas (Nascimento, 2004).

### **Biologia floral**

Ao se falar sobre polinização é relevante conhecer alguns aspectos morfológicos e fisiológicos da espécie a ser estudada.

A berinjela é uma planta autógama. Suas flores são perfeitas, apresentando tanto estames como carpelo, ou seja, a mesma flor encerra as partes masculinas e femininas, sendo considerada hermafrodita. As flores são solitárias ou distribuídas em inflorescências do tipo cimeira, de tamanho que varia de 3 a 5 cm de diâmetro. A corola é do tipo dialipétala, com cinco a seis pétalas de coloração lilás e violeta. Os cinco a seis estames são livres, eretos, amarelos e com filamentos bem curtos (Ribeiro et al., 1998). A antese é o momento de abertura da flor, embora possa designar o conjunto de todo o desenvolvimento floral, isto é, desde abertura até a senescência da flor. A planta tem dicogamia que é a diferença na época de maturidade da antera e do estigma, sendo esta dicogamia do tipo protoginia (estigma alcança a maturidade antes da antera), exigindo ajustes na época de semeadura, especialmente para a produção de sementes híbridas, embora ocorra freqüentemente na natureza (Marcos Filho, 2005).

A berinjela não requer comprimento de dia específico para iniciar o florescimento, mas requer, por exemplo, uma temperatura mínima acima daquela exigida pela cultura do tomate. A temperatura ótima durante o dia para o crescimento e produção de fruto está em torno de 25-35°C. A berinjela é menos tolerante a baixas temperaturas quando comparada ao tomate, e não tolera geada (George, 2004).

### **Grão de pólen**

O grão de pólen maduro é constituído por uma parede celular dupla (uma membrana externa – exina, e outra interna – intina), um núcleo vegetativo e pelo menos um generativo ou reprodutivo, todos haplóides. A superfície da exina é dotada de espessamentos, rugas, cristais, pontas ou espinhos, que permitem a fixação e retenção do grão de pólen na superfície do estigma após a polinização. A superfície dessa membrana externa não é contínua, sendo evidente a presença de poros que, dentre outras funções, favorecem a expansão do tubo polínico; é espessa e contém

esporolenina, substância muito resistente à decomposição. A intina é mais delgada e contém pectina e celulose. Os grãos de pólen contêm proteínas, lipídios, aminoácidos livres, vitaminas e pequenas quantidades de auxinas e giberelinas; estes dois fitormônios estimulam o desenvolvimento das paredes do ovário e a formação do fruto (Marcos Filho, 2005).

Os grãos de pólen apresentam diversidade de forma, de tamanho e de características externas da exina, típicas de cada espécie, as quais se relacionam com a sua dispersão abiótica (vento, água) ou biótica (insetos, pássaros, mamíferos) (Carvalho e Nakagawa, 2000). Em função de sua grande diversidade morfológica, os grãos de pólen têm grande importância para fins taxonômicos e investigações paleontológicas, pois são encontrados em perfeitas condições de conservação nas diversas camadas geológicas, devido à natureza das substâncias da exina (Marcos Filho, 2005); entretanto, altas ou baixas temperaturas podem afetar a viabilidade do pólen (George, 1983).

### **Polinização**

A polinização é a transferência do grão de pólen do estame ao carpelo. Quando as anteras amadurecem, há a deiscência destas e ocorre a saída dos grãos de pólen, que são disseminados por vários agentes, como vento, água, insetos, pássaros e mamíferos, o que permite que os grãos de pólen atinjam o estigma e se processe a polinização. O estigma apresenta-se geralmente com papilas ou pêlos e com variações, em função da espécie. O estigma exsuda uma substância altamente específica (líquido estigmático) que evita a sua dessecação, e favorece o recebimento dos grãos de pólen, garantindo ótimas condições para a sua germinação. Esta substância é rica em glicoproteína, mucilagem e nutrientes, sendo abundante no estigma tipo úmido e escasso no tipo seco (Foskey, 1994). A polinização é fundamental para a produção de sementes porque precede a fertilização dos ovários (George, 1983).

A berinjela é uma planta autógama com flores perfeitas e por isto possui características de autocompatibilidade, reproduzindo-se preferencialmente por autofecundação (Nascimento, 2004 e Ribeiro et al., 1998); entretanto, pode apresentar polinização cruzada (George, 2004). O percentual de polinização cruzada natural varia com a cultivar e com outros fatores ambientais, com média estimada entre 6 a 7%, podendo, no entanto, chegar próximo a 50%. Essa taxa de polinização cruzada aumenta em locais onde ocorrem populações de insetos polinizadores, como por exemplo, a

mamangava (Ribeiro et al., 1998).

A germinação do grão de pólen é muitas vezes o estimulante para o desenvolvimento do ovário. Uma polinização com muita quantidade de grãos de pólen geralmente resulta em uma explosão no crescimento do ovário e aumento do pegamento. Na polinização, um desconhecido fator de estímulo tem sido descrito por estar presente no pólen, devido ao estímulo da auxina na formação do ovário (Kessel, 1976). A auxina, também conhecida como ácido indol-3-acético, em alguns frutos, induz o pegamento e o crescimento de partes da flor (Davies, 1990). Este fito-hormônio tem como função garantir a manutenção e o crescimento do ovário da flor. A auxina presente no grão de pólen é importante para o desenvolvimento normal do fruto. Em muitas plantas, a semente continua a produzir reguladores de crescimento, como a auxina, até o momento de amadurecimento do fruto (USP, 2003). Reide et al. (1984) também sugerem que a auxina, por estar em alta concentração no pólen, funciona como um estímulo na polinização.

### **Fertilização**

Quando os grãos de pólen alcançam o estigma, aderem à superfície, graças às características da exina e das peculiaridades da superfície do estigma, que facilitam a fixação do pólen. Em seguida, os grãos de pólen absorvem o líquido estigmático e germinam, formando tubos polínicos, que se desenvolvem no interior do estilete até alcançar o ovário. A formação do tubo polínico e seu desenvolvimento no interior do estigma não ocorrem de maneira indiscriminada; somente se verificam em plantas da mesma espécie ou de espécies estreitamente relacionadas (Chasan e Walbot, 1993). O tubo é formado pelo crescimento da intina, que atravessa a exina através dos poros. A intina se projeta, formando um ou mais tubos polínicos, mas apenas um atinge o saco embrionário, transportando os gametas.

A temperatura ideal para a germinação do tubo polínico situa-se entre 21 e 27°C; sendo a mínima geralmente em torno de 5°C. O período entre a formação do tubo polínico e a fecundação é variável, podendo durar alguns minutos ou horas (Bots e Mariani, 2005), e depende da temperatura, disponibilidade de água, compatibilidade genética e do tipo de canal do estilete (Dumas e Mogensen, 1993).

Como os tubos polínicos crescem entre as células do estilete, as enzimas por ele segregadas degradam as lamelas médias, e as paredes celulares aparecem convertidas em mucilagem. O tubo polínico parece nutrir-se dos componentes (mucopolissacarídeos, lipoproteínas, glicoproteínas) encontrados no tecido transmissor do estilete. O crescimento do tubo polínico é controlado por substâncias de crescimento naturais, nas quais se incluem tanto tipos promotores, quanto inibidores. Molisch foi o primeiro que evidenciou experimentalmente os promotores de crescimento, sugerindo que tais substâncias dirigem o tubo polínico por quimiotropismo (Rodrigues et al., 1977). Isso supõe que os promotores de crescimento do tubo polínico participam da direção quimiotrópica do tubo até o óvulo, e que os inibidores do crescimento atuam na incompatibilidade de reação entre o grão de pólen e o estigma, ou estilete (Carvalho e Nakagawa, 2000).

A célula vegetativa pode ou não ser conduzida na extremidade do tubo polínico, à frente das reprodutivas; há também casos em que degeneram antes da germinação do grão de pólen ou nos primeiros estádios de crescimento do tubo polínico. Muitos pesquisadores acreditam que a célula vegetativa é apenas uma estrutura vestigial, sem a menor função no desenvolvimento do tubo polínico; seria uma estrutura que digere os tecidos, constituindo um canal que permite a sua passagem. A disponibilidade de cálcio no estigma, o turgor celular e a concentração de boro são considerados fatores controladores da germinação e desenvolvimento do tubo polínico. É possível também que um gradiente de concentração de cálcio conduza o tubo polínico em direção ao saco embrionário, sendo esse gradiente talvez criado mediante atuação das sinérgidas. De qualquer forma, como o tubo polínico se desenvolve no interior do estilete, este libera enzimas responsáveis pela degradação de tecidos, constituindo um canal que permite a sua passagem. O tubo polínico cresce em direção ao ovário e, ao atingi-lo, penetra no óvulo (Marcos Filho, 2005).

## **Semente**

A semente é a unidade reprodutiva que dá início a uma nova geração. Ela é a estrutura de propagação das plantas superiores, sendo originária do óvulo fecundado. A fecundação do óvulo se inicia pela ruptura do tubo polínico, assim que alcança o saco embrionário, onde deposita seus dois núcleos reprodutivos e degenera logo após. Em seguida, ocorre a união de um dos gametas masculinos ao núcleo da oosfera (singamia),

para formar o ovo fertilizado ou zigoto ( $2n$ ); o outro núcleo reprodutivo se une aos dois núcleos polares do saco embrionário (fusão tripla), para formar o núcleo do endosperma ( $3n$ ), caracterizando a dupla fertilização típica das angiospermas. O núcleo endospermático, após inúmeras divisões celulares e outras transformações, dá origem ao endosperma; o zigoto dá origem ao embrião, enquanto os integumentos do óvulo são os precursores dos tegumentos da semente (Marcos Filho, 2005).

A fertilização da maioria dos óvulos, e conseqüente formação de um maior número de sementes e frutos de qualidade superior, é uma conseqüência direta da polinização. Quanto mais eficiente for o processo de polinização, ou seja, quanto maior for o número de grãos de pólen viáveis e compatíveis no estigma, maior será a competição entre eles para fecundar os óvulos e maior será a porcentagem de fertilização (Freitas, 1997).

Cada semente é resultado de um simples pólen germinado e fertilizado. Para um desenvolvimento normal dos frutos, milhares de grãos de pólen necessitam ser depositados no estigma para produzir centenas de sementes (Zitter et al., 1996), visto que apenas 2% dos grãos polinizados são responsáveis pela fertilização (Zamir e Jones, 1981). A berinjela é uma espécie que produz grande quantidade de sementes por fruto. Kakizaki, citado por Noda (1980), relatou que em certas cultivares de berinjela, por exemplo, cada fruto produz em média, 2500 sementes. O mesmo autor cita uma média por fruto oriundo de polinização cruzada em 688 sementes e aqueles oriundos de autopolinização em 1087 sementes por fruto.

## **Híbrido**

O híbrido é definido como aquele indivíduo heterozigótico para um ou mais *loci* originário da fusão de gametas geneticamente diferentes (Borém, 1998). A berinjela é uma das plantas hortícolas em que o vigor híbrido (heterose) vem sendo explorado economicamente há mais tempo que nas demais culturas. Isso se deve principalmente a frequência com que ocorre o vigor híbrido na primeira geração dos cruzamentos entre cultivares. A heterose foi definida por Jones (1958) como sendo a tendência de indivíduos obtidos por cruzamento em ultrapassar seus genitores endogâmicos e suas gerações endogâmicas em alguns aspectos. Assim, plantas mais vigorosas e produtivas são geralmente obtidas em gerações F1 de hortaliças, como a berinjela (Paterniani, 1974).

Desde a década de 60, viabilizou-se a produção e a utilização de um híbrido F1 de berinjela, denominada F-100, que substituiu quase que completamente as antigas cultivares de polinização aberta utilizadas em escala comercial. A utilização comercial do híbrido F-100, por mais de um quarto de século, abriu espaço para a introdução de outros híbridos comerciais, presumivelmente superiores ao F-100. Há muitos anos que sementes híbridas de olerícolas têm sido utilizadas em nível mundial. No relatório de 1959 do Ministério da Agricultura do Japão, já se relatavam híbridos de tomate, repolho, pepino e berinjela (Ikuta, 1961). As cultivares híbridas de berinjela foram produzidas por especialistas de companhias de sementes que usaram linhas macho-estéril como mãe ou faziam emasculação e polinização manual, sendo este o mais comumente utilizado (George, 2004).

Entre as hortaliças cultivadas no Brasil, há vários anos que utiliza-se comercialmente a heterose em couve-flor, berinjela, tomate, entre outros. Quando se tem um produto comercial de alto valor e o gasto com sementes por área é pequeno, ou quando a semente híbrida é produzida a preços relativamente baixos, como é o caso da berinjela, a heterose pode ser utilizada como vantagem (Miranda, 1987). Dias e Gurgel (1949) e Sousa et al. (1997), constataram a ocorrência do vigor híbrido na produção de frutos na geração F1 e em alguns cruzamentos entre cultivares locais e estrangeiras de berinjela. Daskaloff (1937, 1941), na Bulgária, constatou o vigor de híbridos nos cruzamentos entre cultivares locais e importadas. O aumento de produção dos híbridos sobre os pais mais produtivos variou de 10 a 45% (Ikuta, 1961).

A introdução dos híbridos de berinjela no mercado, iniciada na década de 60, mostrou nítida diminuição na amplitude de variação do preço (Ikuta, 1981). Atualmente, ela apresenta oferta e preço relativamente estáveis ao longo do ano, mesmo sendo uma espécie termófila, que necessita alta temperatura para o seu desenvolvimento vegetativo e reprodutivo (Sousa et al., 1997). Esta estabilidade, segundo Noda (1980), deve-se ao uso de híbridos F1, que são bastante produtivos e mostram estabilidade fenotípica sob condições adversas.

Os híbridos de berinjela são atualmente os mais plantados, pois além da heterose, tem grande produtividade, qualidade superior, uniformidade e padronização das plantas e frutos, maior precocidade e maior adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (Ribeiro et al., 1998).

## ‘Ciça’

A ‘Ciça’ é um híbrido de berinjela com resistência à antracnose causada por *Colletotrichum gloesporioides* e à podridão-de-fomopsis, causada por *Phomopsis vexans*, doenças que causam severos danos à cultura. O desenvolvimento deste híbrido iniciou-se em 1986, na Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. Ele é um híbrido simples originário do cruzamento entre o genótipo CNPH 006, resistente à antracnose, e CNPH 110, linhagem resistente à *Phomopsis*. A fonte de resistência à antracnose foi fornecida pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A resistência tanto à antracnose quanto à podridão-de-fomopsis é monogênica dominante. Desta forma, a geração F1 obtida do cruzamento entre as linhagens comporta-se como resistente às duas doenças (Reifschneider et al., 1993; Embrapa Hortaliças, 2003). Em 1991, este novo híbrido foi liberado para comercialização, e tem se mostrado altamente produtivo em diversas regiões do País, apresentando excelente qualidade de fruto e maior conservação pós-colheita (Ribeiro et al., 1998).

‘Ciça’ apresenta plantas vigorosas, com hábito de crescimento intermediário, com 1,1 a 1,2 m de altura. As folhas, de coloração verde-escura, possuem poucos espinhos. O florescimento inicia-se 35-45 dias após o transplântio e a colheita 55-65 dias após o transplântio para as condições do Distrito Federal. No plantio durante o inverno há um retardamento do desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, do início da colheita. ‘Ciça’ produz frutos de formato oblongo-alongado com 22 cm de comprimento por 8 cm de diâmetro (que se adequa muito bem a caixas do tipo k), com peso médio de 350 g, de coloração roxo-escuro brilhante, com cálice verde. O híbrido, em condições favoráveis, tem produzido até 120 toneladas de frutos por hectare em propriedades agrícolas do Distrito Federal, com excelente qualidade comercial. Em épocas mais frias, a produtividade reduz para 80 t/ha. Em condições de alta umidade, a antracnose pode acarretar severos danos aos frutos de berinjela, depreciando o produto comercialmente. Por ser resistente à antracnose e a podridão-de-fomopsis, ‘Ciça’ pode ser cultivada o ano todo em locais onde não ocorram geadas. A adubação e os tratamentos culturais são os usuais para o cultivo de berinjela (Reifschneider et al., 1993; Embrapa Hortaliças, 2003).

## **Produção de sementes híbridas**

A produção de sementes híbridas é realizada por meio da emasculação manual ou utilização de linha macho estéril como mãe e transferência de pólen. De acordo com George (2004), a produção de sementes híbridas em Solanáceas, envolve a manutenção de duas linhas parentais de plantas separadas, ou seja, os parentais masculinos e femininos. As plantas da linhagem masculina, que fornecem o pólen, são semeadas em uma data que assegure a produção dos mesmos por ocorrência da antese na linhagem feminina. No início da polinização, as flores abertas da linhagem feminina devem ser removidas. Isso é importante para evitar a presença de algum fruto que já foi estabelecido, resultante da polinização aberta ou autopolinização (George, 2004).

O hábito de florescimento e o mecanismo da flor de berinjela foram estudados por Jones e Rosa (1928). As anteras estão dispostas em forma de cone em volta do estilete, sendo que a deiscência ocorre após a antese, quando o estigma já está receptivo, favorecendo assim, a autofecundação. Todavia, como o estigma usualmente se projeta além das anteras, ele é facilmente alcançado pelos insetos, dando ampla oportunidade para a ocorrência da polinização cruzada. O mesmo autor relatou a técnica da polinização controlada na berinjela e verificou que um ou dois dias antes da antese, o botão é suficientemente grande para permitir a emasculação, além de já estar em condições para receber o grão de pólen (Kadota, 1958), entretanto se a polinização controlada for efetuada após a antese ocorre redução na produção de sementes (Kadota, 1958). A emasculação é efetuada, abrindo-se o botão com auxílio de uma pinça e retirando-se os estames que estão ao redor do estilete. A mudança da cor da pétala do botão de verde para rosa é um indicador de que o estigma está receptivo.

Após a emasculação, efetua-se o cruzamento, colocando o pólen, por intermédio de uma tampa de vidro de penicilina, na superfície do estigma. As plantas desenvolvidas em casa de vegetação apresentam uma maior abundância de pólen em virtude das flores estarem protegidas do vento e das visitas dos insetos que, nas condições de campo, provocam o desprendimento do pólen. A coleta de pólen depende das condições do ambiente, sendo que o seu desprendimento está subordinado a um ambiente seco e quente (Ikuta, 1961). A coleta do pólen pode ser feito por pinça (baixa eficiência) ou com auxílio de um vibrador elétrico (alta eficiência). Na segunda opção, as flores da linhagem masculina devem ser recolhidas com algumas horas de antecedência e colocadas em local seco e fresco, para facilitar o desprendimento do pólen (Nascimento,

2004). Nas condições de casa de vegetação, o desprendimento do pólen é bastante satisfatório a partir das 10 horas da manhã. A coleta do mesmo é realizada com o auxílio de um vibrador elétrico do tipo descrito por McGuire (1952) e modificado pelo engenheiro agrônomo M. Dias para a obtenção de pólen de tomateiro. Com o auxílio deste aparelho, coleta-se pólen em poucos minutos e em abundância, o qual é em seguida transportado em tubinhos de vidro para o campo, onde no mesmo dia as plantas da linhagem feminina são polinizadas com o auxílio da tampa de vidro de penicilina (Ikuta, 1961).

A polinização deve ser executada de preferência em dias claros, de pouco vento, sobretudo no final da manhã, para melhorar a eficiência de fertilização (Nascimento, 2004). Após a realização dos cruzamentos, os botões são protegidos por roletes de papel alumínio e as flores etiquetadas com a descrição do cruzamento. Os roletes são retirados após uma ou duas semanas, dependendo do murchamento do estigma (Ikuta, 1961). A produção de sementes híbridas de berinjela é relativamente fácil e o número de sementes obtido por fruto é muito elevado, o que torna o seu preço bastante acessível (Ikuta, 1961). Nas duas últimas décadas, ocorreu uma grande expansão no uso de sementes híbridas devido à maior facilidade de combinação de um número maior de atributos em um único genótipo e à maior agregação de valor à semente (Giordano et al., 2003).

A produção de sementes híbridas de berinjela é favorecida pelo grande tamanho dos botões florais, abundância de pólen coletado facilmente, amplo período de florescimento, e elevado número de sementes por fruto. Um dos fatores importantes a considerar é que determinados botões estão condenados à queda após o cruzamento (Ikuta, 1981).

### **Conservação de grão de pólen**

A conservação genética mediante o armazenamento de pólen é de interesse para diversas espécies de plantas. O pólen pode ser mantido em bancos de conservação com a descrição da informação do progenitor masculino. Assim, seu uso é facilitado em programas de melhoramento genético (Ganeshan, 1998) e em programas de produção de sementes híbridas.

O sucesso da preservação do pólen, independentemente do período de conservação, depende principalmente de fatores como a temperatura e umidade relativa

do ambiente de armazenamento e do grau de umidade do grão de pólen (Linskens, 1964; Dean, 1965; Khan et al., 1971; Casali et al., 1984; Bezdickova, 1989; Lacerda et al., 1995; Usman et al., 1999; Yogeeshha et al., 1999). Este último fator é muito importante, pois quando úmido, pode formar cristais de gelo durante o armazenamento, inviabilizando os grãos de pólen por danificar seus tecidos. Por outro lado, quando o grão de pólen está extremamente seco, pode haver uma perda na sua capacidade de germinação. Assim, a dessecação deve ser realizada com bastante cuidado.

Para o armazenamento, os grãos de pólen podem ser submetidos a diferentes temperaturas. Algumas espécies conseguem manter a capacidade germinativa dos grãos de pólen, e em condições para produzir sementes, enquanto outras não. Submetida à temperatura 5°C a capacidade germinativa pode ser mantida (Bezdickova, 1989; Silva Filho, 2007) ou reduzida (Hecker et al., 1986; Kanazawa et al., 1992; Dutra et al., 2000). Já nas temperaturas -196°C e -20°C não observou-se redução na capacidade germinativa do grão de pólen de várias espécies (Akihama et al., 1978; Ganeshan, 1986; Hecker et al., 1986; Yates e Sparks, 1989; Gomes et al., 2003; Ferreira et al., 2006). Segundo Casali et al. (1984), a redução da temperatura no armazenamento prolonga a viabilidade do grão de pólen de *Capsicum*. Entretanto o grão de pólen de batata quando armazenado a -20°C e -196°C apresentou viabilidade para produzir sementes (Weatherhead et al., 1978), enquanto pólen de berinjela submetido à 5°C também viabilizou a produção de sementes com qualidade fisiológica, mesmo este tendo sido armazenado por curto período (Nascimento et al., 2003). Assim, a temperatura não é o único fator que afeta a conservação do grão de pólen, devendo levar em consideração o período e a umidade relativa de armazenamento.

Segundo Giordano et al. (2003), a baixa umidade relativa permite a viabilidade do grão de pólen de tomate. Ambientes com umidade relativa controlada e baixa temperatura viabilizam a capacidade germinativa dos grãos de pólen de pimenta (Dutra et al., 2000), enquanto que o aumento da temperatura nesta mesma condição diminui a viabilidade polínica de grãos de *Allium cepa* (Nomura et al., 1994) e de pistache (Vithanage e Alexander, 1985). Kwan et al. (1969) e Chang e Struckmeyer (1975; 1976) trabalhando com grãos de pólen de cebola e Luza e Polito (1985) com grãos de pólen de noz européia, concluíram que o aumento da temperatura e da umidade relativa no ambiente de armazenamento diminuíram drasticamente a viabilidade polínica. Grão de pólen de noz européia armazenado com controle de umidade na temperatura -20°C apresentou viabilidade polínica com o passar do tempo, entretanto sem o controle de

umidade relativa foram encontrados resultados contrastantes (Luza e Polito, 1985; Pinney e Polito, 1990)

Alguns autores relatam que o aumento da temperatura de armazenamento do pólen de diversas espécies diminui progressivamente o vigor germinativo do mesmo, reduzindo seu período de viabilidade (Luza e Polito, 1985; Hecker et al., 1986; Bezdickova, 1989; Barbosa et al., 1991; Kanazawa et al., 1992; Dubouzet et al., 1993; Nomura et al., 1994; Giordano et al., 2003; Ferreira et al., 2006). Em mamão, a redução da temperatura manteve o pólen com capacidade germinativa por um período superior ao viável para produzir sementes (Ganeshan, 1986; Cohen et al., 1989). Isso indica que, mesmo obtendo pólen com germinação viável em teste de laboratório, não significa que o pólen consiga fertilizar o óvulo e produzir sementes. O período de viabilidade depende da espécie e pode durar de dias a anos.

Na maior parte dos trabalhos existente na literatura com grãos de pólen de diversas espécies não há descrição detalhada da metodologia de extração, secagem e conservação, o que dificulta a sua repetibilidade. Soma-se a isto, que inexistem trabalhos com berinjela.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). **Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops**. Fujimoto: The fruit tree Research Statistics, 1978. p.1-7.

ANTONINI, A.C.C.; ROBLES, W.G.R.; NETO, J.T.; KLUGE, R.A. Capacidade produtiva de cultivares de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, p.646-648, 2002.

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; MARTINS, F.P.; BOAVENTURA, Y.M.S. Conservação e germinação do pólen, polinização e frutificação efetiva em pessegueiro e nectarinas subtropicais. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.1, p.17-28, 1991.

BEZDICKOVA, A. **Viability of sweet pepper stored at freezing temperatures**. Bulletin Vyzkumny a Slechtitelsky Ustav Zelinarsky, n. 33, p.51 – 60. CAB Abstracts on CD – ROM, 1990 – 91, 1989.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2ed. Viçosa: UFV, 1998. 453p.

BOTS, M.; MARIANI, C. **Pollen viability in the field**. Radboud: Universiteit Nijmegen, 2005. 52p. Disponível e: < <http://www.cogem.net/ContentFiles/CGM2005-05.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2007.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CASALI, V.W.D.; PÁDUA, J. G.; BRAZ, L. T. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, ano 10, n.113, p.19, 1984.

CHANG, W.N.; STRUCKMEYER, B.E. Influence of temperature, time of day, and flower age on pollen germination, stigma receptivity, pollen tube growth, and fruit set of *Allium cepa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Logan, v.101, p.81-83, 1976.

CHANG, W.N.; STRUCKMEYER, B.E. The influence of temperature and relative humidity on onion pollen germination. **Hortscience**, Madison, v.10, n.2, p.162-163, 1975.

CHASAN, R.; WALBOT, V. Mechanisms of plant reproduction: questions and approaches. **The Plant Cell**, Waterbury, v.5, n.3, p.1139-1146, 1993.

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

DASKALOFF, C. Beitrag zum Studium der heterosis beider eierfrucht (*Solanum melongena* L.) und die Möglichkeit einer praktischen Ausnutzung. **Forschungsdienst**, Risikokommunikation, v.12, p.617-618, 1941.

DASKALOFF, C. Contribution to the study of heterosis in the eggplant (*Solanum melongena* L.) and the possibility and its practical utilization in horticulture. **Rev. Inst. Rech. Agron.**, Bulgaria, v.7, n.4, p.57-76, 1937.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer, 1990. p.1-11.

DEAN, C.E. Effects of temperature and humidity on the longevity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen in storage. **Crop Science**, Madison, v.11, p.125-127, 1965.

DIAS, M.S.; GURGEL, J.T.A. Vigor de híbrido em berinjela. Apresentado na 2ª semana de genética, Piracicaba, 8 a 12 de fevereiro. 1949. Citado por: IKUTA, H. **Vigor híbrido da geração F1 em berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 1961. 41p. Tese (Doutorado em Melhoramento vegetal) – ESALQ, Piracicaba, 1961.

DUBOUZET, J.G.; SHIMOFURUTACHI, M.; ARISUMI, K.; ETOH, T.; MATSUO, E.; SAKATA, Y. Improvement of pollen germinability and storability in some Japanese *Alliums*. **Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University**, Kagoshima, v.29, p.67-74, 1993.

DUMAS, C.; MOGENSEN, H. L. Gametes and fertilization: maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. **The Plant Cell**, Waterbury, v.5, n.3, p.1337-1348, 1993.

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

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Ciça: rende o ano inteiro**. Brasília, DF: 2003. Equipe técnica: Francisco J. B. Reifschneider; Maria Cristina B. Madeira; Cláudia Silva da Costa Silva. Folder

FERREIRA, C.A.; VON PINHO, E.V.R.; ALVIM, P.O.; SILVA, T.T.A. Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: XXVI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABMS/EMBRAPA-CNPMS, 2006. p. 270.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p.

FOSKEY, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580p.

FREITAS, B.M. Changes with time in the germinability of cashew (*Anacardium occidentale*) pollen grains found on different body areas of its pollinator bees. **Review of Brazilian Biology**, Rio de Janeiro, v.57, n.2, p.289-294, 1997.

GANESHAN, S. Pollen storage in tropical fruits. In: ARORA, R.K.; RAO, V.R. **Tropical Fruits in Asia – Diversity, Maintenance, Conservation and Use**. Bengalore, India: IPGRI, 1998. p.119-126.

GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196°C). **Tropical Agricultural**, India, v.63, n.1, p.46-48, 1986.

GEORGE, R.A.T. **Tecnología de las semillas de hortalizas: guía técnica de la producción, procesamiento, almacenamiento y control de calidad de semillas de hortalizas**. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1983. 117p.

GEORGE, R. A. T. **Vegetable seed production**. 2ed. Wallingford: CABI, 2004. 328p.

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

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

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

HORTIBRASIL. **Berinjela**. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br/classificacao/berinjela/berinjela.html>>. Acesso em: 14 ago. 2007.

IKUTA, H. Produção de sementes híbridas F1 em berinjela. In: CURSO DE PRODUÇÃO E TECNOLOGIA DE SEMENTES DE HORTALIÇAS, 1., 1981, Brasília. **Palestras...** Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1981. p.191-192.

IKUTA, H. **Vigor híbrido da geração F1 em berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 1961. 41p. Tese (Doutorado em Melhoramento Vegetal) – ESALQ, Piracicaba, 1961.

JONES, D.F. Heterosis and homeostasis in evolution and in applied genetics. **The American Naturalist**, Chicago, v.92, n.867, p.321-328, 1958.

JONES, H.A.; ROSA, J.T. **Truck crop plants**. New York: MacGraw-Hill Book, 1928. 538p.

KADOTA, T. **Produção de sementes F1 Enguei Guijutsu Shinssetsu**. Tóquio: Yokendo, 1958. 562p.

KANAZAWA, T.; KOBAYASHI, S.; YAKUWA, T. Flowering process, germination and storage of pollen in *Allium victorialis* L. spp. *Platyphyllum* Hult. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japan, v.60, n.4, p.947-953, 1992.

KESSEL, R.G.; SHIH, C.Y. **Sanning electron microscopy in biology**. New York: Springer-Verlag, 1976. 345p.

KHAN, M.N.; HEYNE, E.C.; GOSS, A.E. Effect of relative humidity on viability and longevity of wheat pollen. **Crop Science**, Madison, v.11, p.125-127, 1971.

KWAN, S.C.; HAMSON, A.R.; CAMPBELL, W.F. Storage conditions for *Allium cepa* L., pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Logan, v.94, n.6, p.569-570, 1969.

LACERDA, C.A.; OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, E.C.; LIMA, J.O.G. Meio de cultura e condição ideais para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz Kada. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.241, p. 308-318, 1995.

LANNA, F.C.A. **Estudo de herança da resistência da berinjela (*Solanum melongena* L.) a *Phytophthora capsici* Leonian**. 1991. 39p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento vegetal) - UFV, Viçosa, 1991.

LIMA, L.B. **Influência do repouso pós-colheita no peso e germinação de sementes híbridas de berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 2000. 38p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade para o desenvolvimento do Estado da Região do Pantanal, Campo Grande, 2000.

LINSKENS, H.F. Pollen physiology. **Annual Review Plant Physiology**, [s.l.], v.14, p.225-226, 1964.

LUZA, J.G.; POLITO, V.S. *In vitro* pollen germination and storage of English walnut pollen. **Scientia Horticulture**, Davis, v.27, n.3-4, p.303-316, 1985.

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

McGUIRE, D.C. Storage of tomato pollen. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.60, p.419-424, 1952.

MIRANDA, J.E.C. **Análise genética de um cruzamento dialélico em pimentão (*Capsicum annum* Mill)**. 1987. 159p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - ESALQ/USP, Piracicaba, 1987.

NASCIMENTO, W.M. Produção de sementes de berinjela. In: IV CURSO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE HORTALIÇAS, 4., 2004, Brasília. **Palestras...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. CD-ROM.

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

NODA, H. **Critérios de avaliação de progênies de irmãos germanos interpopulacionais em berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 1980. 91p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - ESALQ/USP, Piracicaba, 1980.

NOMURA, Y.; MAEDA, M.; TSUCHIYA, T.; MAKARA, K. Efficient production of interspecific hybrids between *Allium chinense* and edible *Allium* spp. through culture and pollen storage. **Breeding Science**, Tokyo, v.44, p.151-155, 1994.

PATERNIANI, E. **Estudos recentes sobre heterose**. São Paulo: Fundação Cargil, 1974. 36p. (Boletim, 1).

PINNEY, K.; POLITO, V.S. Olive pollen storage and *in vitro* germination. **Acta Horticulturae**, Davis, v.286, p.207-210, 1990.

REID, M.S.; FUJINO, D.W.; HOFFMAN, N.E.; WHITEHEAD, C.S. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) – The transmitted stimulus in pollinated flowers? **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.3, p.189-196, 1984.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; MADEIRA, M.C.B.; SILVA, C. ‘Ciça’: novo híbrido de berinjela resistente à antracnose e à podridão-de-fomopsis. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.1, p.57, 1993.

RIBEIRO, C.S.; BRUNE, S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Cultivo da berinjela (*Solanum melongena* L.)**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. 23p. (Instrução Técnica nº15).

RODRIGUES, J.D.; PEDRA, J.F.; RODRIGUES, S.D. **Fisiologia vegetal. Crescimento e desenvolvimento**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, n.p., 1977.

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

SOUSA, J.A.; MALUF, W.R.; GOMES, L.A.A. Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de polinização aberta e híbridos F1 de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.21, p.334-342, 1997.

USMAN, I. S., MAMAT, A. S., MODH, H. S. Z. S., AISHAH, H. S., ANUAR, A. R. The non-impairment of pollination and fertilization in the abscission of chilli (*Capsicum annuum* L. var. Kulai) flowers under high temperature and humid conditions. **Scientia Horticulturae**, Israel, v.79, n.1-2, p.1-11, 1999.

USP. **O que tem a flor a ver com o fruto?** Disponível em <<http://darwin.futuro.usp.br/dandelions/24bio.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2003.

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

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

YATES, I.E.; SPARKS, D. Hydration and temperature influence *in vitro* germination of pecan pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Athens, v.114, n.4, p.599-605, 1989.

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

ZAMIR, D.; JONES, R.A. Estimates of the number of pollen grains applied a stigma in a single pollination. **Tomato Genetics Crops**, [s.l.], v.31, p.21, 1981.

ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. (Ed.). **Compendium of cucurbit diseases**. St. Paul: APS Press, 1996. 87p.

## **CAPÍTULO 1**

### **VIABILIDADE E TOLERÂNCIA A DESSECAÇÃO DE PÓLEN DE BERINJELA**

(Trabalho a ser enviado a Revista Brasileira de Sementes)

## VIABILIDADE E TOLERÂNCIA A DESSECAÇÃO DE PÓLEN DE BERINJELA

FRANÇA, L.V.; CARMONA, R.; NASCIMENTO, W.M.

### RESUMO

A alta demanda por sementes híbridas tem estimulado pesquisas que asseguram a oferta destas, como é o caso da manipulação de grãos de pólen. Assim, em estudo conduzido na Embrapa Hortaliças e na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no ano de 2006, objetivou-se determinar a tolerância à dessecação do grão de pólen visando a produção de sementes híbridas, além de determinar metodologias (germinação *in vivo*, *in vitro* e solução de tetrazólio) para avaliar a viabilidade polínica de berinjela 'Ciça'. Para avaliar a eficiência do grão de pólen foi utilizado pólen fresco (testemunha) e pólen seco com sílica gel em recipiente de alumínio e dessecador por períodos de 24 e 48 horas. Os respectivos grãos de pólen foram polinizados na linhagem feminina onde foi avaliado o pegamento de fruto, produção e qualidade fisiológica de sementes através de: massa de 100 sementes, teste de primeira contagem, germinação, emergência de plântulas e envelhecimento acelerado. Na germinação *in vitro*, o pólen fresco foi incubado à temperatura ambiente no meio de cultura de Brewbaker e Kwack (1963) pelos períodos de 30 minutos e 16 horas em diferentes concentrações de sacarose (0; 5,0; 7,5 e 10,0 g/L), e analisados mediante fotografias digitais em microscópio óptico (10x). Na germinação *in vivo*, o pólen fresco foi polinizado na linhagem feminina, onde após 4 e 24 horas em contato com o estigma, o grão de pólen foi submetido a coloração com o pigmento azul de anilina e analisado em microscópio ultravioleta na objetiva 10x. Na solução de tetrazólio em diferentes concentrações (1; 0,75 e 0,5%), adicionou pólen fresco e os submeteu à 25°C por 24 horas, analisando em microscópio óptico (10x) e em lupa, a coloração da massa de pólen. Concluiu-se que protocolos para germinação *in vitro* de berinjela devem ser estudados; grão de pólen de berinjela em contato com o estigma por 24 horas validou o teste de germinação *in vivo*; a metodologia de viabilidade polínica com a utilização de solução de tetrazólio deve ser melhorada; grão de pólen com teor de água de 4,7% a 47,2% proporcionou uma boa produção de sementes.

**Palavras chaves:** *Solanum melongena*, produção de sementes, qualidade fisiológica, germinação *in vivo* e *in vitro*.

## VIABILITY AND DISSACATION TOLERANCE OF EGGPLANT POLLEN

FRANÇA, L.V.; CARMONA, R.; NASCIMENTO, W.M.

### ABSTRACT

The demand of hybrid seeds has stimulated researcheres, including the pollen grain manipulation, to ensure the availability of those seeds. Thus, in a study developed at Embrapa Vegetables and Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, in 2006, determined the tolerance for pollen grain dissacation to produce seeds, and determined the methodologies (*in vivo* germination test, *in vitro* pollen germination and stained with tetrazolium test) to evaluate the pollen viability of 'Çiça'eggplant. To asses the efficiency of pollen grain drying it were used fresh pollen (control) and dry pollen using silica-gel in aluminum and dissector containers for 24 and 48 hours. The pollen grains were pollinated in female plants where was evaluated the fruit set, production and physiological seed quality (seed mass, first counting, germination, seedling emergence and accelerated aging). For *in vitro* pollen germination, the fresh pollen was incubated at laboratory conditions in culture medium of Brewbaker and Kwack for 30 minutes and 16 hours in different sucrose concentrations (0; 5,0; 7,5 and 10,0 g/L), and evaluated by digital photograph in an optical microscope (10x). For *in vivo* germination test, the fresh pollen was pollinated in female plants, and after 4 and 24 hours in their stigma the pollen grains were stained with aniline blue and evaluated in an ultraviolet light microscope. Fresh pollen grains were put in tetrazolium solutions (1; 0,75 and 0,5%) and submitted at 25°C for 24 hours. After this time it was evaluated the pollen staining using a microscope and a loupe. The results indicated that there is necessity studies to find the methodology to evaluate the viability of pollen with *in vitro* test; the eggplant pollen in the plant for 24 hours evaluate the pollen viability; pollen drying at moisture content of 4,7% and 47,2% was efficient to eggplant seed production. Physiological seed quality was not affected by the pollen drying method.

**Keywords:** *Solanum melongena*, seed production, seed physiological quality, *in vivo* germination test and *in vitro* pollen germination.

## INTRODUÇÃO

Atualmente a demanda por berinjela (*Solanum melongena* L.) tem aumentado, pois além de ser um produto saudável, apresenta propriedade que reduz o nível de colesterol. Os híbridos têm sido mais utilizados, pois além do ganho com a heterose e a melhor resistência à doenças, a produção de sementes híbridas é facilitada, devido ao tamanho do botão floral da espécie, entre outras vantagens.

Conhecer a capacidade germinativa (viabilidade) do grão de pólen do progenitor masculino é fundamental no processo de hibridação artificial. A viabilidade do pólen pode ser afetada durante a maturação da planta por vários fatores endógenos e exógenos, tais como estágio de desenvolvimento da flor (Lacerda et al., 1994); altas (40°C) (Giordano et al., 2003) e baixas temperaturas (15°C) (Chira, 1963); estado nutricional da planta (Howlett, 1936); luminosidade (Goss, 1971), defensivos agrícolas e outras substâncias químicas (MacDaniels e Hildebrand, 1939; Dubey e Mall, 1972).

Segundo Sari-Gorla et al. (1995) tanto o diâmetro do grão de pólen quanto a capacidade de emissão do tubo polínico, podem ser considerados como indicadores da qualidade do pólen, independente do efeito do ambiente que se encontra a flor a ser polinizada, porém o desempenho do pólen varia de acordo com a combinação genética pólen-pistilo.

A viabilidade do grão de pólen, medida de fertilidade masculina, pode ser determinada através de diferentes técnicas (Dafni, 1992; Kearns e Inouye 1993). Estas podem ser agrupadas em métodos diretos, tais como a indução da germinação *in vitro* (Dutra et al., 2000; Gomes et al., 2003; Pio et al., 2007) e *in vivo* (Oliveira et al., 2001; Ferreira et al., 2006) ou método indireto baseado em parâmetros citológicos, como a coloração (Shivanna e Johri, 1985; Dafni, 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992; Kearns e Inouye, 1993).

Dentre os corantes mais utilizados destacam-se o carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Stanley e Linskens, 1974; Sharma e Sharma, 1994), cloreto de trifeniltetrazólio e tetrazólio vermelho (Shivanna e Rangaswamy, 1992), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo. Na literatura não há a descrição de um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico. Os corantes nucleares, de acordo com Alexander (1969, 1980), têm uma aplicação limitada, pois colorem somente grãos de pólen funcionais, enquanto que aqueles inviáveis são identificados por não

colorirem. Assim, não são adequados para espécies cujos grãos de pólen apresentam paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas, pois dificultam a sua penetração e impedem a coloração. Nessa condição, grãos de pólen viáveis podem não apresentar coloração e serem equivocadamente classificados como não viáveis. Para evitar isso, uma alternativa seria a utilização de corantes a base de verde malaquita e fucsina ácida que, devido às suas propriedades químicas básicas e ácidas, respectivamente, colorem grãos de pólen viáveis e não viáveis, mostrando-se eficiente para várias espécies.

A germinação de grãos de pólen *in vitro* é um dos métodos que permite verificar sua viabilidade (Dutra et al., 2000; Gomes et al., 2003). O método geral consiste em germinar uma pequena amostra em um meio de cultura apropriado e observar em microscópio, após um determinado período, a porcentagem de grãos de pólen que desenvolvem tubo polínico. A composição do meio e o pH estão entre os fatores que afetam a sua germinação. O pólen das angiospermas precisa de uma fonte de carbono, de boro e, freqüentemente de outros nutrientes para promover a sua germinação (Galleta, 1983). Segundo Pfahler (1967), a adição de boro tem importância, e suas respostas são variáveis conforme a espécie. Seu mecanismo de ação consiste em interagir com o açúcar e formar um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares. Thompson e Batjer (1950) verificaram que a adição de boro ao meio aumentou marcadamente a porcentagem de germinação e o comprimento do tubo polínico de várias frutíferas de clima temperado. O cálcio adicionado ao meio de cultura para germinação propicia características fisiológicas com o tubo polínico e grão de pólen com menor sensibilidade a variações do meio básico, menor permeabilidade, crescimento em forma linear e aparência rígida do tubo polínico (Bhojwani e Bhatnagar, 1974). Na ausência de cálcio, há uma maior permeabilidade da membrana do tubo polínico, causando a liberação de metabólitos internos para o meio externo (Stanley e Linskens, 1974). Beyoung (1965) observou, em 46 espécies hortícolas, que a adição de cálcio promoveu a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico em todas as espécies estudadas. Brewbaker e Kwack (1963), trabalhando com 86 espécies e 39 famílias, mostraram que a adição de cálcio e boro atua como um fator de controle primário da germinação do tubo polínico *in vitro*.

O açúcar empregado no meio de cultura tem por finalidade proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e a solução de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (Stanley e Linskens, 1974;

Galleta, 1983; Miranda e Clement, 1990). Dentre os açúcares, a sacarose é a mais indicada para a cultura de óvulos de *Lycopersicon peruvianum*, sendo crucial para o crescimento do ovário e formação de sementes *in vitro* (Torres, 1984). Para a cultura do tomate (Silva Filho, 2007) e fumo (Loguercio, 2002), o meio de cultura de Brewbaker e Kwack (1963) deve ser calibrado com 10g/L de sacarose.

Segundo Akamine e Girolami (1959), tubos polínicos se rompem devido, entre outros fatores, a alta umidade e a variação do meio, ocasionada pelo aumento da pressão osmótica e pela baixa resistência da parede celular.

O teste de germinação *in vitro* tenta através do meio de cultura simular o ovário da planta, ambiente em equilíbrio para desenvolvimento do tubo polínico, local este utilizado para germinação do grão de pólen na germinação *in vivo*. Assim, a germinação *in vivo* consiste em colocar o grão de pólen no estigma da flor receptiva, e avaliar ao microscópio aqueles desenvolvidos (Silva Filho, 2007). Pode-se ainda avaliar a germinação pela porcentagem de pegamento ou frutificação (Galleta, 1983) ou pelas sementes produzidas (Stanley e Linskens, 1974; Akihama et al., 1978).

Galleta (1983) considera que o método de corante superestima a porcentagem de germinação do grão de pólen, enquanto o teste *in vitro* a subestima. Já para Einhard et al. (2006), amostras de pólen que parecem não viáveis quando testadas *in vitro*, podem produzir boa porcentagem de sementes *in vivo*. A coloração, embora seja um procedimento simples e de baixo custo, não fornece informações sobre a capacidade germinativa do pólen, o que pode ser obtido por meio de testes de germinação *in vitro* (Techio et al., 2006) ou *in vivo* (Einhardt et al., 2006).

A planta quando bem manejada apresenta pólen com alta capacidade germinativa. Este pólen pode ser utilizado tanto em sistema de conservação de germoplasma, da mesma forma em que se utilizam sementes e partes vegetativas (Yates e Sparks, 1990), como em programas de melhoramento genético para utilização em hibridação artificial.

A preservação da viabilidade dos grãos de pólen, durante curto ou longo período de conservação, envolve a redução do grau de umidade, a utilização de temperaturas mais baixas durante o armazenamento e, em alguns casos, a exclusão do oxigênio do interior dos recipientes de armazenamento (Akihama et al., 1979). Com isto, as variações da taxa respiratória e de outros processos metabólicos são minimizadas, tornando o pólen, então, quase inativo ou dormente durante o tempo em que estiver armazenado (Snyder e Clausen, 1974). Soma-se a isto, a redução da proliferação de microorganismos, e conseqüentemente à deterioração dos grãos de pólen.

Segundo Martins et al. (1981), quanto menor o período e maior a temperatura de armazenamento, maior poderá ser o teor de água do grão de pólen. Assim, pólen com baixo teor de água (8 a 10%), propicia boa longevidade, independente do método de armazenamento (Sprague e Johnson, 1977). Em vários trabalhos, a viabilidade do pólen armazenado é mantida quando o mesmo está seco (Sousa, 1988); neste caso, há uma diminuição do risco de formação intracelular de cristais de gelo (Barnabás e Rajki, 1976). A formação destes cristais pode romper os tecidos celulares, possivelmente devido a lesões na membrana celular (Polito e Luza, 1988) o que afeta a viabilidade do pólen.

Segundo Weatherhead et al. (1978), não existe a necessidade da secagem do pólen antes do armazenamento, uma vez que foi possível a produção de sementes botânicas de batata utilizando pólen fresco. Entretanto, segundo Akihama et al. (1978), também é possível produzir sementes de pêra e pêsego utilizando pólen seco e armazenado.

A secagem é a forma de reduzir o teor de água do pólen. Esta deve ser realizada com cuidado, não permitindo que a temperatura de secagem exceda 28°C (Argerich e Gaviola, 1995). Pólen muito seco pode reduzir sua capacidade germinativa por perder água de constituição. Algumas técnicas para retirar umidade do grão de pólen são liofilização (Mcguire, 1952; Akihama et al., 1978) e utilização de substâncias higroscópicas, podendo ser sílica gel (Ahlgren e Ahlgren, 1978; Pereira et al., 2002), solução de cloreto de sódio (Ferreira et al., 2006), ou outras, desde que acondicionadas em recipientes que proporcionem a condição de vácuo (dessecador).

A quantidade de água que pode ser retirada do grão de pólen varia com a espécie. Em milho, por exemplo, a retirada de água reduz sua viabilidade (Ferreira et al., 2006), enquanto que em beterraba, essa viabilidade é mantida (Hecker et al., 1986). O pólen tolera dessecação até certo ponto, sendo que a perda da viabilidade em diferentes espécies tem sido correlacionada com a perda de água e a manutenção do estado de desidratação em condições naturais e de laboratório (Linskens e Cresti, 1988; Nepi e Pacini, 1993; Lisci et al., 1994). A gramínea *Festuca arundinaceae* apresenta pólen parcialmente desidratado com viabilidade reduzida ou quase nula após a deiscência das anteras (Pacini et al., 1997).

Na literatura, dificilmente são mencionadas formas de secagem do pólen, e nos casos em que isso ocorre (Mcguire, 1952; Kwan et al., 1969; Akihama et al., 1978; Ferreira et al., 2006; Silva Filho, 2007) não existe uma descrição detalhada da

metodologia utilizada e do teor de água residual presente no grão de pólen. Isto dificulta sua repetibilidade e utilização prática na produção de sementes híbridas.

O objetivo deste trabalho foi realizar testes preliminares para avaliar a viabilidade e determinar a tolerância à dessecação do pólen de berinjela que viabilize a produção de sementes híbridas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Germinação *in vitro***

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular da Embrapa Hortaliças, em janeiro de 2006. Grãos de pólen do progenitor masculino da berinjela ‘Ciça’ foram coletados de flores em antese utilizando um pequeno vibrador elétrico. Para o estabelecimento do protocolo de germinação de grãos de pólen *in vitro* foi utilizado, como padrão, o meio de cultura composto de macro e microelementos de Brewbaker e Kwack, que consiste de  $\text{KNO}_3$  (100 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (200 g/L),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (100 g/L) e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (300 g/L) (Brewbaker e Kwack, 1963).

Para calibrar o açúcar do meio, primeiramente foi adicionado concentrações de 0; 2,5; 5; 10; 15 e 20g/L de sacarose. Em lâminas, foram aplicadas duas gotas do meio de cultura com os respectivos níveis de sacarose, e nelas distribuído os grãos de pólen. As lâminas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Cada meio de cultura com sua respectiva concentração de sacarose foi realizada em uma lâmina. Não realizou a contagem dos grãos de pólen germinados, apenas avaliou visualmente o desenvolvimento dos tubos polínicos em microscópio óptico com objetiva 10x. Baseado nesse teste prévio, repetiu-se o teste, mas adicionando ao meio, respectivamente as seguintes concentrações de sacarose (0; 5,0; 7,5 e 10,0 g/L). Foram aplicadas, em lâminas, duas gotas do meio com os respectivos níveis de sacarose e nelas distribuído os grãos de pólen. Cada lâmina era uma parcela. As lâminas foram colocadas em câmaras úmidas constituídas por placas de Petri alinhada com papel de filtro umedecido, e incubadas à 25°C sob luz fluorescente de 40W por 16 horas. Na incubação por 16 horas, a avaliação dos grãos de pólen germinados e não germinados foram fotografados com máquina digital em microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x. As lâminas fotografadas foram analisadas em três regiões cada, e nestas foram contados os grãos de pólen germinados e os não germinados, sendo considerado grão de pólen

germinado aquele que apresentava o tubo polínico desenvolvido. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições, utilizando o Sisvar (Ferreira, 2000) como programa estatístico. Os dados foram transformados em  $(x)^{1/2}$  e as médias comparadas por regressão polinomial.

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

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, no ano de 2006.

Botões florais do progenitor feminino foram emasculados e polinizados com pólen fresco, recém-extraído. Após 4 e 24 horas de contato entre o grão de pólen e o estigma, a flor foi colhida. Desta retirou-se o pistilo e o submeteu a um fixador em 30% de etanol (3 partes de álcool etílico e 1 parte de ácido acético) por 10 minutos, cuja função foi manter os grãos de pólen no estágio que estavam assim que a flor foi retirada da planta. Em seguida foi efetuada a lavagem dos pistilos por 30 minutos em álcool 70% para despigmentar o tecido do carpelo e facilitar a análise. Após, efetuou a lavagem em água destilada seguida da solução de hidróxido de sódio (NaOH) por 20 minutos, para “amolecer” o tecido do pistilo. Lavou novamente em água destilada e o macerou em uma lâmina com duas gotas do pigmento azul de anilina a 0,1% em 0,1N de fosfato de potássio (O'Brien e McCully, 1981; Torres, 1984), deixando reagir por 5 minutos. Após esse período, o pistilo foi analisado em microscópio de luz ultravioleta na objetiva 10x, observando o desenvolvimento do tubo polínico via fluorescência. Foram considerados grãos de pólen germinados aqueles que apresentaram tubo polínico e/ou coloração verde brilhante, e os não germinados aqueles de coloração marrom.

Para o período de 4 horas foi utilizado somente um botão floral. Para o período de 16 horas utilizou três repetições, onde cada repetição consistiu de uma lâmina com um estigma, sendo cada lâmina composta pela média de três regiões da mesma ao acaso com área de 5 mm<sup>2</sup> (Figura 1.1) analisada, pois a quantidade de pólen era elevada. Nesta área, contou os grãos pigmentados (germinados) e os não pigmentados e, baseado no total, foi expresso a porcentagem de grãos germinados. Essa pigmentação acontece devido a reação do corante azul de anilina com a calose, substância presente nos grãos maduros prontos para emitir o tubo polínico (Currier, 1957; Stanley e Linskens, 1974); isto a deixa fluorescente, sendo este um indicativo da viabilidade polínica (Linskens e

Esser, 1957; Stanley e Linskens, 1974) (Figura 1.2). A análise não foi realizada pela fotografia, por nela não ser possível visualizar os grãos não pigmentados (inviáveis).

### **Viabilidade polínica através de solução de tetrazólio**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, em junho de 2006. Inicialmente, preparou-se uma solução de tetrazólio nas concentrações de 1; 0,75 e 0,5%. As soluções foram colocadas em eppendorfs com volume de 1,5ml. Em cada concentração foi adicionado uma pequena porção de grão de pólen fresco, sendo os eppendorfs cobertos com papel alumínio e agitados para que os grãos de pólen entrassem em contato com a solução. Em seguida, foram colocados em germinador BOD à 25°C por 24 horas. Após esse período, os grãos de pólen foram analisados de três formas: a) visualização a olho nu da coloração da massa de pólen no eppendorf; b) coloração dos grãos de pólen em lâminas, observado em microscópio óptico na objetiva 10x; e c) coloração dos grãos de pólen em papel filtro, observado em lupa.

Baseado nos resultados obtidos, foi colocado pólen fresco e pólen extraído armazenado por dois anos em eppendorfs contendo solução de tetrazólio na concentração de 0,75%. Os mesmos foram cobertos com papel alumínio e agitados. Em seguida, foram colocados em germinador BOD à 25°C por 24 horas. Após esse período os grãos foram analisados de duas formas: a) visualização a olho nu da coloração da massa de pólen no eppendorf; e b) coloração dos grãos de pólen em lâminas, observado em microscópio na objetiva 10x.

### **Tolerância do pólen à dessecação**

O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, no período de junho a outubro de 2006. Foram coletadas flores da linhagem masculina do híbrido de berinjela 'Ciça' e extraído pólen com auxílio de vibrador elétrico. A umidade do grão de pólen foi reduzida através do acondicionamento dos mesmos em *eppendorf* (1500µl) abertos e submetidos à secagem em dessecador e recipiente de alumínio com 300 gramas de sílica gel, ambos por períodos de 24 e 48 horas em ambiente de laboratório. Em cada *eppendorf* havia pólen extraído de 30 flores. Como testemunha, foi utilizado pólen fresco (extraído e não submetido a dessecação).

Foi determinado o grau de umidade do grão de pólen na base úmida para todos os tratamentos, adotando a mesma metodologia utilizada para a determinação do grau de umidade de sementes (Brasil, 1992). Em virtude do grão de pólen ser pequeno e leve, foram confeccionadas taras de papel alumínio com diâmetro de 1,5 cm e 1,0 cm de altura. Nelas foram colocadas uma porção de grão de pólen (quantidade aproximada de pólen extraído de 20 flores) e pesada em balança de precisão com três casas decimais e, em seguida, colocada em estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, sendo após esse período pesada novamente, a tara com os grãos de pólen seco e somente a tara. Assim a umidade foi determinada pela seguinte equação:

$$U = \frac{(P_u - P_s)}{(P_u - P_t)} \times 100$$

Onde:

U – Grau de umidade do grão de pólen (%)

P<sub>u</sub> – Peso úmido (g)

P<sub>s</sub> – Peso seco (g)

P<sub>t</sub> – Peso da tara (g)

A umidade de cada tratamento foi determinada pela média encontrada de três amostras de cada tratamento.

Os grãos de pólen frescos e secos foram polinizados em flores da linhagem feminina da cultivar ‘Ciça’ no estágio de botão, onde após a emasculação, com auxílio de uma tampa de penicilina, contendo o pólen, foi realizada a polinização. Foram polinizados, ao acaso, 10 botões para cada tratamento. Após 15 dias da polinização, foi verificado o pegamento de fruto nas plantas. Sessenta dias após a polinização, os frutos produzidos foram colhidos e colocados em repouso por 15 dias em local sombreado, seco e arejado, conforme Nascimento et al., 2000. Após o repouso, as sementes foram extraídas, e para isso, cortou-se os frutos em pequenos pedaços e em seguida, passou os pedaços de frutos duas vezes em um equipamento desintegrador de polpa. Foi adicionado água à polpa com a semente para a extração úmida. As sementes foram então submetidas a uma pré-secagem à  $32^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, seguida de uma secagem à  $40^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, mantendo a semente com umidade de aproximadamente 5%. As sementes foram avaliadas imediatamente após a extração mediante os seguintes parâmetros:

*Número de sementes por fruto:* pesou-se a quantidade de sementes extraídas dos frutos e, baseado na massa de 100 sementes, estipulou-se o número de sementes por fruto.

*Massa de 100 sementes:* quatro sub-amostras de 100 sementes de cada tratamento foram pesadas, sendo a média dos resultados expressos em gramas (g).

*Teste de germinação:* o teste foi conduzido segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Foram utilizadas para cada tratamento quatro repetições de 50 sementes em caixas gerbox sobre papel umedecidos com água e levadas ao germinador em temperatura alternada de 20°C (16 horas) por 30°C (8 horas), sendo as avaliações realizadas aos 7 (primeira contagem) e 14 dias.

*Teste de emergência de plântulas em substrato:* foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento. A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno expandido (isopor®) de 200 células, contendo uma semente por célula, utilizando como substrato artificial à base de Plantmax®. O teste foi desenvolvido em casa de vegetação com avaliação aos 32 dias.

*Teste de envelhecimento acelerado:* o teste foi conduzido segundo França et al. (2007) em gerbox adaptado, e para formar uma câmara úmida com 76% de umidade relativa foi adicionado 40 ml da solução salina na concentração 40g NaCl/100ml H<sub>2</sub>O. Neste gerbox foi colocado uma tela suspensa e acondicionadas as amostras de cada tratamento de maneira a constituírem uma camada única de sementes. Cada amostra continha aproximadamente 250 sementes. Os gerbox foram mantidos por 96 horas em estufa a 41°C. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito anteriormente, sendo avaliadas após 7 dias.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Utilizou-se o Sisvar (Ferreira, 2000) como programa estatístico. Os dados foram transformados em  $(x+1)^{1/2}$ , e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey. Realizou-se regressão polinomial para a variável umidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Germinação *in vitro***

A germinação *in vitro* é considerada um indicativo da viabilidade polínica (Sari-Gorla et al., 1995). Esta atividade simula o ovário da planta onde o pólen naturalmente

germinaria. No teste em que os grãos de pólen permaneceram incubados por 30 minutos, em todos os tratamentos foi possível observar o início da emissão do tubo polínico, embora estes não estivessem bem desenvolvidos. A análise foi realizada visualmente, sendo que nas concentrações de 5g/L e 10g/L de sacarose, observou-se uma maior germinação, entretanto, constatou-se que o tempo de incubação foi curto. Segundo Lacerda et al. (1995), para meios de cultura em condições ideais para germinação de pólen de tomate, os níveis de sacarose e o tempo de incubação influenciaram na germinação dos grãos de pólen. Assim, no segundo teste, os grãos foram incubados por um maior período, ou seja, 16 horas.

Os grãos de pólen germinaram no meio em todos os níveis de sacarose analisados (Figuras 1.3 a 1.6), entretanto, quando incubados a 5,0 g/L apresentaram grande índice de grãos de pólen rompidos (Figura 1.4). Segundo Akamine e Girolami (1959) e Salles et al. (2006), tubos polínicos se rompem devido, entre outros fatores, a alta umidade e a variação do meio ocasionada pelo aumento da pressão osmótica e pela baixa resistência da parede celular.

Conforme Figura 1.7, o meio de cultura com nível de sacarose de 7,5 g/L apresentou diferença significativa quando comparado aos demais níveis analisados. Entretanto, seu resultado não foi satisfatório, pois mesmo tendo apresentado a melhor germinação, foi observada uma porcentagem muito baixa. Em outros trabalhos, nas culturas da cebola (Gomes et al., 2003) e de pimenta (Dutra et al., 2000), a germinação *in vitro* encontrada foi de 49,8 % e 82,0%, respectivamente.

Isso indica a necessidade de estudos para a verificação da possibilidade de aumentar a porcentagem de germinação *in vitro*, que pode ser realizado de duas formas:

- Através da calibração dos macro e microelementos como cálcio e boro presentes no meio de cultura Brewbaker e Kwack (1963), uma vez que ambos são elementos essenciais para o início do prolongamento da intina e conseqüente formação do tubo polínico *in vitro* (Brewbaker e Kwack, 1963; Pio et al., 2004; Marcos Filho, 2005). Altas dosagens de cálcio e ausência de boro podem aumentar a quantidade de grãos de pólen rompidos com a liberação do conteúdo citoplasmático para o meio externo além de um baixo índice de grãos de pólen germinados (Pio et al., 2004). Assim, a calibração desses elementos ao meio de cultura pode aproxima-lo das condições do ovário da planta, podendo aumentar a porcentagem de germinação *in vitro* e

validando esta técnica de viabilidade polínica para a espécie *Solanum melongena*; ou

- Através de estudos com outros protocolos que validam a germinação *in vitro* com grãos de pólen para berinjela, pois mesmo o protocolo de Brewbaker e Kwack (1963) sendo eficiente para germinação de grãos de tomate (Silva Filho, 2007) existe a possibilidade dele não ser adequado para germinação de grãos de pólen dessa espécie.

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

O grão de pólen inicialmente permaneceu em contato com o estigma por 4 horas, entretanto, não foi observado emissão de tubo polínico. Cada espécie apresenta um período para que o pólen emita o tubo polínico e permita a avaliação da germinação *in vivo*. Para tomate, por exemplo, são necessários apenas 4 horas (Silva Filho, 2007) enquanto para pêsego são necessários 4 dias (Einhardt et al., 2006). Baseado nisso, repetiu-se o teste deixando o grão de pólen em contato com o estigma por um período maior, ou seja, por 24 horas; neste caso, obteve-se a emissão do tubo polínico com média de germinação de 66%. A quantidade de grão de pólen variou nas repetições analisadas (Tabela 1.1), o que pode ter sido influenciado pela pressão dada ao pistilo, no momento que os grãos de pólen foram espalhados na lâmina. Essa porcentagem de germinação valida o teste, pois segundo Scorza e Sherman (1995) uma boa porcentagem de germinação encontra-se entre 50% e 80%.

### **Viabilidade polínica através da solução de tetrazólio**

No primeiro estudo, a coloração da massa de pólen na concentração de 1% ficou muito escura (Figura 1.8), à 0,5 % não coloriu bem, entretanto à 0,75% os grãos de pólen apresentaram uma boa coloração (vermelho-carmin) (Figura 1.9). Colocando-os em lâmina de microscopia e observando em microscópio óptico, verificou-se que a grande maioria dos grãos de pólen permaneceram brancos (indicativo de inviabilidade polínica), ao contrário do resultado satisfatório visto na massa de pólen. Em papel de filtro visto em lupa, não foi possível distinguir a cor dos grãos de pólen (Figura 1.10) que pode ser explicado possivelmente pela dificuldade de colocar no papel de filtro uma pequena quantidade de grãos sem interferir no tratamento; ou pelo pequeno tamanho

dos grãos, o que dificulta sua manipulação ou finalmente por a lupa não proporcionar um aumento significativo para o material utilizado.

No segundo estudo, comparando os grãos frescos e armazenados na solução de 0,75% de tetrazólio, observa-se que a massa daqueles armazenados não coloriram, enquanto a massa dos grãos frescos apresentou coloração vermelho-carmim (Figura 1.11). Mesmo a massa de grãos de pólen fresco tendo colorido, como observado anteriormente, quando visto em microscópio, ele permaneceu branco. Este último resultado torna o primeiro insatisfatório.

A validação do teste de coloração do grão de pólen com solução de tetrazólio não apresentou resultado satisfatório, devido a dificuldade de concluir se os grãos de pólen permaneceram brancos por estarem inviáveis ou devido a metodologia utilizada neste trabalho não ter permitido que os grãos reagissem com a solução e indicasse a viabilidade polínica. Uma sugestão para validar o teste de viabilidade polínica de berinjela através do teste de tetrazólio seria melhorar a utilização da metodologia utilizada, como umedecer os grãos de pólen em água antes de colocá-los na solução de tetrazólio, semelhantemente a metodologia prescrita para análise de sementes (Brasil, 1992).

### **Tolerância do pólen à dessecação**

O pólen fresco (recém-extraído) apresentou grau de umidade de 47,2% (Tabela 1.2). A secagem por 24 hs no dessecador reduziu para 10,8% (perda de 36,4% de água), enquanto no recipiente de alumínio o teor de água foi reduzido para 17,4% (perda de 29,8% de água). O período de 48 hs proporcionou uma maior desidratação do grão de pólen em ambos os recipientes com redução nos teores de água para 4,7% e 5,3% nos recipientes de alumínio e dessecador, respectivamente. Observou-se uma redução no teor de água do pólen com o aumento do período de dessecação, independente do local de secagem (Figura 1.12). Com 24 horas, a dessecação foi mais drástica, sendo que após este período, houve uma tendência de estabilização.

A polinização realizada com os grãos de pólen com os cinco teores de umidade apresentaram excelente pegamento de fruto (Dados não apresentados). O pegamento realizado com grãos de pólen secos foi similar aquele realizado com pólen fresco, sendo este resultado semelhante ao observado em outras espécies, como pêra e pêssigo (Akihama et al., 1978). Os grãos de pólen com 47,2% de umidade ou seco (4,7%)

proporcionaram 90% de pegamento de fruto, enquanto os demais teores apresentaram 100%. Essa porcentagem reduzida de pegamento (90%) não deve ser levada em consideração, pois alguns botões são naturalmente condenados a queda, além do que esse resultado foi superior aquele observado por Akihama et al. (1978), os quais obtiveram pegamento de 82% com pólen de pêra seco contendo teor de água de 5,6%.

O número de sementes por fruto variou significativamente, sendo que o pólen com 10,8% e com 4,7% proporcionaram um maior e menor número de sementes, respectivamente (Tabela 1.2). O pólen contendo 4,7% de água sofreu a maior desidratação (perda de 42,5% de água). Já os frutos com maior número de sementes foram aqueles polinizados com grãos de pólen mais úmidos. Resultado semelhante foi observado por Ferreira et al. (2006) com pólen de milho, onde houve uma redução na viabilidade do pólen, causado pela desidratação. Entretanto, Akihama et al. (1978) observaram que o número de sementes de pêra obtido com polinizações realizadas tanto com pólen fresco ou seco foi similar. Segundo Kakizaki, citado por Noda (1980), frutos de berinjela provenientes de polinização cruzada produzem em média 688 sementes; os resultados encontrados no presente trabalho apresentaram médias superiores ao citado anteriormente, onde a menor média encontrada foi de 917 sementes, observada em frutos que sofreram polinização com grãos de pólen que sofreram uma maior dessecação. Essa diferença não é relevante, pois mesmo “saturando” o estigma com pólen, o ovário de cada flor contém uma quantidade diferente de óvulos, e mesmo se todos os grãos de pólen fossem fertilizados, o número de sementes produzidas poderia ser variável, devido inclusive a fatores externos.

Com relação à massa de sementes, os grãos de pólen que apresentaram teores de água de 17,4% foram os que obtiveram uma maior massa de sementes. Já aqueles com teores de 4,7%, 10,8% e 47,2% obtiveram menor massa de sementes (Tabela 1.2). A umidade do pólen, no momento da polinização, parece não ter relação direta com a massa de sementes obtida.

Como observado, houveram diferenças significativas com relação à quantidade de sementes produzidas, entretanto estas sementes não apresentaram diferença quanto a qualidade fisiológica (Tabela 1.2). Comparando a testemunha com os grãos de pólen secos, observou-se que a diferença no grau de umidade não afetou a qualidade das sementes produzidas, e assim a capacidade de fertilização do pólen seco para produção de sementes foi mantida (Tabela 1.2). Resultado similar foi encontrado por Hecker et al. (1986) com pólen seco (12%) de beterraba. Assim, a qualidade fisiológica das sementes

produzidas utilizando o grão de pólen com 4,7% de água foi similar a encontrada nas sementes produzidas utilizando pólen com 47,2%, entretanto em valor absoluto a qualidade fisiológica encontrada foi menor que a mínima exigida pelo MAPA para comercialização, provavelmente devido a dormência presente nas sementes.

Aparentemente, existe um nível ideal de umidade do pólen para cada espécie, mantendo-o viável ou não. Para *Pseudotsuga menziesii*, este valor de umidade situa-se entre 4 a 7% (Copes, 1987), para pólen de *Juglans regia*, entre 3,2 e 7,0% (Luza e Polito, 1988) e para pólen de milho abaixo de 21% (Ferreira et al., 2006). Em geral, o limite máximo de umidade do pólen para diversas espécies, situa-se entre 20 e 40%. Por outro lado, o limite inferior está estimado entre 1 e 5%, devendo ser utilizado com cuidado, pois pode haver redução de viabilidade a esses níveis mais baixos (Kantha, 1985).

O pólen de berinjela com grau de umidade entre 4,7% e 47,2% independente de como esses valores foram atingidos, apresentou viabilidade para produzir semente com qualidade fisiológica aceitável. Entretanto, o grão de pólen a ser armazenado deve ter uma umidade adequada, pois se muito seco pode haver perda da viabilidade, da mesma forma que quando muito úmido pode ter o risco de formação intracelular de cristais de gelo (Barnabás e Rajki, 1976), além de degradação por aumento da atividade metabólica.

## CONCLUSÕES

- Protocolos para germinação *in vitro* de berinjela devem ser estudados;
- O grão de pólen de berinjela em contato com o estigma por 24 horas permitiu avaliar a viabilidade através da germinação *in vivo*;
- A metodologia de viabilidade polínica para berinjela utilizando solução de tetrazólio deve ser melhorada;
- Grãos de pólen de berinjela com teor de umidade entre 4,7% e 47,2% produziram sementes com qualidade fisiológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLGREN, C.E.; AHLGREN, I.F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5 needle species. **Forestry Science**, Washington, v.24, n.1, p.100-102, 1978.

AKAMINE, E. K.; GIROLAMI, G. **Pollination and fruit set in the yellow passion fruit**. Honolulu: University of Hawaii, 1959. 44p. (Technical Bulletin, 39).

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. Further Investigation of freezer-drying for Deciduous Fruit Tree Pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). **Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops**. Fujimoto: The fruit tree Research Statistics, 1978. p.1-7.

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**, Puerto Rico, v.13, n.4, p.238-241, 1979.

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

ALEXANDER, M.P. **Differential staining of aborted and nonaborted pollen**. Baltimore: Stain Technology, v.44, 1969. p.117-122.

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

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

BEYOUNG, H.K. The effects of calcium on pollen germination. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.86, p.818-823, 1965.

BHOJWANI, S.S.; BHATNAGAR, S.P. **The Embryology of Angiosperms**. Delhi: Vikas Publishing House, 1974. 264p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BREWBAKER, J.L.; KWACK, B.H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.50, n.9, p.859- 865, 1963.

CHIRA, E. The Pollen Sterility of Scots and Black Pines. (*Pinus silvestris* L., *P. nigra* Arnold.). **Lesn. asopis**, [s.l.], v. 9, p.821–826, 1963.

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

CURRIER, H.B. Callose Substance in Plant Cells. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.44, n.6, p.478-488, 1957.

DAFNI, A. **Pollination ecology**: a practical approach (the practical approach series). New York, Oxford: University press, 1992. 250p.

DUBEY, P.S.; MALL, L.P. Herbicidal pollution. Pollen damage by the herbicide vapours. **Experientia**, Basel, p. 600, 1972.

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

EINHARD, P.M.; CORREA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.5-7, 2006.

FERREIRA, C.A.; VON PINHO, E.V.R.; ALVIM, P.O.; SILVA, T.T.A. Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: XXVI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABMS/EMBRAPA-CNPMS, 2006. p. 270.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FRANÇA, L.V.; NASCIMENTO, W.M.; FREITAS, R.A.. Accelerated aging test on eggplant seeds. In: 28TH ISTA CONGRESS/XV CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTE, 28./15., 2007, Foz de Iguaçu. **Anais...** Foz de Iguaçu: Abrates, 2007. p.118.

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

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

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

GOSS, J.A. Effect of Salinity on Pollen. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.58, n.8, p.721-725, 1971.

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

HOWLETT, F.S. The effect of carbohydrate and nitrogen deficiency upon microsporogenesis and the development of the male gametophyte in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Annals of Botany**, Oxford, v.50, p.767-804, 1936.

KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press., 1985. 276p.

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

KWAN, S.C.; HAMSON, A.R.; CAMPBELL, W.F. Storage conditions for *Allium cepa* L., pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Logan, v.94, n.6, p.569-570, 1969.

LACERDA, C.A.; ALMEIDA, E.C.; LIMA, J.O.G.. Estádio de desenvolvimento da flor de *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Santa Cruz Kada ideal para coleta de pólen a ser germinado em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.169-175, 1994.

LACERDA, C.A.; OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, E.C.; LIMA, J.O.G. Meio de cultura e condição ideais para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Santa Cruz Kada. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.241, p.308-318, 1995.

LINSKENS, H.F.; CRESTI, M. The effect of temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie an Wet.**, Amsterdam, v.91, p.369-375, 1988.

LINSKENS, H.F.; ESSER, K.L. **Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung**, [s.l.], v.44, n.1, 1957. 16p.

LISCI, M.; TANDA, C.; PACINI, E. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae) an anemophilous species flowering all year round. **Annals of Botany**, Oxford, v.74, p.125- 135, 1994.

LOGUERCIO, L.L. Pollen treatment in high osmotic potential a simple tool for in vitro preservation and manipulation of viability in gametophytic population. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, Lavras, v.14, n.1, p.65-70, 2002.

LUZA, J.G.; POLITO, V.S. Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen. **Euphytica**, Netherlands, v.37, n.2, p.141-48, 1988.

MacDANIELS, L.H.; HILDEBRAND, E.M. A study of pollen germination upon the stigmas of apple flowers treated with fungicides. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, p.137, 1939.

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

MARTINS, M.E., PRERA, L.E.H.; KAGEYAMA, P.Y. Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. **Circular Técnica nº 128**. 1981. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr128.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2007.

McGUIRE, D.C. Storage of tomato pollen. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.60, p.419-424, 1952.

MIRANDA, P.A.; CLEMENT, C.R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, São José, v.38, n.1, p.29-33, 1990.

NASCIMENTO, W.M.; LIMA, L.B.; ALVARES, M.C. Maturação de sementes de híbridos de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.1040-1041, 2000. Suplemento.

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

NODA, H. **Critérios de avaliação de progênes de irmãos germanos interpopulacionais em berinjela (*Solanum melongena* L.)**. 1980. 91p. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - ESALQ/USP, Piracicaba, 1980.

O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty, 1981. 45p.

OLIVEIRA, M.S.P.; MAUÉS, M.M.; KALUME, M.A.A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v.15, n.1, p.63-67, 2001.

PACINI, E.; FRANCHI, G.G.; LISCI, M.; NEPI, M. Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. **Annals of Botany**, Oxford, v.80, p.83-87, 1997.

PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; RAMALHO, M.A.P.; ANDRADE, H.B. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *eucalyptus*. **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p.60-69, 2002.

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

PIO, L.A.S.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.C.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.147-153, 2007.

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

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

SALLES, L.A.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SILVA, A.B. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.1, p.170-174, 2006.

SARI-GORLA, M.; MULCAHY, D.L.; VILLA, M.; RIGOLA, D. Pollen-pistil interaction in maize: effects on genetic variation of pollen traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.91, p.936-940, 1995.

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

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

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

SHIVANNA, K.R.; RANGASWAMY, N.S. **Pollen biology**. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer- Verlag, Berlin/Heidelberg, 1992. 119p.

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

SNYDER, E.B.; CLAUSEN, K.E. Pollen handling. **USDA Agricultural Handbook**, Washington, p.75-97, 1974.

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

SPRAGUE, J.R.; JOHNSON, V.W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14., 1977. **Proceedings**... Macon: Eastern Tree Seed, 1977. p.20-27.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. New York: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1974. 307p.

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

THOMPSON, A.H.; BATJER, L.P. The effect of boron in the germination medium on pollen germination and pollen tube growth of several deciduous tree fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.56, p.227-230, 1950.

TORRES, A.C. **In vitro culture of ovularies of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* (L.) Mill**. 1984. 175p. Tesis (Doctor of Philosophy in Botany) - Riverside, University of California, 1984.

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

YATES, I.E.; SPARKS, D. Three-year-old pecan pollen retains fertility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Athens, v.115, n.3, p.359-363, 1990.

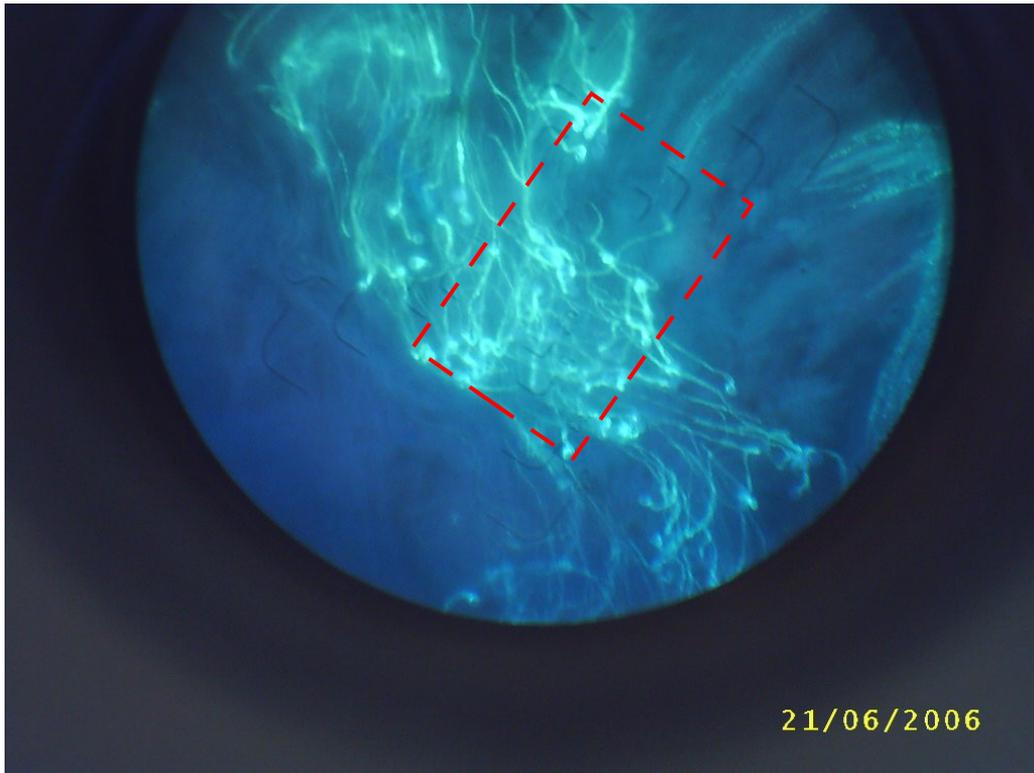
**TABELA 1.1. Porcentagem de germinação *in vivo* de grãos de pólen fresco de berinjela ‘Ciça’, Brasília, DF, 2006.**

Repetição	Pólen germinado	Total de pólen	Germinação (%)
I	179	251	71
II	160	183	87
III	23	55	41
<b>MÉDIA</b>			66

**TABELA 1.2. Valores médios obtidos no número de sementes (NS), massa de 100 sementes (MCS), testes de primeira contagem (PC), germinação (Ger), emergência de plântulas em substrato (Eme) e envelhecimento acelerado (EA) de sementes de berinjela ‘Ciça’ oriundas de cruzamentos utilizando grãos de pólen com diferentes graus de umidade (GU), Brasília, DF, 2006.**

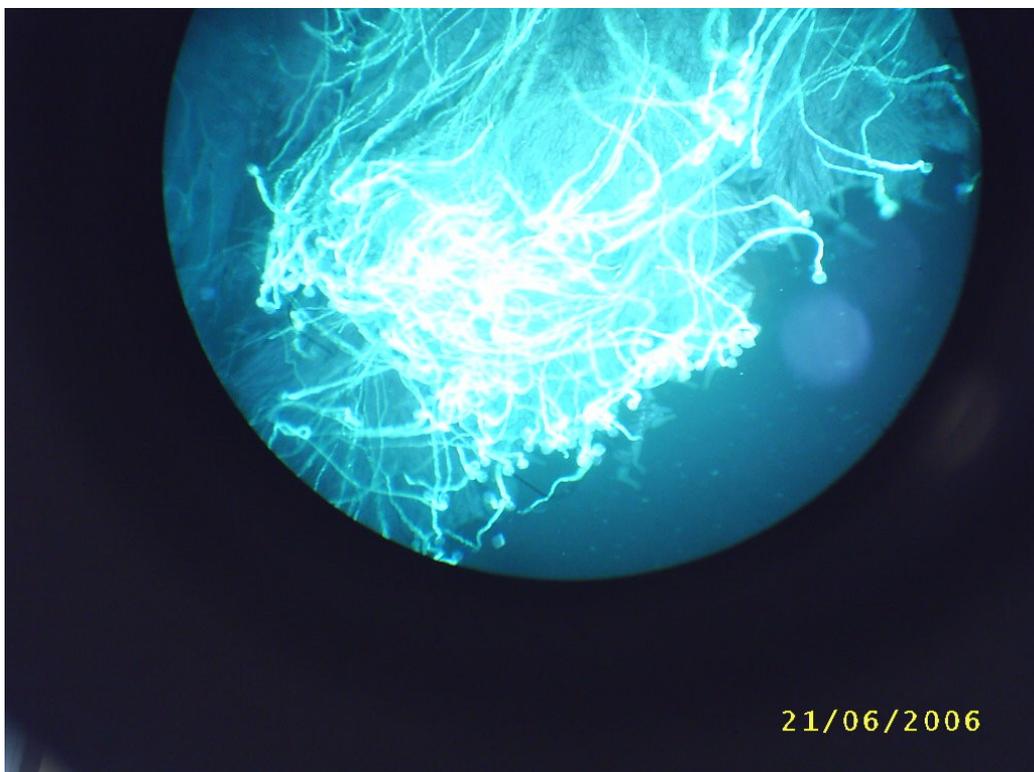
Secagem do pólen		GU (%)	NS	MCS (g)	PC (%)	Ger (%)	Eme (%)	EA (%)
Local	Período							
-	-	47,2	1410ab	0,49c	18a	61a	61a	45a
Alumínio	24	17,4	1402ab	0,52a	24a	58a	60a	46a
Dessecador		10,8	1653a	0,49c	13a	51a	53a	32a
Alumínio	48	4,7	917b	0,49c	18a	53a	42a	27a
Dessecador		5,3	1149ab	0,51b	13a	51a	47a	33a
CV (%)			9,1	0,18	16,87	6,89	15,96	22,79

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



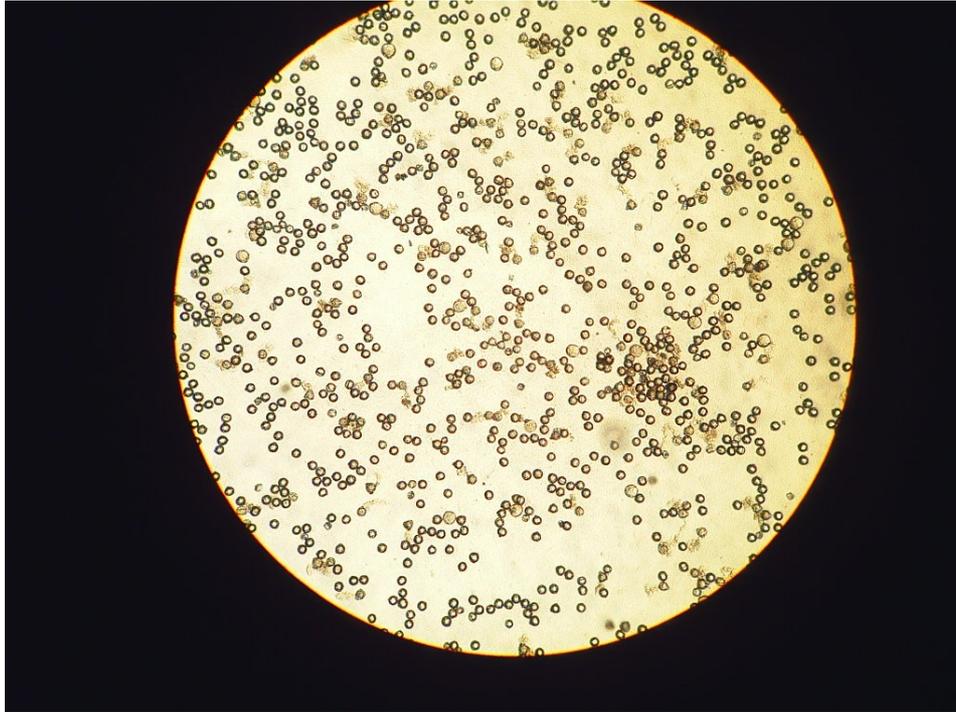
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.1.** Área útil de contagem do teste de germinação *in vivo* via fluorescência.



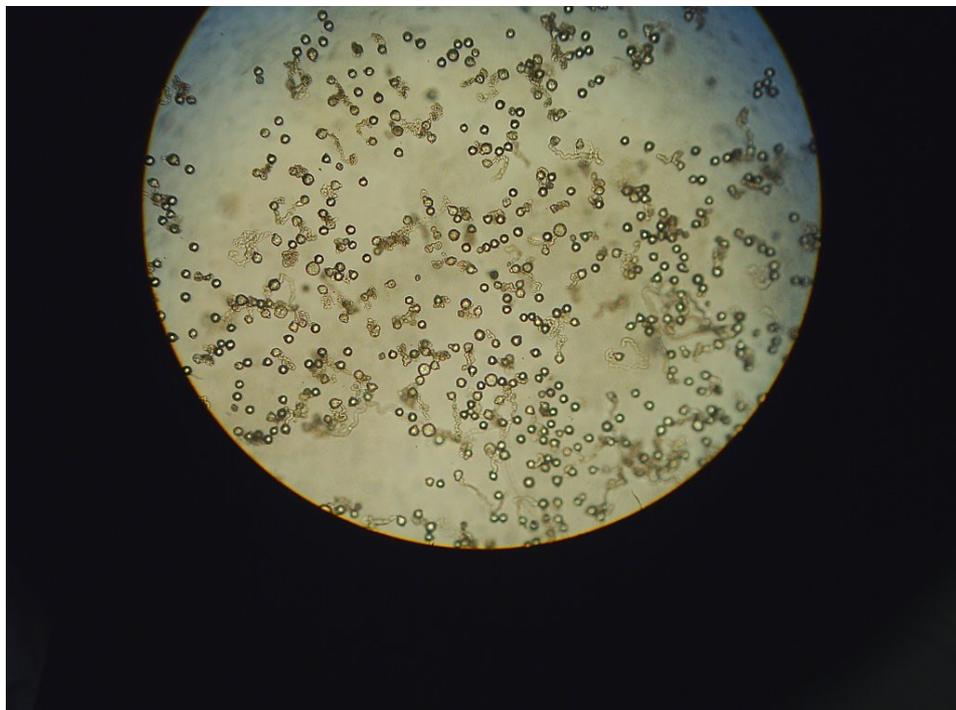
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.2.** Germinação *in vivo* via fluorescência de grãos de pólen viáveis de berinjela ‘Ciça’.



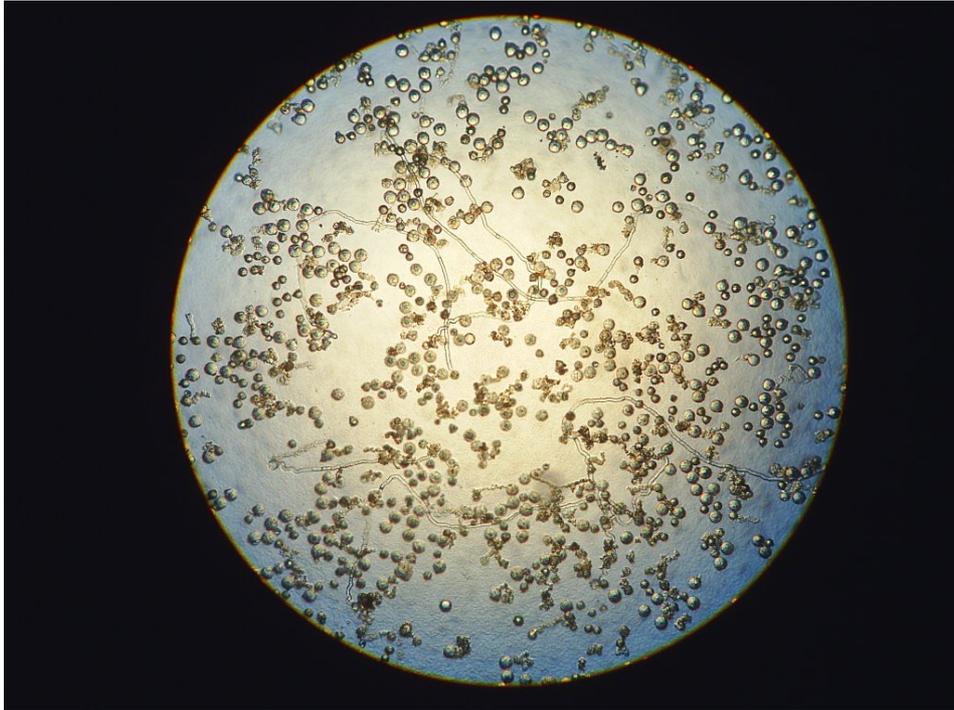
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.3.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 0% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x.



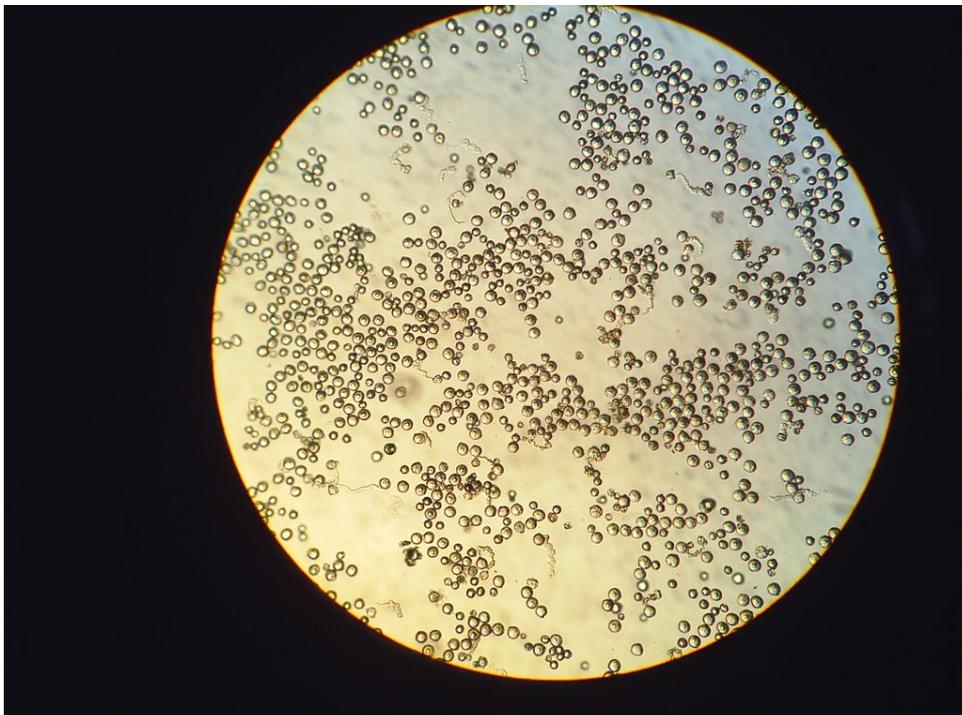
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.4.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 5% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x.



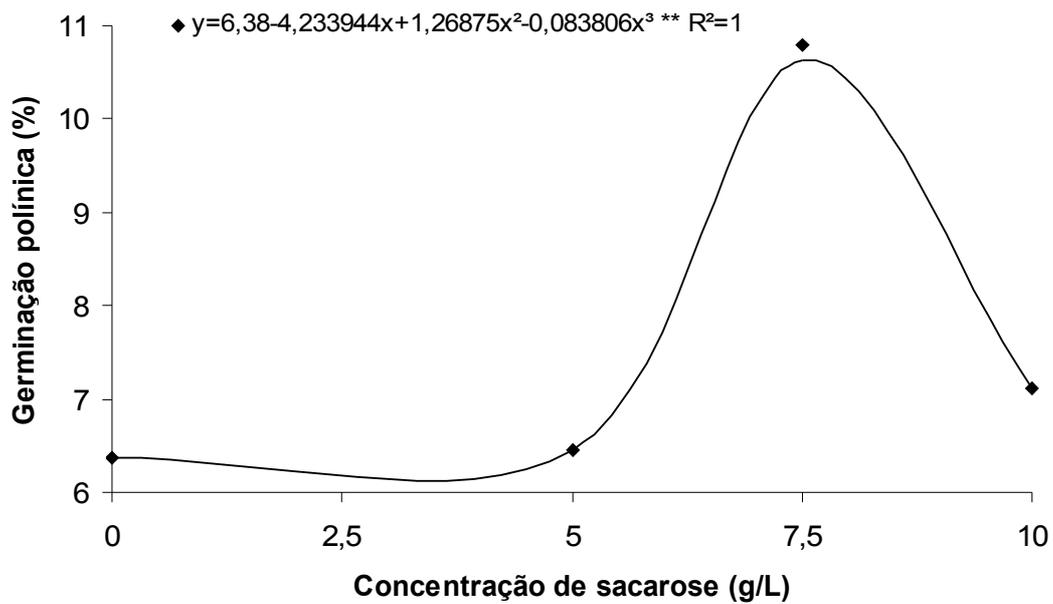
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.5.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 7,5% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x.

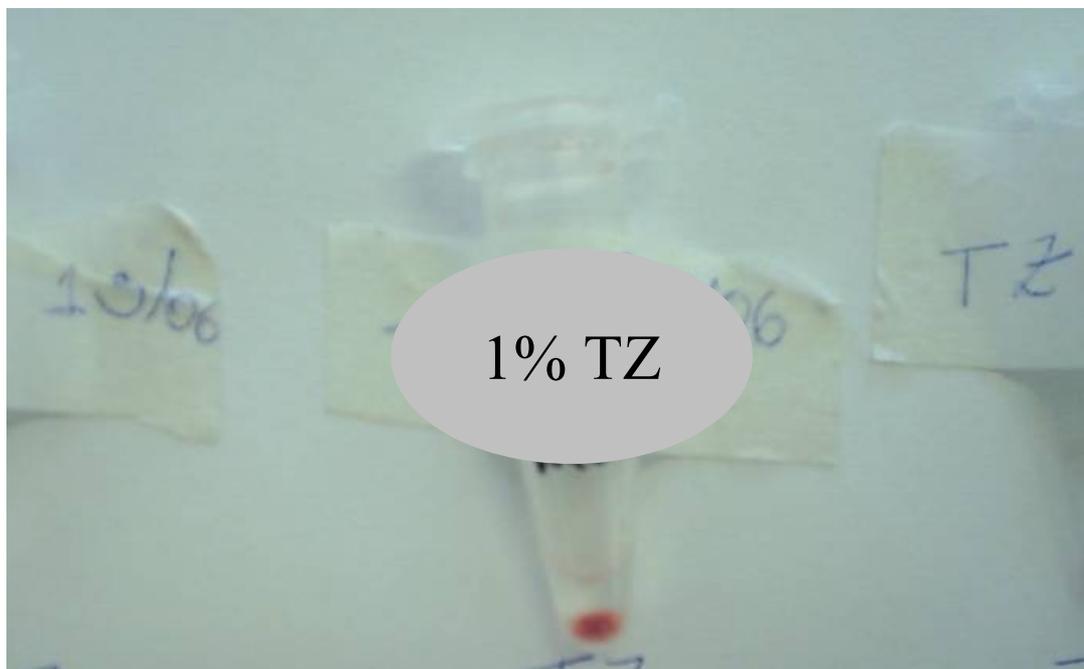


Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.6.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen de berinjela em meio de cultura com 10% de sacarose, observada de microscópio óptico com objetiva de aumento de 10x.

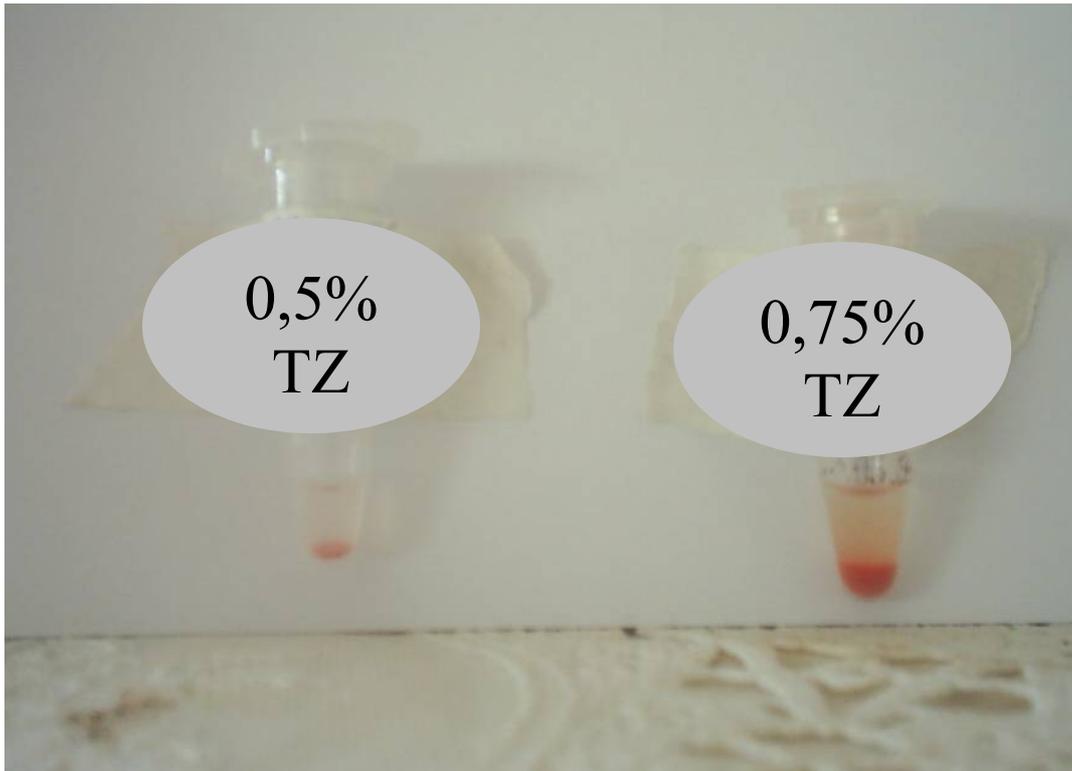


**FIGURA 1.7.** Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ submetido a meios de cultura de Brewbaker e Kwack com diferentes concentrações de sacarose.



Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.8.** Grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ em solução de tetrazólio à 1,0%.



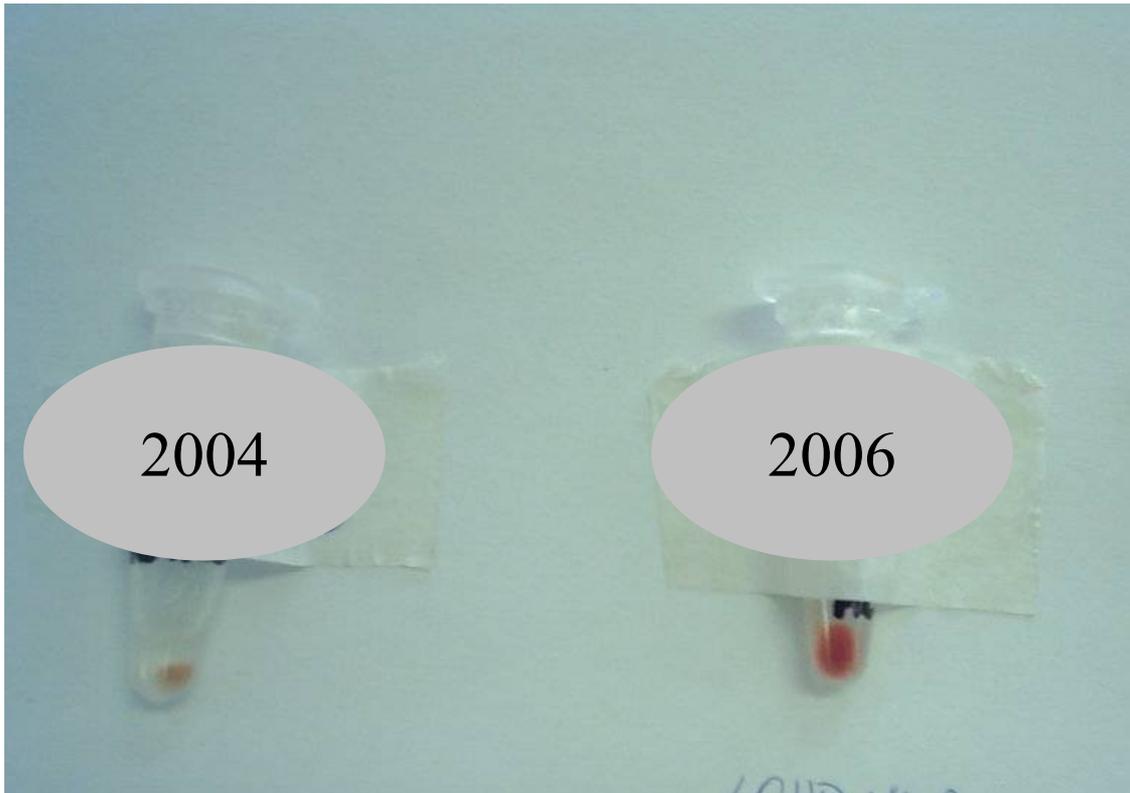
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1. 9. Grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ em solução de tetrazólio à 0,5% e 0,75%.**



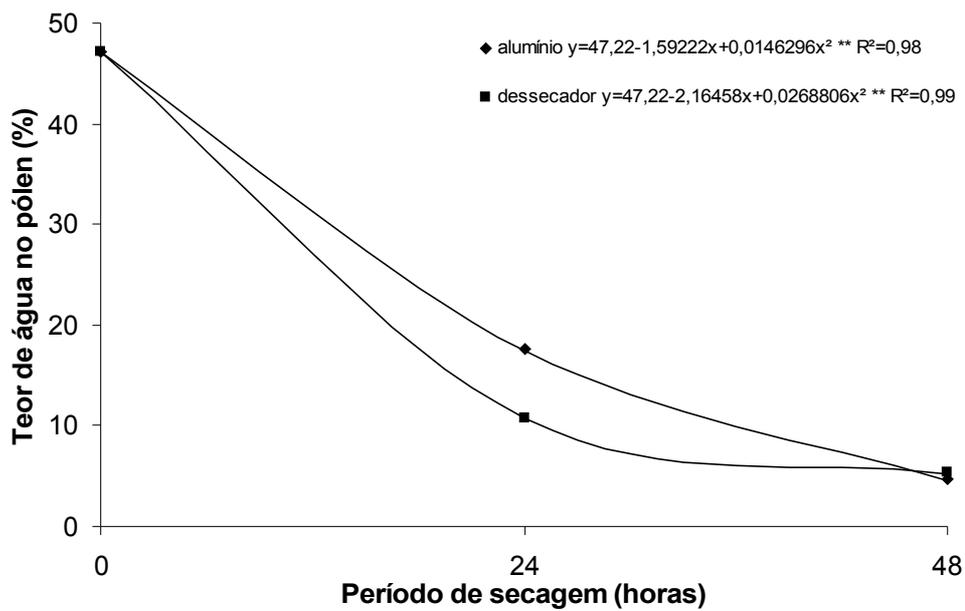
Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.10. Solução de tetrazólio à 0,75% e grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ colocados sobre papel filtro e visualizado em lupa.**



Fonte: França, 2006

**FIGURA 1.11.** Grãos de pólen de berinjela ‘Ciça’ fresco (extraído em 2006) e armazenado (extraídos em 2004) em solução de tetrazólio à 0,75%.



**FIGURA 1.12.** Grau de umidade (%) de grãos de pólen de berinjela desidratados nos diferentes recipientes e períodos de secagem.

## **CAPÍTULO 2**

### **CONSERVAÇÃO DE GRÃO DE PÓLEN DE BERINJELA VISANDO A PRODUÇÃO DE SEMENTES HÍBRIDAS**

(Trabalho a ser enviado a Revista Brasileira de Sementes)

**CONSERVAÇÃO DE GRÃO DE PÓLEN DE BERINJELA VISANDO A  
PRODUÇÃO DE SEMENTES HÍBRIDAS  
FRANÇA, L.V.; CARMONA, R.; NASCIMENTO, W.M.**

**RESUMO**

A longevidade do grão de pólen é um fator de grande importância para o planejamento em programas de produção de sementes híbridas, principalmente, quando há a possibilidade de se armazenar o pólen. Este é um processo imprescindível quando se pretende proceder o cruzamento de linhagens com períodos distintos de floração e/ou localizados em regiões distintas. Para que este processo tenha sucesso, fatores como a umidade do grão de pólen e temperatura de armazenamento devem ser controlados. Estes fatores estão diretamente relacionados ao metabolismo do grão de pólen e à contaminação por microorganismos; a redução dessas atividades tende a aumentar a longevidade do pólen. Em virtude disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de conservação de grãos de pólen de berinjela submetidos a diferentes condições de armazenamento visando a produção de sementes híbridas. Para tanto, grãos de pólen do progenitor masculino de berinjela ‘Ciça’ com teores de água de 35,8% (fresco), 5,4% e 5,1% (desidratados por 24 e 48 horas com sílica gel, respectivamente) foram armazenados à 5°C (refrigerador), -20°C (freezer) e -196°C (nitrogênio líquido) por 180 dias. A cada 60 dias foi realizada a avaliação da viabilidade polínica utilizando tanto a germinação *in vivo* como a polinização em campo, verificando assim o pegamento e a produção de fruto e sementes. Avaliou-se ainda a qualidade fisiológica das sementes através de massa de 100 sementes, teste de primeira contagem, germinação, emergência de plântulas e envelhecimento acelerado. Concluiu que: a) resultado da viabilidade polínica não apresentou uma relação direta com a produção de sementes; b) o grão de pólen desidratado produziu sementes com qualidade fisiológica semelhante ao pólen fresco; c) o grão de pólen armazenado com elevado teor de água (35,8%) não produziu sementes; d) grãos de pólen armazenados a -20°C e -196°C com aproximadamente 5% de água foram eficientes para produzir sementes por 180 dias com alta qualidade fisiológica.

**Palavras chaves:** *Solanum melongena*, temperatura de armazenamento, grau de umidade polínica, germinação.

## EGGPLANT POLLEN CONSERVATION TO HYBRID SEED PRODUCTION

FRANÇA, L.V.; CARMONA, R.; NASCIMENTO, W.M.

### ABSTRACT

Increasing pollen survive is an important factor for the planning during hybrid seed production, in special, when there is the possibility to store pollen. Pollen conservation is very important, especially when the parent lines have different flowering periods and/or they are in different regions. In order this process to have success is necessary to control some factors such as pollen moisture content and storage temperature. These factors are connected to the metabolism of pollen and the microorganism infestation; the reduction of this activity could increase the pollen survive during storage. Thus, the aim of this study was to estimate the potential of pollen conservation in different conditions to produce hybrid seeds. Pollen grains of 'Ciça' eggplant with 35,8% of moisture content (fresh), 5,4% and 5,1% (dried for 24 and 48 hours in silica-gel, respectively) were stored at 5°C (refrigerator), -20°C (freezer) and -196°C (liquid nitrogen) up to 180 days. Bimontly, pollen viability was estimated using both the *in vivo* germination test and field pollination, in order to check the fruit set and fruit and seed production. Seed physiological quality was estimated by seed mass, first counting, germination, seedling emergence and accelerated aging. The results indicated that: a) pollen viability have no correlation with the seed production; b) dried pollen produced seed with the same physiological quality of fresh pollen; c) pollen with a high percentage of water (35,8%) storage don't produced seed; d) pollen conserved in -20°C and -196°C with 5% of water are efficient to produce seed with high physiological quality.

**Keywords:** *Solanum melongena*, storage temperature, pollen moisture, germination.

## INTRODUÇÃO

A berinjela (*Solanum melongena* L.) é uma das hortaliças cuja demanda tem crescido nos últimos anos, devido ao seu elevado valor nutritivo e propriedades medicinais. Junto com essa demanda também está crescendo a área plantada e o número de produtores de berinjela no Brasil. A grande maioria dos produtores dessa hortaliça tem optado por produzir cultivares híbridas devido sua alta produtividade, uniformidade, qualidade de frutos e tolerância à pragas e doenças, entre outras vantagens. No mercado brasileiro existem vários híbridos de berinjela, dentre eles, a cultivar ‘Ciça’, uma cultivar resistente a antracnose e a podridão-de-fomopsis, ambas doenças causam severos danos à cultura (Reifschneider et al., 1993; Embrapa Hortaliças, 2003).

Uma das dificuldades encontradas pelos produtores de sementes híbridas é a realização de cruzamentos entre plantas que floresçam em épocas não coincidentes e/ou situadas em diferentes localidades. Segundo Stanley e Linskens (1974) e Bissiri e Nik-Nejad (1976), o armazenamento de grãos de pólen seria uma opção viável para solucionar tal problema, pois com a manutenção da viabilidade polínica por determinado período, os fatores tempo e espaço não seriam mais empecilhos para que ocorra a hibridação nas diferentes espécies.

Durante o armazenamento, os grãos de pólen devem ser conservados em condições ambientais adequadas para manter sua viabilidade durante todo o período de armazenamento (Dutra et al., 2000). O período de viabilidade do grão de pólen varia com as condições em que ele é armazenado. Por exemplo, em tomate, o pólen pode permanecer viável por várias semanas quando armazenado em ambientes com baixa umidade relativa (Giordano et al., 2003). McGuire (1952) cita que o pólen de tomate pode permanecer viável por um período de até seis meses, se armazenado em dessecador, e por dois anos com a utilização de técnicas de liofilização. Weatherhead et al. (1978), avaliando um método simples, sem pré-secagem, no armazenamento de pólen de batata em nitrogênio líquido (-196°C), obtiveram, com sucesso, o estabelecimento de sementes com pólen armazenado por nove meses. Chang e Struckmeyer (1976) relacionaram a influência da temperatura e da umidade relativa na germinação de pólen de cebola, obtendo 63% de germinação a 21°C, com umidade relativa de 20%. Esses autores concluíram que com o aumento da umidade, ocorre uma diminuição da porcentagem de germinação. Em um estudo preliminar com berinjela,

Nascimento et al. (2003) recomendaram o armazenamento do pólen à 5°C por até 50 dias, obtendo-se assim uma alta fertilização, boa produção de sementes e alta qualidade fisiológica.

O sucesso da preservação do pólen, independentemente da duração do período de conservação, depende principalmente de fatores como a temperatura e umidade relativa do ambiente de armazenamento e do grau de umidade do pólen (Linskens, 1964; Dean, 1965; Khan et al., 1971; Snyder e Clausen, 1974). Assim, a manutenção do pólen em baixa temperatura e a redução do seu grau de umidade estão envolvidas na maioria dos métodos empregados para o armazenamento de pólen, de modo que oscilações sejam evitadas.

Pode-se conseguir uma redução de temperatura para propiciar uma maior longevidade do pólen por meio de refrigeradores ou freezers. Entretanto, isso também é possível de forma mais promissora através de criopreservação utilizando nitrogênio líquido a -196°C (na fase líquida), ou a -150°C (na fase de vapor) (Withers, 1984, 1985; Kartha, 1985). Nessa temperatura ultra baixa, o metabolismo celular do grão de pólen, como a respiração e atividades enzimáticas pode reduzir-se substancialmente (Snyder e Clausen, 1974; Medeiros e Cavallari, 1992) ou até mesmo ser inativado (Benson et al., 1998; Carvalho e Vidal, 2003), permitindo, teoricamente, a manutenção de sua viabilidade por um período indefinido. De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme (Carvalho e Vidal, 2003).

O congelamento do material a ultra baixa temperatura pode ser lento ou rápido. As duas formas proporcionam diferentes mecanismos de sobrevivência. No congelamento lento, o material é congelado de forma gradual, com a temperatura reduzindo-se de 0,1 a 3°C/min; neste processo, ocorre uma desidratação celular protetora, de maneira que os cristais de gelo se formam extracelularmente (Guerra e Pompelli, 2001). Como a água é retirada para o meio extracelular, a célula fica desidratada e essa desidratação reduz a quantidade de água disponível à formação prejudicial de cristais de gelo na célula, conseqüentemente sua danificação e/ou a lise celular. Em seguida, o conteúdo de água se solidifica ocorrendo normalmente a formação de cristais de gelo inofensivos a integridade da célula (Carvalho e Vidal, 2003). Este método é o mais recomendado em vegetais, porém é dependente do emprego de um freezer com temperatura escalonada, equipamento este normalmente de maior custo (Guerra e Pompelli, 2001). No congelamento rápido, o material vegetal é colocado diretamente em nitrogênio líquido e

a velocidade de diminuição da temperatura é da ordem de 1000°C/min onde há indução de um congelamento intracelular, evitando assim a desidratação da célula (Carvalho e Vidal, 2003). No congelamento rápido, um dos principais riscos é a formação de cristais de gelo intracelular, os quais podem danificar a célula, inviabilizando assim toda a técnica (Mroginski, et al., 1993). Geralmente, o congelamento rápido é bem mais difícil de conseguir que o lento (Withers, 1984, 1985; Kartha, 1985; Withers e Williams, 1998).

O sucesso ou o fracasso de muitos experimentos com armazenamento de grãos de pólen ocorre devido à técnica de congelamento e/ou descongelamento utilizada (Withers e Williams, 1998). O descongelamento inadequado pode tornar falho todo o esforço do resfriamento e armazenamento, se não forem tomados os cuidados necessários (Mroginski et al., 1993). No congelamento, pode ocorrer formação de cristais de gelo e no descongelamento, os cristais podem demorar para serem desfeitos o que inviabiliza o pólen. Assim, o descongelamento é realizado rápido para evitar a recristalização de gelo, na qual os pequenos cristais crescem a tamanhos que danificam a célula. Isto pode ser feito utilizando correntes de ar quente, a qual descongela o material mais rapidamente (Withers, 1984, 1985; Kartha, 1985; Mroginski, et al., 1993). Diferentes espécies reagem de maneira diversa a criopreservação, de forma que se torna necessário o desenvolvimento de metodologias que atendam as exigências de cada espécie (Williams, 1990).

O grau de umidade do pólen é um dos fatores mais importantes envolvendo o armazenamento, e normalmente encontra-se negativamente relacionado à longevidade (Sousa, 1988). O baixo teor de umidade do pólen (8 a 10%) propicia boa longevidade, independente do método de armazenamento (Sprague e Johnson, 1977). A umidade elevada no grão de pólen é prejudicial para o armazenamento utilizando a criopreservação, pois esse fator concorre para a formação de gelo intracelular por ocasião do congelamento (Sousa, 1990). Nos sistemas clássicos de criopreservação onde se utiliza sementes ou partes vegetativas, antes da cultura entrar para o sistema, é aplicado um redutor osmótico (geralmente manitol a 4%); isto permite uma diminuição do conteúdo celular, e um crioprotetor, cuja função é a de modificar a permeabilidade da membrana, proteção de macromoléculas e inativação de radicais livres (Benson e Withers, 1987) constituindo-se assim de um meio para superar o problema de injúrias provocadas pelo congelamento. Existem vários produtos que podem ser utilizados com essa finalidade, como etanol, glicóis, (dimetilsulfóxido - DMSO), acetado de amônio, carboidratos, sorbitol, betaína, sarcosina, uréia, açúcares, álcoois-açúcares, vários

aminoácidos, polióis, óxido de trimetilamina e finalmente o glicerol como o mais efetivo (Kartha, 1985). Esse último tem a vantagem de não ser tóxico, mesmo em alta concentração. O glicerol tem se mostrado eficiente para as células animais (Kartha, 1985), mas não para as vegetais (Luza e Polito, 1988). Os aminoácidos são considerados bons crioprotetores de células vegetais devido à sua rápida permeabilidade (Kartha, 1985). Uma vez que a manipulação de grão de pólen não contribua para a utilização desses crioprotetores, a opção para tentar conservar o pólen seria reduzir a umidade do pólen. Assim, quanto maior for o período de armazenamento, menor deveria ser a umidade do pólen (McGuire, 1952; Kwan et al., 1969; Akihama et al., 1978; Hecker et al., 1986; Ferreira et al., 2006; Silva Filho, 2007); a determinação da umidade do pólen é a principal ferramenta para a decisão das medidas que devem ser tomadas por ocasião do armazenamento.

O grão de pólen deve manter sua viabilidade após o armazenamento, uma vez que esse é um fator que influencia diretamente o sucesso da fertilidade e da produção de sementes (Vianna et al., 2006). Conhecer a viabilidade do pólen armazenado é uma medida para determinar a utilização ou não do pólen em hibridações artificiais, determinando o sucesso ou fracasso da técnica utilizada no armazenamento (Rigamoto e Tyagi, 2002). A viabilidade polínica pode ser medida de várias maneiras (Dutra et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Techio et al., 2006), sendo o método de coloração e contagem direta o mais comum (Kelly et al., 2002). Entretanto, a coloração fluorescente é mais eficiente com relação a visualização e coloração do grão e do tubo polínico (Dantas et al., 2005).

A longevidade do grão de pólen vem sendo estudada em muitas espécies de importância agrônômica, na tentativa de conhecer as melhores condições de estoque para preservar a viabilidade e habilidade de fertilização do pólen por um longo período (Casali et al., 1984; Bezdickova, 1989; Barnabás e Kovacs, 1994; Lacerda et al., 1995; Usman et al., 1999; Yogeeshia et al., 1999). Baseado nisso, o objetivo desse trabalho foi otimizar formas de conservação do grão de pólen de berinjela que viabilizasse a produção de sementes híbridadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido na Embrapa Hortaliças, Brasília – DF. Flores do progenitor masculino da cultivar ‘Ciça’ (Reifschneider et al., 1993; Embrapa Hortaliças,

2003), cultivados em casa de vegetação no período de novembro de 2006 à fevereiro de 2007, foram coletadas quando as plantas estavam no pico de florescimento. A colheita foi realizada dia 26 de fevereiro de 2007 às 8:00 horas da manhã (cerca de 54 dias após o transplante) de forma aleatória. Foram colhidas flores abertas que já haviam sofrido antese e assim já estavam com o pólen maduro e viável. No total, foram colhidas 1500 flores e separadas em 30 grupos de 50 flores cada. Foram extraídos os grãos de pólen dessas flores com auxílio de um vibrador elétrico. Cada grupo de pólen foi acondicionado em um criotubo rosqueado de 1,8 mL.

Para reduzir o grau de umidade dos grãos de pólen e obter diferentes teores iniciais de água, uma parte dos grãos não sofreu secagem (permanecendo fresco da forma em que foi extraído), outra parte teve o teor de água reduzido utilizando um recipiente de alumínio contendo 300 gramas de sílica gel, pelo período de 24 ou 48 horas. Os criotubos permaneceram destampados dentro dos recipientes de alumínio, e estes permaneceram fechados durante todo período de secagem do pólen.

Todos os criotubos antes de serem fechados, tanto os que continham pólen que passaram por período de secagem, quanto aqueles que continham pólen fresco, permaneceram abertos por 10 minutos em uma capela de fluxo laminar, para evitar o contato do pólen com ar poluído dentro do criotubo. Em seguida, os mesmos foram rosqueados e lacrados com papel filme pvc. Posteriormente, os criotubos foram então armazenados em refrigerador (5°C), freezer (-20°C) e nitrogênio líquido (-196°C) por 60, 120 e 180 dias. No refrigerador e no freezer (mensalmente foram verificadas a temperatura e umidade relativa), os criotubos foram acondicionados em um recipiente plástico com tampa. No nitrogênio líquido, os criotubos foram colocados em caniços em botijão criogênico. Em cada temperatura foram armazenados grãos de pólen com os diferentes teores iniciais de água, sendo três criotubos com pólen fresco, três com pólen seco por 24 horas e três com pólen seco por 48 horas. Os grãos de pólen foram retirados do armazenamento em intervalos de 60 dias, onde de cada condição de armazenagem, foram retirados três criotubos, correspondentes aos diferentes teores iniciais de água em que foram armazenados. Após retirar os criotubos do armazenamento, eles permaneceram 3 horas à temperatura ambiente para descongelamento do material.

Tanto o pólen fresco quanto os que sofreram secagem, tiveram seu grau de umidade determinado na base úmida, adotando a mesma metodologia utilizada para a determinação do grau de umidade de sementes das Regras de Análise de Sementes (Brasil, 1992). Em virtude do grão de pólen ser pequeno e leve, foram confeccionadas

pequenas taras de papel alumínio com diâmetro de 1,5 cm e 1,0 cm de altura. Nelas foram então colocadas um porção de grão de pólen (quantidade aproximada de pólen extraído de 20 flores) e pesadas em balança de precisão com quatro casas decimais, e em seguida, colocada em estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após esse período pesou-se novamente, a tara com os grãos de pólen seco e somente a tara. Assim a umidade foi determinada pela seguinte equação:

$$U = \frac{(P_u - P_s)}{(P_u - P_t)} \times 100$$

Onde:

U – Grau de umidade do grão de pólen (%)

P<sub>u</sub> – Peso úmido do grão de pólen (g)

P<sub>s</sub> – Peso seco do grão de pólen (g)

P<sub>t</sub> – Peso da tara (g)

A umidade de cada tratamento foi determinada pela média encontrada nas três repetições de cada tratamento. Após os períodos de armazenamento foi determinado novamente o grau de umidade dos grãos de pólen.

*Viabilidade polínica:* Para avaliar a capacidade germinativa do grão de pólen, botões do progenitor feminino de plantas desenvolvidas em casa de vegetação climatizada, foram emasculados e polinizados com os grãos submetidos aos tratamentos. Após 24 horas da polinização, os pistilos dos botões foram retirados e submetidos à um fixador com 30% de etanol (1 parte de ácido acético e 3 partes de álcool etílico) por 10 minutos, mantendo assim, os grãos e tubos polínicos no mesmo estágio de desenvolvimento que estavam quando foram retirados da planta. Em seguida, lavou-se os pistilos com álcool 70% por 30 minutos para despigmentar o tecido e facilitar a análise dos mesmos. Após este período, os pistilos foram lavados em água destilada e transferidos para uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) a 10N, onde permaneceram por 20 minutos com a finalidade de amolecer os tecidos dos pistilos. Após esse período, os pistilos foram novamente lavados em água destilada e colocados em lâminas de microscopia, acrescentando 2 gotas do pigmento azul de anilina a 0,1% em 0,1N de fosfato de potássio por 5 minutos (O'Brien e McCully, 1981; Torres, 1984). Finalmente, os pistilos foram macerados, cobertos por uma lamínula e analisados em microscópio de ultravioleta com objetiva 10x, observando o desenvolvimento do tubo polínico via fluorescência, de acordo com metodologia descrita por Torres (1984). Cada tratamento foi polinizado em três botões florais, sendo observadas, com contagem

direta, três lâminas para cada tratamento em três determinados campos de visão (5mm<sup>2</sup>) para cada lâmina. Considerou-se grãos de pólen germinados aqueles que apresentaram tubo polínico e/ou coloração verde brilhante, e os não germinados aqueles de coloração marrom

Para avaliar a capacidade de produção de sementes utilizando o pólen armazenado, semeou de forma escalonada, os progenitores femininos da cultivar ‘Ciça’, em novembro de 2006, janeiro, março e maio de 2007. Utilizou-se para isso, bandejas de poliestireno expandido (isopor<sup>®</sup>), com 128 células, preenchidas com substrato artificial para hortaliças (Plantmax<sup>®</sup>). Após 15 dias do semeio, foi realizado o desbaste, deixando em cada célula, as plântulas mais vigorosas. Com o surgimento da 3<sup>a</sup> folha definitiva (entre 40 e 48 dias após a semeadura), as mudas foram transplantadas para vasos plásticos com 30 cm de diâmetro, com capacidade para 5 Kg, preenchidos com solo e levadas à casa de vegetação climatizada (temperatura e umidade relativa controladas por ventiladores e lâmina de água, e verificadas diariamente por um termohigrógrafo), a irrigação feita por gotejo. As adubações de cobertura e os defensivos agrícolas para controle de pragas e doenças foram utilizados de acordo com as recomendações para a cultura.

Os grãos de pólen foram retirados das diferentes condições de armazenagem a cada 60 dias; neste dia, os mesmos eram utilizados na polinização das plantas semeadas de forma escalonada. O escalonamento permitiu que na época da polinização, as plantas estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento (60 dias após transplântio). As polinizações ocorreram em fevereiro com os grãos de pólen (armazenados por 0 dia), em abril (armazenado por 60 dias), em junho (armazenado por 120 dias) e agosto (armazenado por 180 dias). Em fevereiro, a polinização foi realizada com pólen com grau de umidade de 35,8%; 5,4% e 5,1%. Nos meses de abril, junho e agosto, a polinização ocorreu com os grãos de pólen que foram armazenados à 5°C, -20°C e -196°C com as três umidades iniciais já mencionadas em cada temperatura. Foram escolhidos, ao acaso, 10 botões florais com estigma receptivo (botão com mudança da cor da pétala do botão de verde para rosa), e realizada a polinização para cada tratamento e em cada época de polinização. Os botões foram emasculados com pinça, polinizados com auxílio de uma tampa de penicilina e cobertos com rolete de papel alumínio. Estes roletes foram retirados 15 dias após a polinização. Sessenta dias após a polinização, os frutos produzidos foram colhidos e colocados em repouso por 15 dias em local sombreado, seco e arejado, conforme Nascimento et al., 2000. Após o repouso,

as sementes foram extraídas, e para isso, os frutos foram cortados em pequenos pedaços e em seguida, passou os pedaços de frutos duas vezes em um equipamento desintegrador de polpa. Foi adicionado água à polpa com a semente para a extração úmida. As sementes foram então submetidas a uma pré-secagem à 32°C por 24 horas, seguida de uma secagem à 40°C por 24 horas, mantendo a semente com umidade de aproximadamente 5%. Os parâmetros avaliados foram:

*Pegamento de fruto:* após 15 dias da polinização, foi analisado o pegamento de fruto nas plantas em casa de vegetação.

*Produção de frutos:* os frutos foram pesados no dia da extração das sementes e a massa total (g) dividida pela quantidade de frutos produzidos.

*Massa de 100 sementes:* quatro sub-amostras de 100 sementes de cada tratamento foram pesadas, sendo a média dos resultados expressos em gramas (g) com três casas decimais.

*Produção de sementes por fruto:* pesou-se a quantidade de sementes extraídas dos frutos e dividiu a massa de sementes (g) pela quantidade de frutos produzidos.

*Teste de germinação:* foi conduzido segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Foram utilizadas para cada tratamento quatro repetições de 50 sementes em caixas gerbox sobre papel umedecidos com água e levadas ao germinador em temperatura alternada de 20°C (16 horas) por 30°C (8 horas), sendo as avaliações realizadas aos 7 (primeira contagem) e 14 dias.

*Teste de emergência de plântulas em substrato:* foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento. A semeadura foi realizada em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 200 células, com uma semente por célula, utilizando o substrato Plantmax®. O teste foi desenvolvido em casa de vegetação com avaliação em 21 dias.

*Teste de envelhecimento acelerado:* foi conduzido segundo França et al. (2007) em gerbox adaptado para formar uma câmara úmida com 76% de umidade relativa, onde foi adicionado 40 ml da solução salina na concentração de 40g NaCl/100ml H<sub>2</sub>O. Neste gerbox foi colocado uma tela suspensa para acondicionar as amostras de cada tratamento de maneira a constituírem uma camada única de sementes. Cada amostra continha aproximadamente 250 sementes. Os gerbox foram mantidos por 96 horas em estufa à 41°C. Após esse período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito anteriormente, sendo avaliados após 7 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo realizados dois esquemas fatoriais. Um fatorial 3 (grau de umidade inicial do pólen) x 3 (temperatura de armazenamento) x 3 (período de armazenamento) para analisá-los somente durante o armazenamento e um outro fatorial 4 (período de armazenamento) x 3 (grau de umidade inicial do pólen) em cada temperatura de armazenamento para compará-los com o pólen não submetido à temperatura de armazenamento. Para a avaliação dos parâmetros de viabilidade polínica e qualidade da semente foram utilizadas três e quatro repetições, respectivamente. As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os dados foram transformados para  $(x+0,5)^{1/2}$ , mas os resultados são apresentados com as médias originais. Em cada temperatura de armazenamento analisada, o efeito do tempo de armazenamento do pólen dentro de cada grau de umidade foi avaliado por meio do ajuste de equações de regressão polinomial. Para a análise estatística, foi utilizado o programa estatístico SAS<sup>®</sup> Learning Edition 2.0 (SAS Institute Inc., 2004).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Avaliando a qualidade fisiológica das sementes a 5°C houve interação significativa entre os dois fatores analisados (período de armazenamento e umidade do grão de pólen) em todas variáveis analisadas. Enquanto a -20°C não houve interação dupla para a variável primeira contagem e envelhecimento acelerado e a -196°C para a variável germinação.

Analisando a viabilidade polínica e os demais indicadores de qualidade fisiológica da semente: massa de 100 sementes, primeira contagem, germinação e emergência houve interação significativa entre os três fatores. Já para o envelhecimento acelerado das sementes não houve interação significativa entre os três fatores analisados, havendo as interações duplas entre os fatores período e temperatura de armazenamento e umidade inicial do grão e temperatura de armazenamento.

### **Umidade polínica**

Antes dos grãos de pólen serem armazenados, foi determinado o teor de água inicial, sendo que os grãos frescos apresentaram 35,8% de umidade, os secos por 24 horas 5,4% e os secos por 48 horas 5,1%. Dessa forma, observou-se que a secagem dos

grãos de pólen foi maior nas primeiras 24 horas de desidratação. Após o armazenamento foi novamente determinado o teor de água dos grãos e observou que houve uma leve oscilação com o tempo de armazenamento, devido à condição de armazenamento, entretanto, esta variação que não foi significativa para o desempenho dos mesmos.

### **Pegamento e Produção de Fruto**

O cruzamento realizado na linhagem feminina da cultivar ‘Ciça’ com grão de pólen armazenado por diferentes períodos de tempo, temperaturas e graus iniciais de umidade possibilitou, de uma maneira geral, um bom pegamento de frutos. Os únicos tratamentos que apresentaram baixo pegamento de frutos foram aqueles provenientes de pólen fresco (35,8% de umidade) armazenado por 60 dias nas três condições (Tabela 2.1). Esse baixo pegamento de fruto também foi observado por Nascimento et al. (2003) com pólen fresco, armazenado por 60 dias a 5°C. Os grãos de pólen submetidos à temperatura de -20°C, tanto aqueles secos quanto aqueles frescos, não apresentaram diferenças no pegamento de fruto, da mesma forma que Kobayashi et al. (1978) observaram com pólen de *Citrus* armazenado por 3 anos. A utilização do pólen armazenado à -196°C também proporcionou ótimo pegamento de fruto, semelhante ao obtido por Ganeshan (1986a) com pólen de mamão armazenado por quase um ano. Desta forma, pode-se dizer que o pólen de berinjela armazenado à baixa temperatura (-20°C e -196°C) independente do grau de umidade, proporciona ótimo pegamento de frutos quando armazenado por período de até 180 dias; estes resultados corroboram também com aqueles obtidos com pólen de pêra por Akihama et al. (1978).

Conforme observado na Tabela 2.1, todos os grãos de pólen armazenados com grau inicial de umidade de 35,8%, independente do período e da temperatura de armazenamento, produziram frutos menos pesados, considerando que o peso médio de frutos de berinjela ‘Ciça’ é de 350 gramas (Reifschneider et al., 1993; Embrapa Hortaliças, 2003). Os grãos de pólen com 5,4% armazenados na temperatura mais elevada (5°C) por 120 dias e nos três teores de umidade (5,1%, 5,4% e 35,8%) por 180 dias também produziram frutos leves. Segundo Bots e Mariani (2005), o pegamento de fruto influenciam a produção de frutos. Os resultados obtidos indicam um elevado pegamento de fruto, entretanto leves. Assim, o elevado teor de água do pólen, a alta temperatura de armazenamento e o aumento do período de armazenamento favoreceram

o pegamento de fruto, mas com produção de frutos leves e pequenos, fora do padrão da cultivar. Com os demais grãos de pólen armazenados, a produção dos frutos teve correlação com a eficiência do pegamento de frutos (Tabela 2.1).

### **Produção de Sementes**

Segundo Nascimento (2004), a produção média de sementes híbridas de berinjela ‘Ciça’ é de 6 a 8 gramas por fruto. Observou-se no presente estudo que os frutos leves produziram uma quantidade de sementes muito inferior à média citada por este autor (Tabela 2.1); assim o armazenamento dos grãos de pólen nas condições a que foram submetidos e produziram esses frutos fora do padrão não são indicados para a produção de sementes. Além disso, todos os frutos provenientes dos grãos de pólen armazenados em alta temperatura (5°C), independente da umidade do pólen e do período de armazenamento, também proporcionaram uma produção de sementes muito baixa, mesmo aqueles que produziram frutos pesados. Assim, independente do período de armazenamento, o pólen seco ou fresco conservado à 5°C ou pólen fresco (35,8%) submetido a qualquer temperatura não são desejáveis para a utilização durante a produção de sementes, entretanto seria interessante para a produção de frutos. Vale salientar que esta operação não é realizada comercialmente para a produção de frutos frescos, devido ao alto custo.

Com a polinização utilizando o grão de pólen no estigma do botão floral, os frutos conseguem se desenvolver, possivelmente devido ao crescimento do tubo polínico (Smith, 1935) e também à auxina presente no grão de pólen (Marcos Filho, 2005). Entretanto, para que ocorra a produção de sementes é preciso que ocorra a fertilização, mas, segundo Zamir e Jones (1981), apenas 2% dos grãos polinizados são responsáveis por isso. Assim, com a polinização é possível que os frutos se desenvolvam, mas não asseguram a produção de sementes. Sabendo disso, pode-se considerar que os grãos de pólen que produziram frutos com quantidade pequena de sementes deram origem a frutos partenocarpicos, mesmo com um bom pegamento de frutos. Também foram produzidos frutos partenocarpicos utilizando grãos de pólen de brássicas submetidos à baixa temperatura de armazenamento (Rao et al., 1992).

A elevada temperatura de armazenamento (5°C) e/ou o elevado teor de água no pólen fresco (35,8%) causou a deterioração do mesmo, possivelmente exaurindo suas reservas e não permitindo que ele alcançasse o óvulo e produzisse sementes. É possível

que ocorra alguma produção de sementes com pólen submetido à alta temperatura de armazenamento desde que seja por curto período. Por exemplo, pólen de milho fresco armazenado por apenas seis dias (Stanley e Linskens, 1974) ou de berinjela armazenado por 50 dias (Nascimento et al., 2003) produziram sementes.

O emprego de baixas temperaturas normalmente encontra-se relacionado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia uma maior longevidade. Além disso, quando se pretende submeter o pólen a temperaturas muito baixas ( $-10^{\circ}\text{C}$  ou menos), a redução de umidade é necessária para evitar o rompimento dos tecidos, provocado pelo congelamento intracelular da água contida no pólen (Pio et al., 2007). Segundo Oliveira et al. (2001), a diminuição na porcentagem de grãos de pólen viáveis de pêssego pode estar relacionada a vários fatores, tais como as condições de armazenamento, o recipiente usado no acondicionamento do pólen e a manipulação dos recipientes. Em vários trabalhos, a viabilidade do pólen armazenado é mantida se estes estiverem secos (Sousa, 1988).

Os grãos de pólen de berinjela secos (5,1% e 5,4% de umidade) e submetidos à baixa temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ ) proporcionaram uma boa produção de sementes, em torno de 6 gramas/fruto, independente do período de armazenamento (Tabela 2.1). Resultados semelhantes foram observados com pólen seco de várias espécies (Akihama et al., 1978; Kobayashi et al., 1978; Weatherhead et al., 1978; Ganeshan, 1986a). Esses resultados indicam a necessidade de se reduzir tanto o teor de água do grão de pólen como a temperatura de armazenamento para viabilizar sua conservação. É importante lembrar que as sementes provenientes de grãos de pólen conservados devem apresentar qualidade fisiológica o que assegurará que essas sejam capazes de dar origem a uma plântula sadia e vigorosa.

### **Massa de 100 Sementes**

Os grãos de pólen secos, não armazenados, produziram sementes com massa semelhante às sementes provenientes dos grãos frescos não armazenados (Tabela 2.2). De forma geral, os grãos com 5,4% de umidade produziram sementes mais pesadas, com mais reserva, quando comparado aos grãos de pólen com 5,1% de umidade, quando combinado os fatores período e temperatura de armazenamento (Tabela 2.2). Já com relação a melhor temperatura de armazenamento que propiciasse sementes mais pesadas, nenhuma foi superior a outra em todas combinações de período de

armazenamento e umidade do pólen existente, de forma que em algumas combinações, a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  propiciou sementes mais pesadas e em outras situações,  $-196^{\circ}\text{C}$  a superou (Tabela 2.3). Os grãos armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  com 5,4% de umidade produziram sementes mais pesadas que aqueles com 5,1% durante todo período de armazenamento (Figura 2.1). Já a  $-196^{\circ}\text{C}$ , o pólen com 5,1% não apresentou sementes mais pesadas que as de 5,4% durante o período de armazenamento, mas foi o que apresentou maior estabilidade durante todo período, mesmo tendo apresentado decréscimo com o aumento do período de armazenamento (Figura 2.2). Essa diferença no comportamento dos grãos armazenados em ambas temperaturas, pode ser explicada pela capacidade de paralisação do metabolismo dos grãos em temperaturas mais reduzidas, proporcionando ao grão mais seco a manutenção de suas características físicas durante o armazenamento, para posterior utilização no processo de hibridação.

### **Germinação**

Os grãos de pólen não armazenados produziram sementes com excelente potencial germinativo e não diferenciaram entre si (Tabela 2.4). Aquelos grãos desidratados (5,4% e 5,1%) na maioria dos períodos de armazenamento, produziram sementes com percentual germinativo similar (Tabela 2.4) e a temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$  foi tão eficiente quanto a  $-20^{\circ}\text{C}$  para o armazenamento do pólen para posterior produção de sementes com elevada germinação (Tabela 2.5). O período de armazenamento dos grãos de pólen secos (5,1% e 5,4%) submetidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.3) e  $-196^{\circ}\text{C}$  (Figura 2.4) interferiram no percentual germinativo das sementes, entretanto nessas condições, até 180 dias indica-se a conservação do mesmo para produzir sementes com elevado potencial germinativo, mesmo as sementes tendo apresentado o máximo germinativo a  $-20^{\circ}\text{C}$  com 136 dias e a  $-196^{\circ}\text{C}$  com 129 dias. Vale salientar que a porcentagem germinativa mínima aceita para comercialização de sementes de berinjela no país é 70% (Portaria Ministerial nº457, de 18 de dezembro de 1986). Neste estudo, todas as sementes apresentaram valor acima do exigido.

### **Vigor**

Para avaliar este parâmetro, foram utilizados três testes, sendo eles primeira contagem da germinação, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas. Os

grãos de pólen secos não armazenados produziram sementes com vigor elevado e similar aos frescos não armazenados (Tabelas 2.6 a 2.8). Nas mesmas tabelas observa-se que independente do grão conter 5,1% ou 5,4% de umidade, eles proporcionaram sementes com elevado vigor e similar entre si. O vigor de sementes provenientes do cruzamento com grãos de pólen armazenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  e a  $-20^{\circ}\text{C}$  não diferiram entre si (Tabelas 2.9 a 2.11). Em todos os testes conduzidos para determinar o vigor da semente tanto com pólen submetido a  $-20^{\circ}\text{C}$  quanto a  $-196^{\circ}\text{C}$ , as sementes mostraram-se vigorosas até 180 dias armazenados, apesar de terem sofrido variações no vigor durante o período de armazenamento (Figuras 2.5 a 2.10).

### **Viabilidade Polínica**

Nos três períodos de armazenamento associados à umidade do pólen fresco (35,8%). Não houve diferença na viabilidade polínica do pólen fresco (35,8%) quando comparada nas três temperaturas analisadas em cada período de armazenamento (Tabela 2.12). Verifica-se que a capacidade germinativa aos 180 dias foi muito baixa em todas as temperaturas (Tabela 2.12). Resultados obtidos neste trabalho com o pólen fresco por 60 dias diferiu daqueles resultados obtidos em condições semelhantes por Kanazawa et al. (1992) com pólen de *Allium* e por Pio et al. (2007) com pólen de laranja doce, onde o primeiro observou uma perda da capacidade germinativa à  $5^{\circ}\text{C}$  e o segundo uma maior viabilidade a  $-20^{\circ}\text{C}$  do que a  $5^{\circ}\text{C}$ . Nos períodos de 60 e 120 dias de armazenamento o pólen com umidade de 5,4%, não apresentou diferença na viabilidade nas três temperaturas de armazenamento em cada período analisado; entretanto, com 180 dias, o pólen armazenado à  $-196^{\circ}\text{C}$  teve maior viabilidade e à  $5^{\circ}\text{C}$  a menor; ou seja, por 180 dias com umidade de 5,4%, o pólen se expressa melhor em temperaturas mais baixas de armazenamento. A associação dos períodos de 60 e 180 dias com o pólen contendo 5,1% de umidade apresentou viabilidade similar à  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ . A 120 dias o armazenamento na temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$  proporcionou uma menor viabilidade, mas mesmo assim essa capacidade polínica ainda se encontrava dentro do padrão aceitável de viabilidade polínica, onde grãos de pólen bem conservados devem apresentar 50% a 80% de germinação (Bernard e Noiret, 1970; Scorza e Sherman, 1995).

Os grãos de pólen secos (5,1% e 5,4%) e não armazenados apresentaram viabilidade polínica semelhante aos grãos frescos não armazenados (Tabela 2.13), da

mesma forma que ocorreu com pólen de pêra e pêssego (Akihama et al., 1978). O armazenamento nas temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$  pelo período de 60 dias não afetou significativamente a viabilidade polínica nas três umidades analisadas. Resultados semelhantes foram observados em pólen de milho com diferentes graus de umidade, entretanto, por menor período de tempo (30 dias) (Ferreira et al, 2006). A 120 dias, o pólen com 5,4% de umidade apresentou viabilidade superior aos demais grãos de pólen, somente a  $-196^{\circ}\text{C}$  e a 180 dias o pólen com umidade mais elevada (35,8%) apresentou uma menor viabilidade. Pólen armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 e 120 dias apresentou uma viabilidade similar nas três umidades testadas. Aos 180 dias, o grão de pólen com o maior grau de umidade apresentou menor viabilidade. Assim, o pólen armazenado em baixas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ ) pelo período de 180 dias apresenta baixa viabilidade polínica quando o mesmo possui elevado teor de água (35,8%). Já o pólen desidratado (5,1% e 5,4% de umidade) manteve sua viabilidade quando conservado em baixa temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Pólen seco de beterraba (Hecker et al., 1986), de pêra e pêssego (Akihama et al., 1978) quando submetidos às mesmas condições de armazenamento por períodos superiores a um ano também mantiveram sua viabilidade. Pólen armazenado à  $5^{\circ}\text{C}$  por 60 dias com umidade 5,4% a viabilidade foi superior às demais umidades analisadas nesse período (Tabela 2.13), entretanto em valor absoluto a viabilidade do pólen com umidade 5,1% também foi considerada viável. Aos 120 dias, a viabilidade foi similar com pólen contendo os três teores de umidade. Por 180 dias de armazenamento, o pólen com maior viabilidade foi aquele com umidade de 5,1%, apresentando um valor absoluto próximo do valor aceitável como viável. Na maior temperatura de armazenamento ( $5^{\circ}\text{C}$ ), em valores absolutos, pode-se dizer que a menor viabilidade polínica foi encontrada nos grãos de pólen com elevado grau de umidade nos diferentes períodos de armazenamento. Também pode-se dizer que pelo período de 180 dias associado às três temperaturas de armazenamento analisadas em separado, o pólen foi viável somente quando seu teor de água for baixo (5,1% e 5,4%).

Nas equações de regressão ajustadas para a viabilidade polínica em função do período de armazenamento e do grau inicial de umidade do pólen submetido à  $5^{\circ}\text{C}$ , observou-se que os grãos desidratados (5,1% e 5,4%) permaneceram viáveis por maior período de tempo, quando comparado com o fresco (Figura 2.11). Apresentando no entanto um decréscimo de viabilidade em função do tempo de armazenamento, semelhante ao observado com pólen seco de citrus (Kobayashi et al., 1978). O comportamento do grão de pólen fresco coincidiu com o obtido com pólen de beterraba

(Hecker et al., 1986) e pimenta (Dutra et al., 2000) que permaneceram inviáveis após armazenados à 5°C. Estes resultados são contrastantes com outros autores (Lee et al., 1981; Almeida et al., 1985; Dubouzet et al., 1993; Nomura et al., 1994; Gomez et al., 2000; Siregar e Sweet, 2000; Pio et al., 2007; Silva Filho, 2007) os quais verificaram uma manutenção da viabilidade do grão de pólen fresco de várias espécies armazenados em refrigerador por períodos de dias a anos. Entretanto, nesses trabalhos, os autores não especificaram o grau de umidade dos grãos, não podendo inferir se a umidade teve interferência ou não na conservação, uma vez que algumas espécies apresentam grãos de pólen com elevado teor de água quando extraídos da flor, enquanto outros apresentam teor reduzido de água quando comparado aos primeiros.

Os grãos de pólen frescos submetidos a -20°C mantiveram viáveis por até aproximadamente 150 dias, enquanto os grãos de pólen secos (5,1% e 5,4%) apresentaram certa estabilidade mantendo-se viável por 180 e 170 dias respectivamente (Figura 2.12). Resultados semelhantes foram observados para pólen seco de citrus (Kobayashi et al., 1978). Já o pólen fresco assim como o pólen seco de cereja (Franzon e Raseira, 2006) e de cebola (Kanazawa et al., 1992) também apresentaram uma redução de viabilidade com o passar do tempo de armazenamento, enquanto houve manutenção em ameixa (Lee et al., 1981), tomate (Silva Filho, 2007), *Allium* (Nomura et al., 1994), mamão (Cohen et al., 1989), pistache (Vithanage e Alexander, 1985) e açaí (Oliveira et al., 2001) e inviabilidade com pólen de capim elefante (Techio et al., 2006) e arará (Raseira e Raseira, 1996).

Conforme observado na Figura 2.13, com grãos de pólen secos (5,1% e 5,4%) submetidos a -196°C apresentaram diferenças significativas na viabilidade com o período de armazenamento, mas ainda dentro do intervalo considerado viável (50-80%). Pólen seco de noz inglesa (Luza e Polito, 1988) e de citrus (Kobayashi et al., 1978) mantiveram-se viáveis por vários anos à -196°C. Entretanto, nesta temperatura também é possível manter viável pólen fresco por períodos maiores que um ano para cebola (Ganeshan, 1986b; Kanazawa, 1992; Gomes et al., 2003), noqueira pecã (Yates e Sparks, 1989; 1990), e mamão (Ganeshan, 1986a). O pólen com menor grau de umidade, quando submetido ao nitrogênio líquido, apresenta a sua germinação estimulada. Futuras investigações deverão esclarecer essas observações. Esse fenômeno não tem sido bem entendido, mas pesquisadores como Kartha (1985) também verificaram maior viabilidade do pólen congelado, comparativamente ao recém-colhido.

Segundo esse autor, durante o processo de congelamento poderia haver a liberação de alguns nutrientes necessários à germinação do pólen.

Conforme o comportamento observado nas três temperaturas de armazenamento, à medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação decresce (Oliveira et al., 2001; Einhardt et al., 2006), de forma que o grão de pólen perde sua viabilidade com o tempo de armazenamento (Pereira et al., 2002). Além disso, também foi possível observar que nas três temperaturas de armazenamento, o pólen mais úmido (35,8%) foi o que apresentou uma maior redução de viabilidade polínica com o aumento do período de armazenamento. Segundo Guerra e Nodari (2006), quando o grão é armazenado sob baixa temperatura, é essencial que os mesmos estejam secos para evitar que suas células produzam cristais a partir do conteúdo celular, assim desidratando-os o conteúdo celular aquoso adquire a conformação vítrea, o que é desejável para evitar deterioração do material.

O resultado da viabilidade polínica dos grãos armazenados encontrada no presente estudo não apresentou uma relação direta com a produção de sementes. Essa falta de correlação ocorreu possivelmente devido a metodologia de germinação *in vivo* utilizada, pois mesmo ela apresentando várias vantagens, geralmente acaba superestimando a viabilidade polínica (Bots e Mariani, 2005). Isso ocorre, pois na análise da germinação *in vivo* observa-se o crescimento do tubo polínico, entretanto isso não é um indicativo de que esse tubo tem energia suficiente para alcançar o óvulo e fertilizá-lo, tendo por conseguinte produção de semente. Uma solução para minimizar essa diferença observada entre viabilidade polínica e produção de sementes, seria realizar corte histológico no estigma e no pistilo do botão floral polinizado durante o protocolo de germinação *in vivo* (Einhardt et al., 2006), pois assim seria possível realizar a contagem dos grãos capazes de emitir tubos com força suficiente para percorrer todo estilete e realizar a fecundação.

## CONCLUSÕES

- O grão de pólen de berinjela tolerou dessecação até 5,1% de umidade sem afetar a qualidade fisiológica das sementes.
- O teor de água do grão de pólen, a temperatura e o período de armazenamento afetaram a produção e qualidade fisiológica das sementes híbridas.
- Não houve produção de sementes utilizando grão de pólen armazenado com elevado teor de água (35,8%).
- Grãos de pólen de berinjela com grau de umidade ao redor de 5% produziram sementes com alta qualidade fisiológica quando armazenados a -20°C e -196°C.
- O resultado da viabilidade polínica não apresentou uma relação direta com a produção de sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. Further Investigation of freezer-drying for Deciduous Fruit Tree Pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). **Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops**. Fujimoto: The fruit tree Research Statistics, 1978. p.1-7.

ALMEIDA, F.C.G.; HUANG, F.H.; WADDLE, B.A.; LANE, F.E. Effects of post-anthesis storage variables on pollen of cotton (*Gossypium Hirsutum* L.). **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.16, n.2, p.33-40, 1985.

BARNABÁS, B.; KOVACS, G. Storage of pollen. **Novenytermeles**, [s.l.], v.43, p.447-456, 1994.

BENSON, E.E.; LYNCH, P.T.; STACEY, G.N. Advantages in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **AgBiotech News and Information**, [s.l.], v.10, n.5, p.33-141, 1998.

BENSON, E.E.; WITHERS, L.A. Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbon production by cryopreserved plant tissue cultures: a non-destructive method for assessing stability. **Cryo-Letts**, [s.l.], v.8, p.35-46, 1987.

BERNARD, G.; NOIRET, J.M. Le pollen de palmier à huile réclote. Préparation, conditionnement et utilisation pour la fécondation artificielle. **Oléagineux**, Paris, v.25, n.2, p.67-73, 1970.

BEZDICKOVA, A. **Viability of sweet pepper stored at freezing temperatures**. Bulletin Vyzkumny a Slechtitelsky Ustav Zelinarsky, n. 33, p. 51 – 60. CAB Abstracts on CD – ROM, 1990 – 91, 1989.

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

BOTS, M.; MARIANI, C. **Pollen viability in the field**. Radboud: Universiteit Nijmegen, 2005. 52p. Disponível e: < <http://www.cogem.net/ContentFiles/CGM2005-05.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CARVALHO, J.M.F.C.; VIDAL, M.S. **Criopreservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: EMBRAPA- CNPA, 2003. 22p. (EMBRAPA-CNPA. Documento 115). Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/publicacoes/2003/DOC115.PDF>>. Acesso em: 27 nov. 2007.

CASALI, V.W.D.; PÁDUA, J.G.; BRAZ, L.T. Melhoramento de pimentão e pimenta. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, ano 10, n.113, p.19, 1984.

CHANG, W.N.; STRUCKMEYER, B.E. Influence of temperature, time of day, and flower age on pollen germination, stigma receptivity, pollen tube growth, and fruit set of *Allium cepa* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Logan, v.101, p.81-83, 1976.

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

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

DEAN, C.E. Effects of temperature and humidity on the longevity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen in storage. **Crop Science**, Madison, v.11, p.125-127, 1965.

DUBOUZET, J.G.; SHIMOFURUTACHI, M.; ARISUMI, K.; ETOH, T.; MATSUO, E.; SAKATA, Y. Improvement of pollen germinability and storability in some Japanese *Alliums*. **Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University**, Kagoshima, v.29, p.67-74, 1993.

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

EINHARDT, P.M.; CORREA, E.R.; RASEIRA, M.C.B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.5-7, 2006.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Ciça**: rende o ano inteiro. Brasília, DF: 2003. Equipe técnica: Francisco J. B. Reifschneider; Maria Cristina B. Madeira; Cláudia Silva da Costa Silva. Folder

FERREIRA, C.A.; VON PINHO, E.V.R.; ALVIM, P.O.; SILVA, T.T.A. Conservação e determinação da viabilidade do grão de pólen de milho. In: XXVI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO – INOVAÇÃO PARA SISTEMAS INTEGRADOS DE PRODUÇÃO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: ABMS/EMBRAPA-CNPMS, 2006. p.270.

FRANÇA, L.V.; NASCIMENTO, W.M.; FREITAS, R.A.. Accelerated aging test on eggplant seeds. In: 28TH ISTA CONGRESS/XV CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTE, 28./15., 2007, Foz de Iguaçu. **Anais...** Foz de Iguaçu: Abrates, 2007. p.118.

FRANZON, R.C.; RASEIRA, M.C.B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* dc (myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p.18-20, 2006.

GANESHAN, S. Cryogenic preservation of papaya pollen. **Scientia Horticulturae**, Índia, v.28, n.1-2, p.65-70, 1986a.

GANESHAN, S. Viability and fertilizing capacity of onion pollen (*Allium cepa* L.) stored in liquid nitrogen (-196°C). **Tropical Agricultural**, Índia, v.63, n.1, p.46-48, 1986b.

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

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

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

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Introdução ao conceito de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41p. Apostila de Biotecnologia, material de apoio da 8ª fase do curso de Agronomia - CCA/UFSC. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2007.

GUERRA, M.P.; POMPELLI, M.F. **Conservação de germoplasma in vitro**. 2001. 6p. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgu/conservainvitro.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2007.

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

KANAZAWA, T.; KOBAYASHI, S.; YAKUWA, T. Flowering process, germination and storage of pollen in *Allium victorialis* L. spp. *Platyphyllum* Hult. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japan, v.60, n.4, p.947-953, 1992.

KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press., 1985. 276p.

KELLY, J. K.; RASCH, A.; KALISZ, S. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.89, n.6, p.1021-1023, 2002.

KHAN, M.N.; HEYNE, E.C.; GOSS, A.E. Effect of relative humidity on viability and longevity of wheat pollen. **Crop Science**, Madison, v.11, p.125-127, 1971.

KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Long-term storage of citrus pollen. In: AKIHAMA, T.; NAKAJIMA, K. (Ed.). **Long term preservation of favorable germplasm in arboreal crops**. Fujimoto: The fruit tree Research Statistics, 1978. p.9-12.

KWAN, S.C.; HAMSON, A.R.; CAMPBELL, W.F. Storage conditions for *Allium cepa* L., pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Logan, v.94, n.6, p.569-570, 1969.

- LACERDA, C. A.; OLIVEIRA, L. M.; ALMEIDA, E. C.; LIMA, J. O. G. Meio de cultura e condição ideais para germinar o pólen de *Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Santa Cruz Kada. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.241, p.308-318, 1995.
- LEE, C.L.; BÜNEMANN, G.; HERMANN, S. Long-term storage of plum pollen. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.46, p.69-72, 1981.
- LINSKENS, H.F. Pollen physiology. **Annual Review Plant Physiology**, [s.l.], v.14, p.225-226, 1964.
- LUZA, J.G.; POLITO, V.S. Cryopreservation of english walnut (*Juglans regia* L.) pollen. **Euphytica**, Wageningen, v.37, n.2, p.141-48, 1988.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.
- McGUIRE, D.C. Storage of tomato pollen. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.60, p.419-424, 1952.
- MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLARI, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.1, p.73-75, 1992.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M.; KARTHA, K.K. Crioconservación del germoplasma plantas. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali : CIAT, 1993. 969p.
- NASCIMENTO, W.M. Produção de sementes de berinjela. In: IV CURSO SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE SEMENTES DE HORTALIÇAS, 4., 2004, Brasília. **Palestras...** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. CD-ROM.
- NASCIMENTO, W.M.; LIMA, L.B.; ALVARES, M.C. Maturação de sementes de híbridos de berinjela. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.1040-1041, 2000. Suplemento.
- NASCIMENTO, W.M.; TORRES, A.C.; LIMA, L.B. Pollen viability in hibrid seed production of eggplant under tropical conditions. **Acta Horticulturae**, Davis, v.607, p.37-39, 2003.
- NOMURA, Y.; MAEDA, M.; TSUCHIYA, T.; MAKARA, K. Efficient production of interspecific hybrids between *Allium chinense* and edible *Allium* spp. through culture and pollen storage. **Breeding Science**, Tokyo, v.44, p.151-155, 1994.
- O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcaphi Pty., 1981. 45p.
- OLIVEIRA, M.S.P.; MAUÉS, M.M.; KALUME, M.A.A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açaizeiro. **Acta Botânica Brasilica**, São Carlos, v.15, n.1, p.63-67, 2001.

PEREIRA, R.C.; DAVIDE, L.C.; RAMALHO, M.A.P.; ANDRADE, H.B. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *eucalyptus*. **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p.60-69, 2002.

PIO, L.A.S.; RAMOS, J.D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K.P.; SANTOS, F.S.; RUFINI, J.C.M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.1, p.147-153, 2007.

RAO, G.U.; AJAY JAIN ;SHIVANNA, K.R. Effects of High Temperature Stress on *Brassica* Pollen: Viability, Germination and Ability to Set Fruits and Seeds. **Annals of Botany Company**, Índia, v.69, n.3, p.193-198, 1992.

RASEIRA, M.C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro (*Psidium cattleianum*)**. Pelotas: EMBRAPA/CPACT, 1996. 95p.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; MADEIRA, M.C.B.; SILVA, C. 'Ciça': novo híbrido de berinjela resistente à antracnose e à podridão-de-fomopsis. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, n.57, p.57, 1993.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. **South Pacific Journal of Natural Science**, Fiji, v.20, p.30-33, 2002.

SAS Institute Inc. SAS<sup>®</sup>. **Learning Edition 2.0**, Cary, North Carolina, 2004. 86p.

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

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

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

SMITH, O. **Pollination and life-history studies of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. New York: Cornell University Agricultural Experiment Station, 1935. p.3-16.

SNYDER, E.B.; CLAUSEN, K.E. Pollen handling. **USDA Agricultural Handbook**, Washington, p.75-97, 1974.

SOUSA, V.A. Criopreservação de pólen de *eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.21, p.15-19, 1990.

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

SPRAGUE, J.R.; JOHNSON, V.W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: SOUTHERN FOREST TREE IMPROVEMENT CONFERENCE, 14., 1977. **Proceeding**... Macon: Eastern Tree Seed, 1977. p.20- 27.

STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry, management**. Berlin: Heidelberg, 1974. 307p.

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

TORRES, A.C. **In vitro culture of ovularies of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* (L.) Mill.** 1984. 175p. Tesis (Doctor of Philosophy in Botany) - Riverside, University of California, 1984.

USMAN, I.S., MAMAT, A.S., MODH, H.S.Z.S., AISHAH, H.S., ANUAR, A.R. The non-impairment of pollination and fertilization in the abscission of chilli (*Capsicum annum* L. var. Kulai) flowers under high temperature and humid conditions. **Scientia Horticulturae**, Israel, v.79, n.1-2, p.1-11, 1999.

VIANNA, R.A.P.; BOBROWSKI, V.L.; SILVA, D.S.; SILVA, S.D.A. **Avaliação de diferentes corantes como indicadores de viabilidade do pólen de mamona**. In: 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracajú. Disponível em: <[http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos\\_cbm2/033.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos_cbm2/033.pdf)>. Acesso em: 16 nov. 2007.

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

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

WILLIAMS, J.T. Germplasm conservation in vitro and cryopreservation. In: TORRES, A C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de planta**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p.267-286.

WITHERS, L.A. Cryopreservation of cultured cells and meristems. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Orlando: Academic Press, 1985. p.253-316.

WITHERS, L. A. Freeze preservation of cells. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. p.608-620.

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.297-330.

YATES, I.E.; SPARKS, D. Hydration and temperature influence *in vitro* germination of pecan pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Athens, v.114, n.4, p.599-605, 1989.

YATES, I.E.; SPARKS, D. Three-year-old pecan pollen retains fertility. **Journal of the American for Society Horticultural Science**, Athens, v.115, n.3, p.359-363, 1990.

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

ZAMIR, D.; JONES, R.A. Estimates of the number of pollen grains applied a stigma in a single pollination. **Tomato Genetics Crops**, [s.l.], v.31, p.21, 1981.

**TABELA 2.1. Pegamento de fruto, massa média por frutos e produção de sementes, provenientes do cruzamento utilizando grãos de pólen de berinjela com diferentes graus de umidade e armazenados por diferentes períodos, em diversas condições de armazenamento, Brasília, DF, 2007.**

Período (dias)	Umidade inicial do pólen (%)	Temperatura (°C)	Pegamento de fruto (%)	Massa média por frutos (g)	Produção de sementes (g/fruto)
0	5,1	-	100	551,0	6,670
	5,4	-	100	599,5	10,461
	35,8	-	100	583,8	6,916
60	5,1	-196	100	535,4	4,849
		-20	100	519,7	5,791
		5	100	560,2	0,350 <sup>2</sup>
	5,4	-196	90	589,3	6,577
		-20	100	692,8	6,959
		5	90	616,1	1,963 <sup>2</sup>
	35,8	-196	50	192,7 <sup>1</sup>	0,189 <sup>2</sup>
		-20	50	203,5 <sup>1</sup>	0,131 <sup>2</sup>
		5	30	167,3 <sup>1</sup>	0,000 <sup>2</sup>
		-196	90	476,1	5,482
120	5,1	-20	100	481,6	4,340
		5	100	467,8	0,260 <sup>2</sup>
		-196	100	371,4	4,054
	5,4	-20	90	485,5	8,425
		5	100	169,8 <sup>1</sup>	0,284 <sup>2</sup>
		-196	100	126,9 <sup>1</sup>	0,023 <sup>2</sup>
	35,8	-20	100	145,1 <sup>1</sup>	0,030 <sup>2</sup>
		5	100	189,0 <sup>1</sup>	0,001 <sup>2</sup>
		-196	100	449,3	8,127
		-20	100	445,3	6,784
180	5,1	5	100	303,4 <sup>1</sup>	0,086 <sup>2</sup>
		-196	90	460,3	8,655
		-20	90	556,3	9,962
	5,4	5	80	182,0 <sup>1</sup>	0,007 <sup>2</sup>
		-196	80	147,0 <sup>1</sup>	0,080 <sup>2</sup>
		-20	70	81,4 <sup>1</sup>	0,043 <sup>2</sup>
	35,8	-20	70	81,4 <sup>1</sup>	0,043 <sup>2</sup>
		5	70	53,0 <sup>1</sup>	0,007 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Frutos leves. <sup>2</sup> Produção de semente irrelevante.

**TABELA 2.2. Massa de 100 sementes (g) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Temperatura (°C)	Umidade do pólen (%)			CV (%)
		5,1	5,4	35,8	
0	-	0,568A	0,565A	0,571A	0,26
60	-196	0,528B	0,551A	0,000C*	0,22
	-20	0,523B	0,553A	0,000C*	0,21
	5	0,564B*	0,602A*	0,000C*	0,60
120	-196	0,503A	0,452B	0,000C*	0,25
	-20	0,471A	0,471A	0,000B*	0,30
	5	0,572B*	0,708A*	0,000C*	0,46
180	-196	0,490A	0,483A	0,000B*	0,58
	-20	0,494B	0,525A	0,000C*	0,25
	5	0,000A*	0,000A*	0,000A*	0,00

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.3. Massa de 100 sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007.**

Período (dias)	Umidade do pólen (%)	Temperatura (°C)			CV (%)
		-196	-20	5	
60	5,1	0,528B	0,523B	0,564A*	0,56
	5,4	0,551B	0,553B	0,602A*	0,26
	35,8	0,000A*	0,000A*	0,000A*	0,00
120	5,1	0,503B	0,471C	0,572A*	0,44
	5,4	0,452C	0,471B	0,708A*	0,33
	35,8	0,000A*	0,000A*	0,000A*	0,00
180	5,1	0,490A	0,494A	0,000B*	0,53
	5,4	0,483B	0,525A	0,000C*	0,35
	35,8	0,000A*	0,000A*	0,000A*	0,00

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.4. Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Temperatura (°C)	Umidade do pólen (%)			CV (%)
		5,1	5,4	35,8	
0	-	100A	98A	99A	0,84
60	-196	85B	81B	93A*	2,27
	-20	70B	83A	88A*	3,11
	5	49B*	77A*	00C*	15,42
120	-196	94A	94A	96A*	3,37
	-20	97A	98A	97A*	1,97
	5	72B*	98A*	00C*	2,54
180	-196	93A	88A	90A*	3,24
	-20	94B	97AB	100A*	0,94
	5	80A*	00B*	00B*	6,69

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.5. Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Umidade do pólen (%)	Temperatura (°C)			CV (%)
		-196	-20	5	
60	5,1	85A	70B	49C*	5,11
	5,4	81A	83A	77A*	8,79
	35,8	93A*	89A*	00B*	2,90
120	5,1	94A	97A	72B*	1,97
	5,4	94A	98A	98A*	2,04
	35,8	96A*	97A*	00B*	4,60
180	5,1	93A	94A	80B*	2,75
	5,4	88B	97A	00C*	2,21
	35,8	90B*	100A*	00C*	3,88

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.6. Primeira contagem de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Temperatura (°C)	Umidade do pólen (%)			CV (%)
		5,1	5,4	35,8	
0	-	87A	80A	93A	8,7
60	-196	31A	32A	62A*	24,83
	-20	31B	32B	65A*	18,65
	5	26AB*	36A*	00B*	62,55
120	-196	44A	67A	88A*	21,55
	-20	51A	60A	60A*	29,80
	5	22B*	73A*	00C*	23,17
180	-196	85A	73A	78A*	10,96
	-20	80A	93A	91A*	4,91
	5	49A*	00B*	00B*	16,90

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.7. Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Temperatura (°C)	Umidade do pólen (%)			CV (%)
		5,1	5,4	35,8	
0	-	50A	58A	51A	30,77
60	-196	41A	43A	00B*	56,30
	-20	41A	37A	00B*	57,82
	5	27A*	35A*	00A*	64,69
120	-196	41A	33A	00B*	52,87
	-20	37A	39A	00B*	58,20
	5	24AB*	39A*	00B*	63,63
180	-196	72A	63A	00B*	28,89
	-20	64A	84A	00B*	28,57
	5	00A*	00A*	00A*	0,00

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.8. Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Temperatura (°C)	Umidade do pólen (%)			CV (%)
		5,1	5,4	35,8	
0	-	99A	97A	98A	0,87
60	-196	97A	99A	00B*	0,93
	-20	96A	98A	00B*	1,79
	5	76A*	94A*	00B*	8,10
120	-196	98A	96A	00B*	1,63
	-20	98A	99A	00B*	0,92
	5	93A*	98A*	00B*	4,83
180	-196	97A	97A	00B*	1,17
	-20	96A	97A	00B*	1,56
	5	00A*	00A*	00A*	0,00

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.9. Primeira contagem das sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007.**

Períodos (dias)	Umidade do pólen (%)	Temperatura (°C)			CV (%)
		-196	-20	5	
60	5,1	31A	31A	26A*	40,74
	5,4	32A	32A	36A*	33,43
	35,8	62A*	65A*	00B*	18,72
120	5,1	44A	51A	22A*	34,64
	5,4	67A	60A	73A*	17,85
	35,8	88A*	60A*	00B*	27,20
180	5,1	85A	80A	49B*	6,46
	5,4	73A	93A	00B*	10,26
	35,8	78A*	91A*	00B*	12,87

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.10. Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela provenientes de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007.**

Umidade do pólen (%)	Temperatura (°C)			CV
	-196	-20	5	
5,1	51Aa	47Aa	17Ab*	46,06
5,4	46Aa	53Aa	25Aa*	55,61
35,8	00Ba*	00Ba*	00Ba*	0,00
CV	43,49	45,94	78,23	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.11. Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007.**

Período (dias)	Umidade (%)	Temperatura (°C)			CV (%)
		-196	-20	5	
60	5,1	97A	96A	76B*	5,59
	5,4	99A	98A	94B*	0,81
	35,8	00A*	00A*	00A*	0,00
120	5,1	98A	98A	93A*	3,03
	5,4	96A	99A	98A*	1,87
	35,8	00A*	00A*	00A*	0,00
180	5,1	97A	96A	00B*	1,70
	5,4	97A	97A	00B*	0,93
	35,8	00A*	00A*	00A*	0,00

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \* pólen não produziu semente

**TABELA 2.12. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela submetidos a combinações de períodos de armazenamento (60, 120, 180 dias) com graus iniciais de umidade do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%) por temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C), Brasília, DF, 2007.**

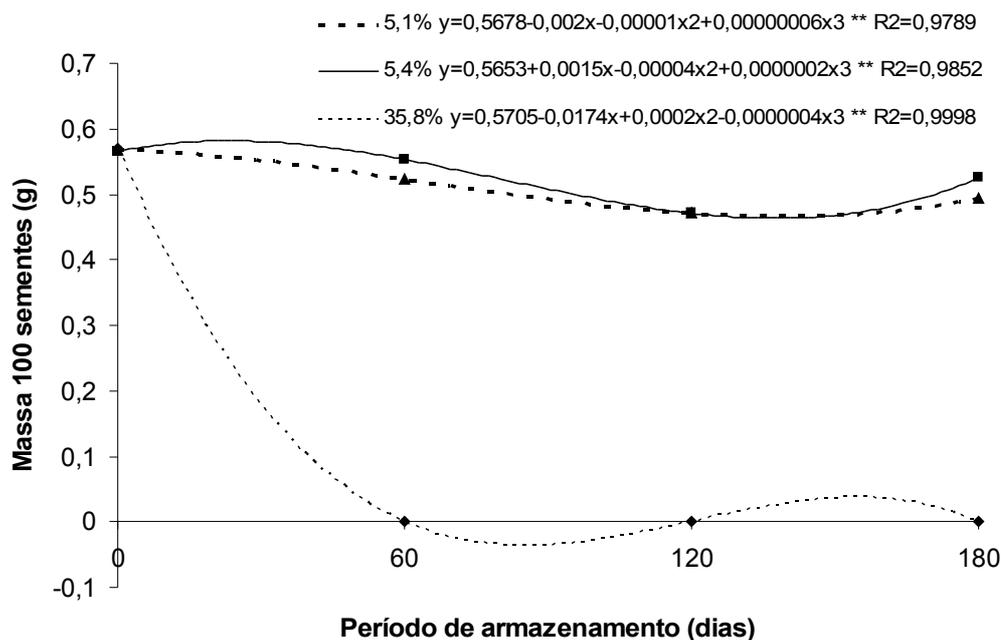
Período (dias)	Umidade do pólen (%)	Temperatura (°C)			CV (%)
		-196	-20	5	
60	5,1	81A	86A	75A	4,76
	5,4	73A	79A	81A	3,74
	35,8	70A	73A	63A	3,86
120	5,1	69B	80A	80A	2,35
	5,4	78A	77A	75A	4,61
	35,8	65A	66A	66A	6,06
180	5,1	67A	55A	53A	5,48
	5,4	64A	62AB	41B	8,97
	35,8	17A	19A	26A	11,50

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

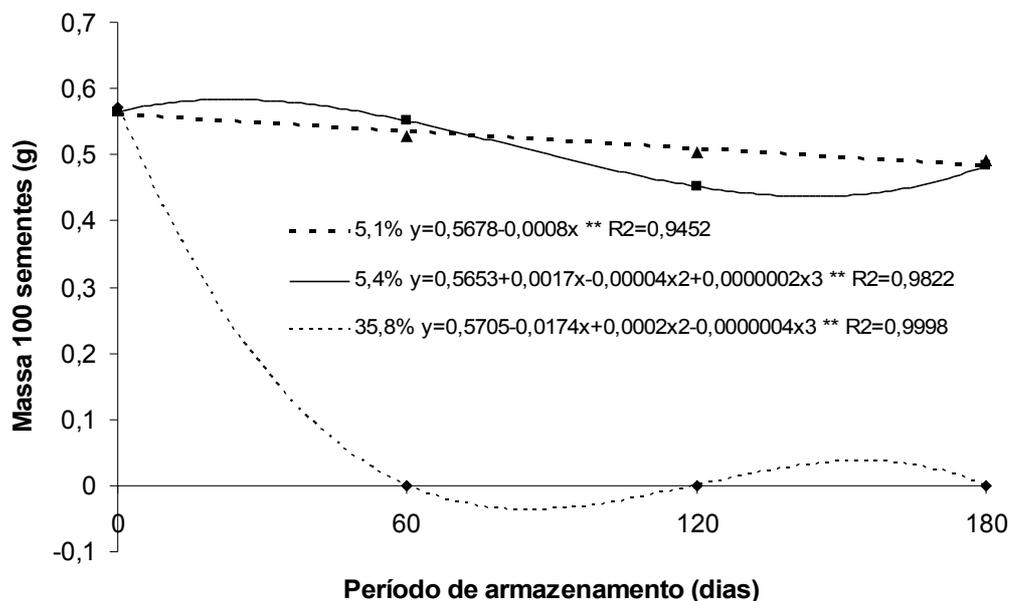
**TABELA 2.13. Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela submetidos a combinações de períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180 dias) com temperaturas de armazenamento (5°C, -20°C, -196°C) por graus iniciais de umidades iniciais do grão de pólen (5,1%, 5,4%, 35,8%), Brasília, DF, 2007.**

Período (dias)	Temperatura (°C)	Umidade do pólen (%)			CV (%)
		5,1	5,4	35,8	
0	-	54A	67A	63A	5,96
60	-196	81A	73A	70A	4,56
	-20	86A	79A	73A	4,18
	5	75AB	81A	63B	3,67
120	-196	69B	78A	65B	2,31
	-20	80A	77A	66A	5,25
	5	80A	75A	66A	5,27
180	-196	67A	64A	17B	6,48
	-20	55A	62A	19B	6,70
	5	53A	41AB	26B	11,38

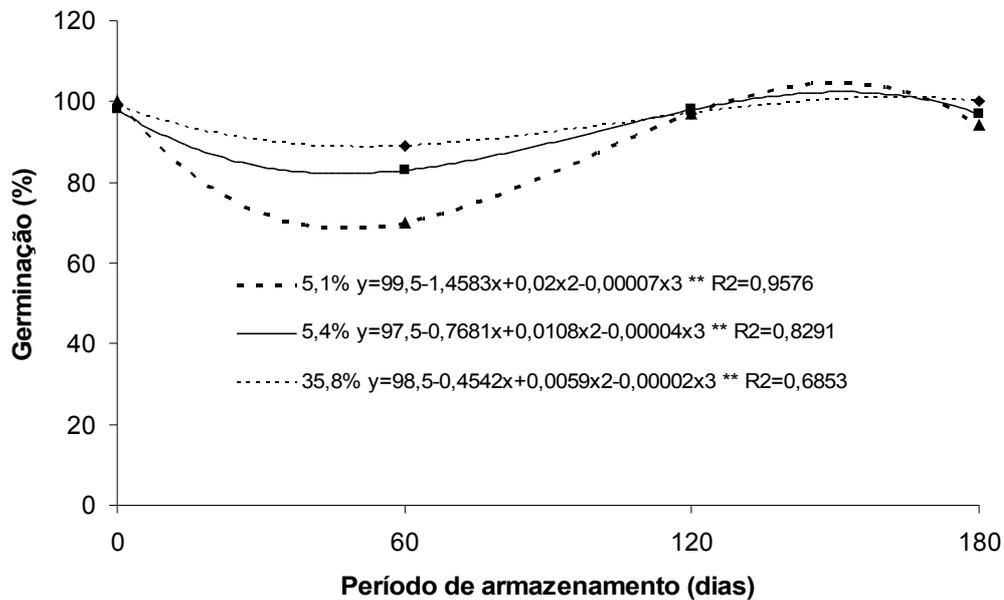
Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



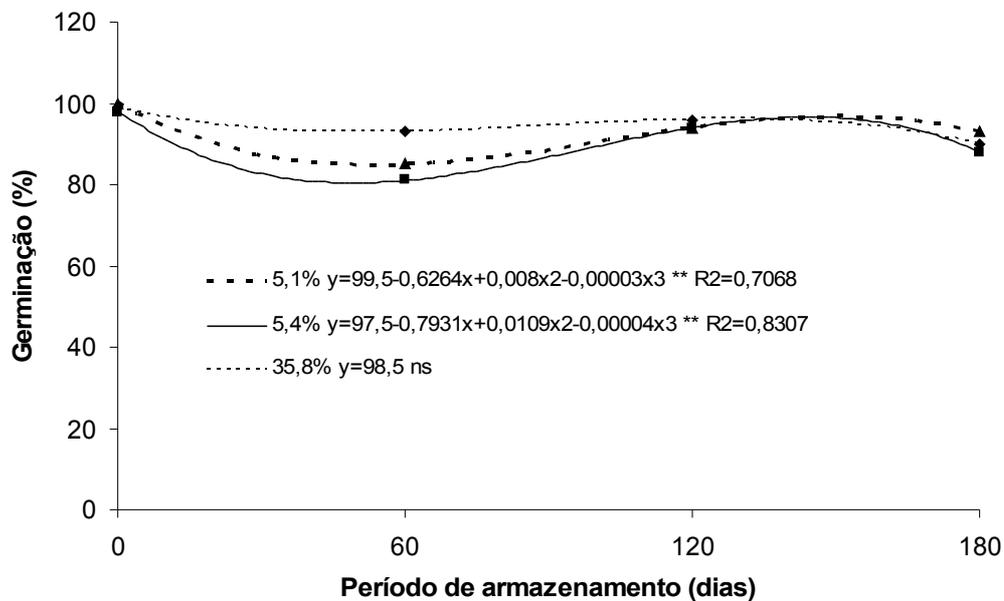
**FIGURA 2.1.** Massa de 100 sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  durante o armazenamento.



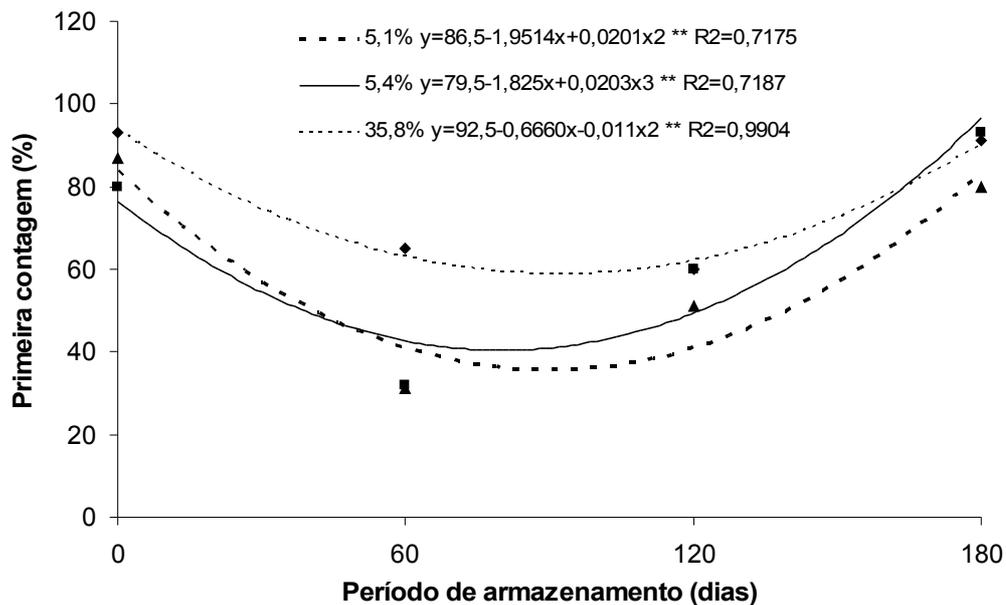
**FIGURA 2.2.** Massa de 100 sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$  durante o armazenamento.



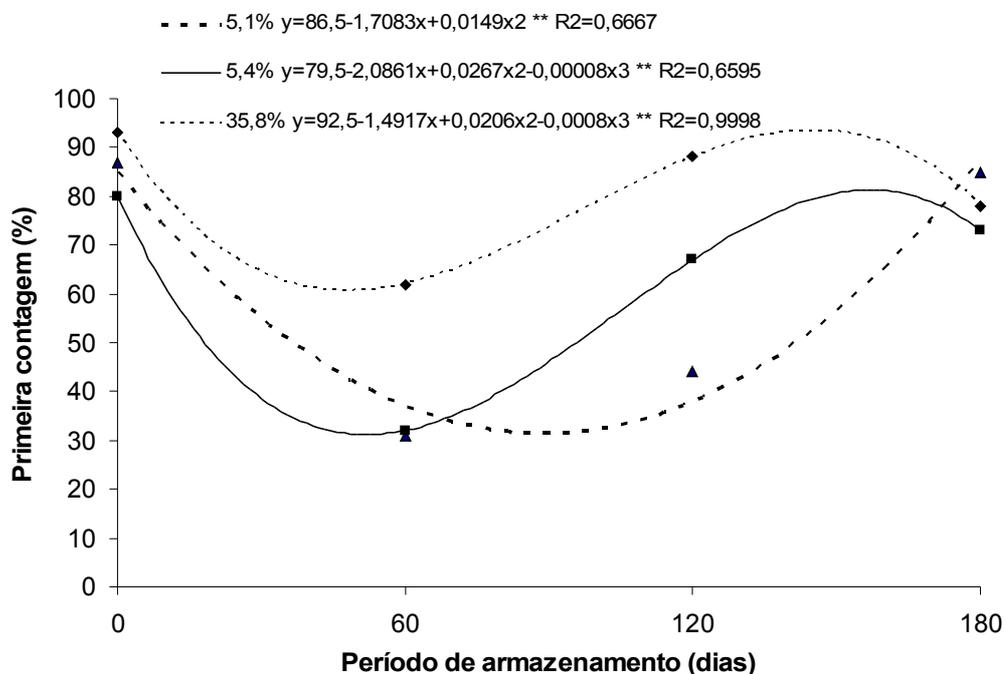
**FIGURA 2.3.** Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento.



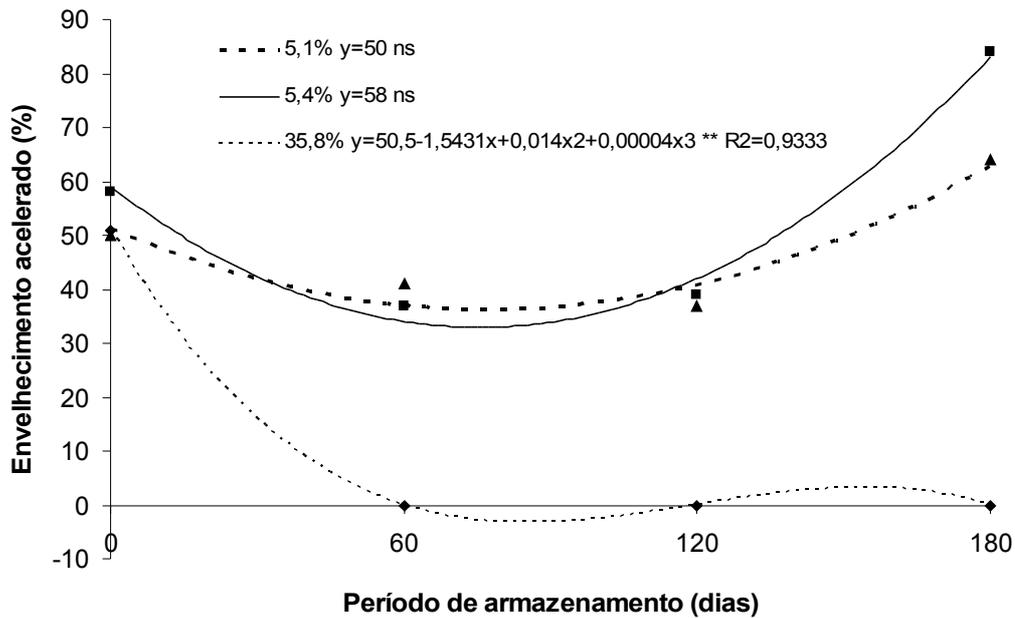
**FIGURA 2.4.** Porcentagem germinativa de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento.



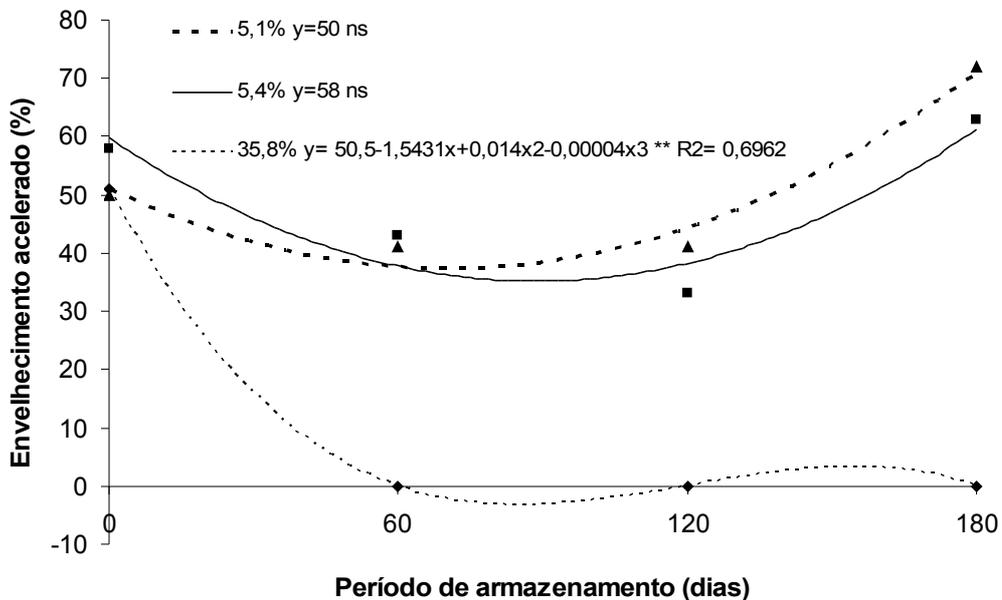
**FIGURA 2.5.** Primeira contagem de sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  durante o armazenamento.



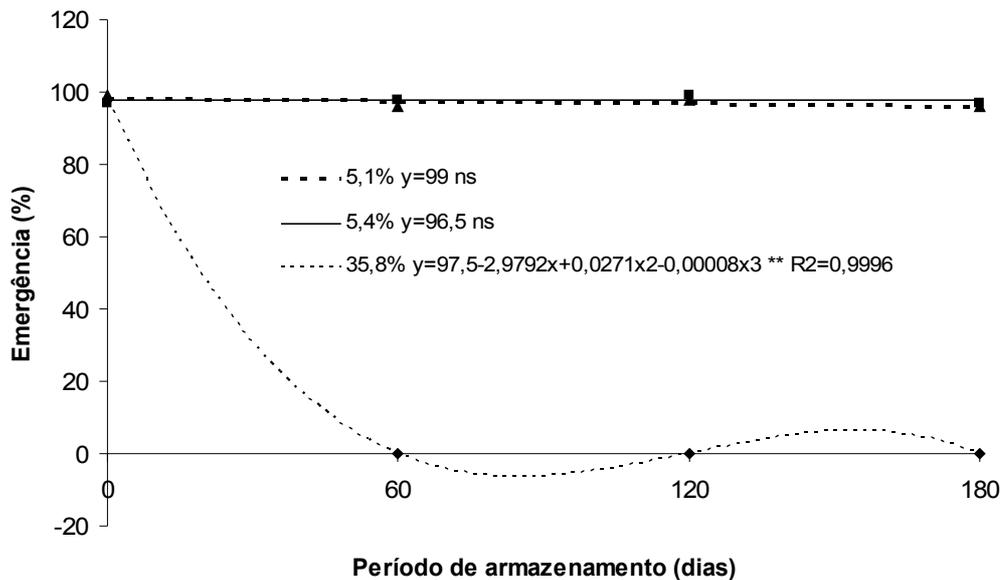
**FIGURA 2.6.** Primeira contagem de sementes (g) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$  durante o armazenamento.



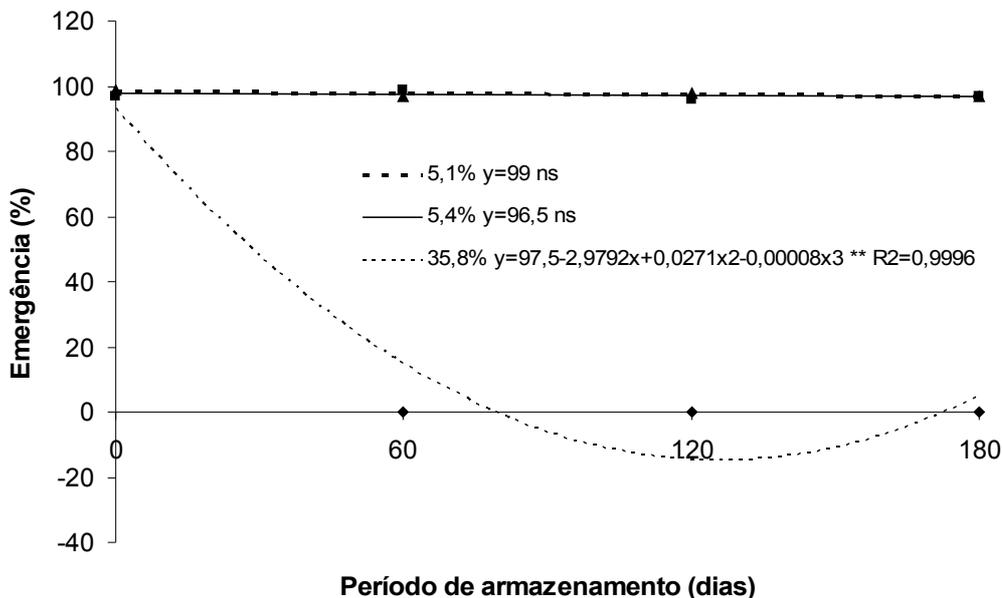
**FIGURA 2.7.** Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento.



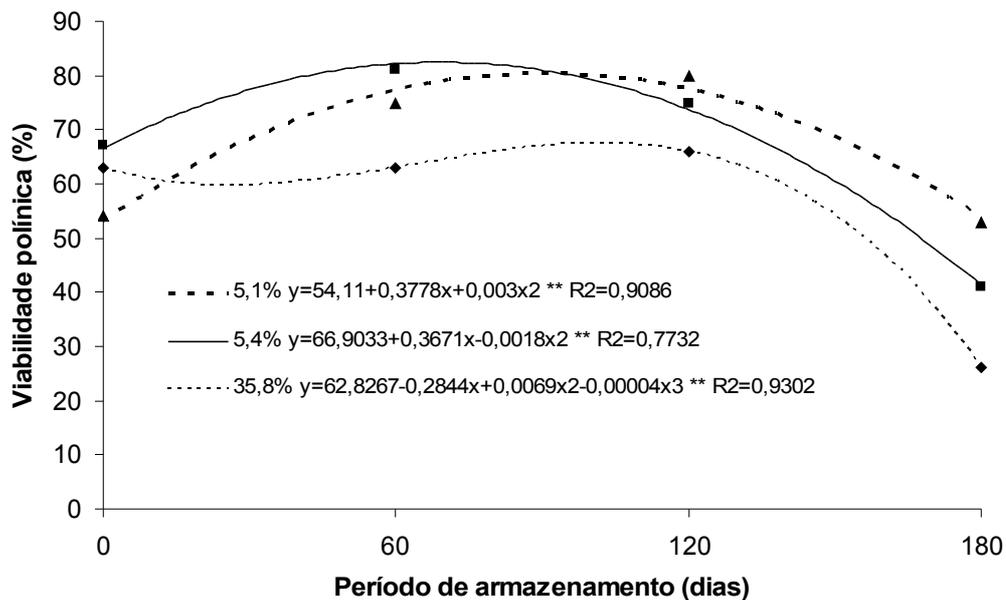
**FIGURA 2.8.** Envelhecimento acelerado de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento.



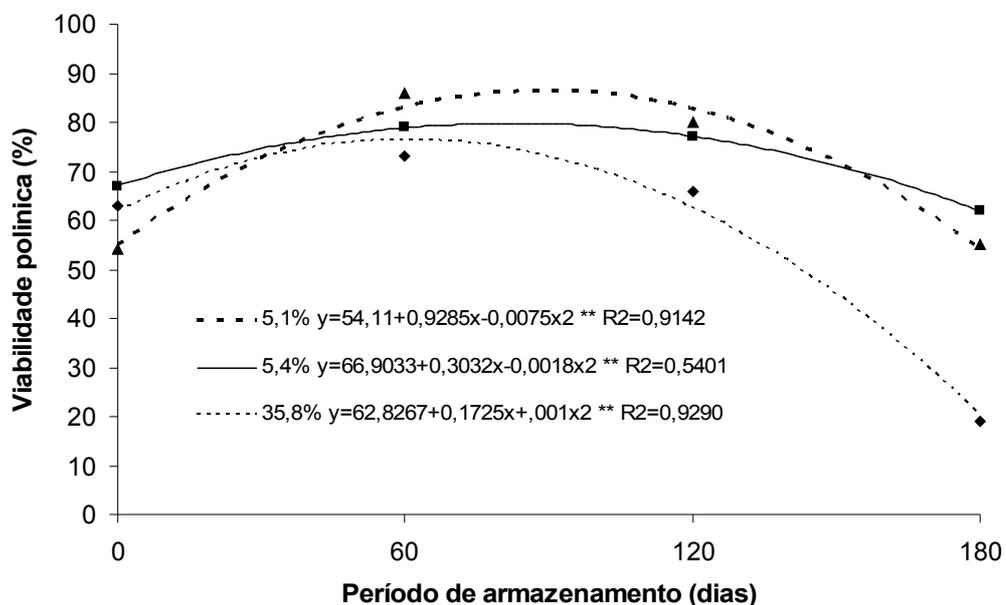
**FIGURA 2.9.** Emergência de plântulas em substrato de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento.



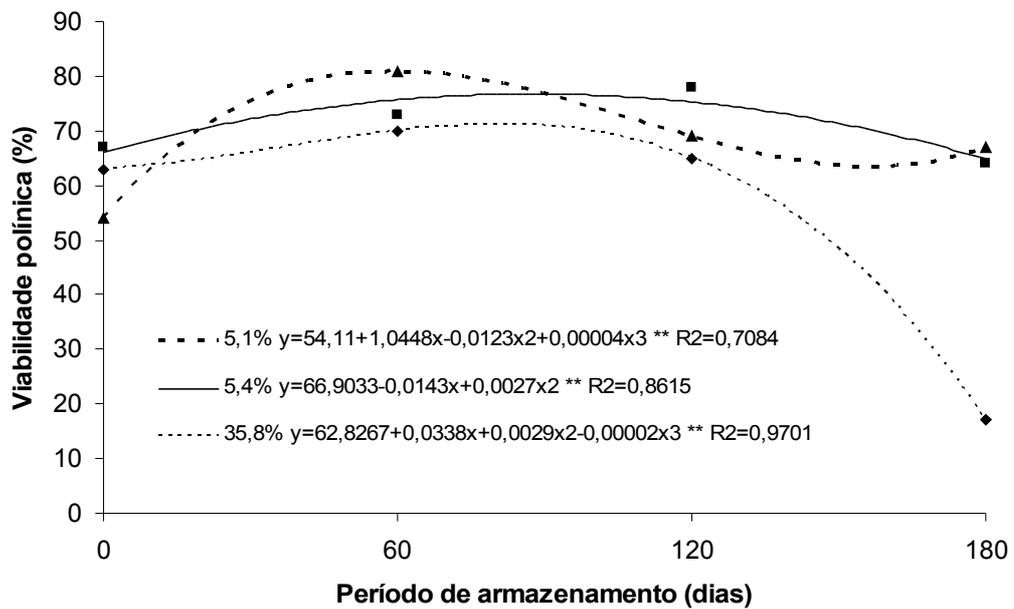
**FIGURA 2.10.** Emergência de plântulas em substrato de sementes (%) de berinjela proveniente de frutos polinizados com grãos de pólen com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -196°C durante o armazenamento.



**FIGURA 2.11.** Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura 5°C durante o armazenamento.



**FIGURA 2.12.** Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura -20°C durante o armazenamento.



**FIGURA 2.13.** Viabilidade polínica (%) de grãos de pólen de berinjela com graus iniciais de umidade (5,1%, 5,4%, 35,8%) submetidos a temperatura  $-196^{\circ}\text{C}$  durante o armazenamento.