

INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS - *CAMPUS* BAMBUÍ
BACHARELADO EM AGRONOMIA

JOÃO VÍTOR SOUZA FROIS

**ESTUDOS DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA VIABILIDADE
DE GRÃOS DE PÓLEN DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

BAMBUÍ/MG

2023

JOÃO VÍTOR SOUZA FROIS

**ESTUDOS DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA VIABILIDADE
DE GRÃOS DE PÓLEN DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso Bacharelado em Agronomia do Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* Bambuí para obtenção do grau de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Luciano Donizete Gonçalves

Coorientadora: Maria Cristina da Silva Barbosa

BAMBUÍ/MG

2023

Catálogo na Fonte Biblioteca IFMG - Campus Bambuí

F929e Frois, João Vítor Souza.

Estudos de métodos para avaliação *in vitro* da viabilidade de grãos de pólen de tomate (*Solanum lycopersicum*) / João Vítor Souza Frois. – Bambuí, 2023.

32 f. ; il.

Orientador: Luciano Donizete Gonçalves.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais. *Campus* Bambuí

1. Cultivo de tomate. 2. Conservação. 3. Melhoramento genético. 4. Protocolo. 5. Viabilidade. I. Gonçalves, Luciano Donizete (orient.). II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus Bambuí. III. Título.

CDD 631.52

Catálogo: João Batista Rodrigues - CRB-6/2022



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS
Campus Bambuí
Diretoria de Ensino
Departamento de Ciências Agrárias
Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Meeiros - Km 05 - Caixa Postal 05 - CEP 38900-000 - Bambuí - MG
37 3431 4900 - www.ifmg.edu.br

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: **Estudos de métodos para avaliação *in vitro* da viabilidade de grãos de pólen de tomate**

Aluno: João Vítor Souza Frois

Data de aprovação: 23/06/2023

Banca Examinadora:

- Orientador: Dr. Luciano Donizete Gonçalves - IFMG - Campus Bambuí
- Coorientadora: Me. Maria Cristina da Silva Barbosa - IFMG - Campus Bambuí
- Membro: Me. Érika Soares Reis - IFMG - Campus Bambuí
- Membro: Dra. Júlia Bahia Miranda - IFMG - Campus Bambuí

Bambuí, 23 de junho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Donizete Gonçalves, Professor**, em 27/06/2023, às 07:12, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Erika Soares Reis, Professora**, em 27/06/2023, às 07:23, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Julia Bahia Miranda, Técnica de Laboratório / Área Biologia**, em 27/06/2023, às 07:51, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Cristina da Silva Barbosa, Técnica de Laboratório / Área Biologia**, em 27/06/2023, às 13:14, conforme Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.ifmg.edu.br/consultadocs> informando o código verificador **1594897** e o código CRC **32588FE6**.

23209.005436/2022-78

1594897v1

Dedico esta conquista a mim por todo esforço; aos meus familiares; aos meus professores e orientadores; em especial, ao Luciano e Maria Cristina, por todo apoio e conselhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial, aos meus pais, Aledes Rodrigues Frois e Vilacina Souza Landim, pelo amor irrestrito, por não pouparem esforços para que o sorriso que hoje trago em meu rosto seja possível; à minha Vó, Maria Rodrigues Frois, pelo incentivo, carinho e conselhos; à minha irmã, Francielle Souza Luiz, pelo apoio incondicional; ao meu amor, Diovane, que faz dos meus sonhos os seus sonhos, obrigado pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo e o carinho proporcionado, te amo! E aos meus sobrinhos, Raphaela e Nicolas, por serem luz na minha vida.

Agradeço aos amigos que estiveram sempre comigo e juntos vivenciamos momentos de alegrias, tristezas, conquistas, vitórias e cumplicidade. Agradeço aos professores, orientadores e funcionários do IFMG - *Campus* Bambuí a compreensão e os ensinamentos.

Enfim, mesmo diante de todos os desafios enfrentados, sou imensamente grato, pois foi através deles que hoje posso vivenciar esse sonho tão especial e aguardado, juntamente com pessoas tão queridas que fizeram parte de minha trajetória... Amo vocês!!!

“Amanhã será um novo dia.”
John Lennon

RESUMO

FROIS, João Vítor. Estudos de métodos para avaliação *in vitro* da viabilidade de Grãos de Pólen de Tomate, 2023. (Bacharelado em Agronomia). Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* Bambuí. 31p.

O tomate é uma das principais hortaliças produzidas e consumidas no Brasil, e grandes esforços são dedicados ao melhoramento genético visando à obtenção de novas cultivares. Tanto para a condução dos programas de melhoramento quanto para a obtenção de sementes híbridas, é necessária a extração de pólenes para utilização nos cruzamentos. Uma estratégia interessante é a determinação de metodologias de armazenamento de pólenes que possam ser disponibilizados por maior período. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estabelecer diferentes métodos e períodos de armazenamento e conservação de grãos de pólen de tomate. O trabalho foi realizado em três etapas: 1^a- determinação de meio de cultura para germinação de pólen e avaliação da tolerância à dessecação do grão de pólen; 2^a- determinação do período após a abertura da flor para coleta de pólen; e 3^a-avaliação do efeito de diferentes condições e períodos de armazenamento de pólen. A viabilidade dos pólenes armazenados foi testada *in vitro*, pela avaliação da germinação em meio de cultura, e, a partir das análises, foi estabelecido um meio de cultura padrão para germinação dos grãos de pólen. Na dessecação do pólen, foram estabelecidas metodologias com o pólen dessecado e com o pólen fresco, sendo que o percentual de viabilidade do pólen fresco foi de 76,7 % e, após a secagem, 0,43%. Conclui-se que a dessecação afetou a germinação *in vitro* do grão de pólen de tomate. No período de abertura da flor de tomate, foram realizados quatro testes de coletas, sendo que, no terceiro dia de coleta, obteve-se um melhor resultado (76%) de germinação dos grãos de pólen, estabelecendo-se que ele é o melhor para a realização da coleta das flores e retirada dos grãos de pólen. Para avaliação do armazenamento de pólenes, foram testados quatro métodos (temperatura ambiente 22° C, refrigerador 9° C, freezer -4° C e congelador -15° C) e quatro períodos de armazenamento (10, 20, 30 e 40 dias). Observou-se que, no refrigerador, a viabilidade dos grãos de pólen se manteve maior dentre os quatro períodos armazenados. No entanto, a germinação, em todos os ambientes, foi consideravelmente baixa, não sendo encontrados valores eficientes para um possível armazenamento e utilização posterior desses pólenes.

Palavras-chave: Cultivo de tomate, conservação, melhoramento genético, protocolo, viabilidade.

ABSTRACT

FROIS, Joao Vitor. Studies of methods for in vitro evaluation of the viability of Tomato Pollen Grains, 2023. (Bachelor in Agronomy). Federal Institute of Minas Gerais – Campus Bambuí. 31p.

Tomato is one of the main vegetables produced and consumed in Brazil, and great efforts are dedicated to genetic improvement in order to obtain new cultivars. Both for conducting breeding programs and for obtaining hybrid seeds, it is necessary to extract pollen for use in crossings. An interesting strategy is the determination of pollen storage methodologies that can be made available for a longer period. Therefore, this work aimed to establish different methods and periods of storage and conservation of tomato pollen grains. The work was carried out in three stages: 1st - determination of the culture medium for pollen germination and assessment of tolerance to desiccation of the pollen grain; 2nd - determination of the period after flower opening for pollen collection; and 3rd - evaluation of the effect of different conditions and periods of pollen storage. The viability of the stored pollens was tested in vitro, by evaluating germination in a culture medium, and based on the analyses, a standard culture medium was established for the germination of pollen grains. In pollen desiccation, methodologies were established with dried pollen and with fresh pollen, and the percentage of viability of fresh pollen was 76.7% and, after drying, 0.43%. It is concluded that desiccation affected the in vitro germination of tomato pollen grain. In the period of opening of the tomato flower, four collection tests were carried out, and on the third day of collection, a better result (76%) of pollen grain germination was obtained, establishing that it is the best for carrying out the collection of flowers and removal of pollen grains. To evaluate pollen storage, four methods were tested (room temperature 22°C, refrigerator 9°C, freezer -4°C and freezer -15°C) and four storage periods (10, 20, 30 and 40 days). It was observed that, in the refrigerator, the viability of the pollen grains remained higher among the four stored periods. However, germination, in all environments, was considerably low, not being found efficient values for a possible storage and later use of these pollens.

Keywords: Tomato cultivation, conservation, genetic improvement, protocol, viability..

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 13 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 11 |
| 3.1 CULTURA DO TOMATEIRO - PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS E A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA CONSERVAÇÃO DE PÓLEN PARA A ESPÉCIE..... | 13 |
| 3.2 BIOLOGIA FLORAL DO TOMATEIRO | 12 |
| 3.3 ASPECTOS MORFOANATÔMICOS DO GRÃO DE PÓLEN | 13 |
| 3.4 VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN..... | 14 |
| 3.5 ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE PÓLEN | 15 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 16 |
| 4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DESSECAÇÃO PARA GERMINAÇÃO DE PÓLEN DE TOMATEIRO..... | 16 |
| 4.2 DETERMINAÇÃO DO MELHOR PERÍODO APÓS A ABERTURA DA FLOR PARA COLETA DO PÓLEN | 18 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO DE PÓLEN SOBRE A GERMINAÇÃO | 18 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 19 |
| 5.1 CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA..... | 19 |
| 5.2 DESSECAÇÃO DO PÓLEN..... | 22 |
| 5.3 PERÍODO DE ABERTURA DA FLOR PARA COLETA DE PÓLEN..... | 23 |
| 6 CONCLUSÃO | 25 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma das principais hortaliças produzidas e consumidas ao redor do mundo. Poucos frutos adquiriram em tão curto espaço de tempo tanta popularidade, o que constitui, nestes últimos anos, um incentivo à investigação, permitindo a obtenção de resultados notáveis no sentido do melhoramento da produção e da qualidade, melhorando as variedades antigas e introduzindo novas (FLAWN, 1997).

Atualmente, o lançamento de novas cultivares melhoradas tornou obsoletas as cultivares tradicionais, que vinham se perpetuando durante anos. Assim, têm sido desenvolvidas e lançadas cultivares com resistência genética a uma gama variada de doenças e anomalias fisiológicas. A seleção de espécies teve início a partir de cultivares selvagens, que se disseminaram desde a era pré-colombiana, onde o tomate era cultivado nos tabuleiros andinos. Os Maias, habitantes da América Central, chamavam a hortaliça de tomatl, e foram responsáveis por disseminá-la para os povos Astecas (FLAWN, 1997).

A utilização de híbridos já está consolidada e busca atender a todos os mercados para a produção de tomate, principalmente dos grupos: Tomates para a indústria e Tomates de mesa. Os híbridos, em geral, são o resultado do cruzamento entre dois genitores de linhagens puras diferentes, o que resulta em características homogêneas entre si, mas distintas em relação aos pais. Embora ofereçam benefícios significativos, como maior produtividade, sua obtenção por meio de programas de melhoramento genético apresenta desafios, incluindo custos elevados, seleção criteriosa e coleta de pólen (SILVA *et al.*, 2000).

Dentre os sistemas de obtenção de novas cultivares de tomate, a hibridação é o método mais empregado, no qual é fundamental a realização da polinização artificial realizada a partir da emasculação das flores da linha materna e da extração de pólen da linha paterna. A polinização empregada no melhoramento de plantas consiste no processo pelo qual os grãos de pólen das plantas são transferidos das anteras das flores, onde são produzidos, para o órgão receptor feminino (estigma) da mesma flor, ou de outra flor da mesma planta, ou, ainda, de outra planta da mesma espécie (FREITAS, 1995). Este processo é necessário para que os grãos de pólen possam germinar no estigma da flor e fecundar os óvulos, dando origem às sementes, assegurando a próxima geração de plantas daquela espécie.

Tanto na condução de programas de melhoramento quanto na produção de sementes híbridas comerciais, a atividade de polinização é uma prática comum, e, para isso, são mantidas as linhas maternas e paternas concomitantemente. Por outro lado, a possibilidade de armazenamento de grãos de pólen poderia facilitar este processo, dispensando a necessidade de

ter as duas linhagens ao mesmo tempo, promovendo maior intercâmbio de germoplasma. Embora existam resultados de pesquisa que demonstrem a viabilidade de armazenamento de pólen de algumas espécies de plantas, para o tomate, as informações são escassas e ainda não há protocolos definidos de maneira prática para pronta utilização. Desta forma, a identificação de metodologias que assegurem a conservação do grão de pólen pode ser uma estratégia eficiente tanto nos processos de melhoramento genético, para obtenção de novas cultivares, quanto na produção comercial de sementes híbridas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer diferentes métodos de armazenamento e conservação de grãos de pólen de tomate.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um meio de cultura padrão para germinação do grão de pólen;
- Definir um protocolo para dessecação do grão de pólen;
- Determinar o melhor período, após a abertura das flores, para coleta do pólen;
- Avaliar a taxa de fecundação do grão de pólen em função de diferentes períodos e condições de armazenamento.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cultura do Tomateiro - produção de híbridos e a importância do estudo da conservação de pólen para a espécie

A cultura do tomateiro é uma das mais importantes do mundo, sendo esta hortaliça amplamente destinada ao consumo humano, tanto na forma fresca quanto processada. A produção de híbridos é uma das técnicas utilizadas para aumentar a produtividade e a resistência do tomateiro a doenças, pragas e condições climáticas adversas (FAO, 2019). Os híbridos são obtidos por meio da combinação de duas variedades distintas de tomateiro, com características desejáveis para a produção agrícola (MWAI, 2017). Essas variedades são selecionadas com

base em critérios como a resistência a doenças, o sabor, o tamanho e a cor dos frutos, entre outros.

Na agricultura, a utilização do grão de pólen para a obtenção de híbridos pode combinar aspectos desejáveis de ambas as variedades, adquirindo características de grande importância agrícola. Assim, o estudo da conservação de pólen é de extrema importância para a cultura do tomateiro, pois permite o armazenamento de grãos de pólen viáveis por longos períodos, facilitando a produção de híbridos e a manutenção da diversidade genética da espécie (MAHESHWARI, 2005). O método de conservação de pólen é realizado por meio de técnicas de armazenamento em nitrogênio líquido, em temperaturas muito baixas, que garantem a viabilidade do grão de pólen por vários anos (ENGELMANN, 2011). Dessa forma, eles podem ser utilizados para a produção de novos híbridos, mesmo após décadas de armazenamento.

Além disso, a conservação de pólen permite a preservação da variabilidade genética das populações de tomateiro, contribuindo para a manutenção da diversidade da espécie e para o desenvolvimento de novas variedades, com características agrônomicas desejáveis (FAO, 2014).

3.2 Biologia floral do tomateiro

O tomateiro é uma planta que apresenta flores hermafroditas, ou seja, que possuem tanto estruturas reprodutivas masculinas (estames) quanto femininas (estigma, estilo e ovário) (AGRIOS, 2005).

De acordo com Taiz *et al.* (2013), as flores do tomateiro são do tipo infundibuliforme, com formato de funil, e apresentam cinco pétalas amarelas ou brancas, que formam uma corola. Os estames estão posicionados em torno do estigma, formando um tubo estaminal que envolve o ovário. O estigma é do tipo discoide, localizado no centro da flor, responsável pela recepção do pólen. A planta comporta-se como autógama, ocorrendo a autofecundação.

As flores, normalmente, são polinizadas pelo pólen da mesma flor ou de outra flor do mesmo indivíduo. Isso permite que a planta possa produzir frutos mesmo em ambientes com pouca polinização por insetos, o que é comum em cultivos protegidos ou em regiões com baixa presença de polinizadores (CROSATI, 2018). Dessa maneira, o tomate se apresenta como uma planta autógama, e a taxa de fecundação cruzada, em que o pólen de uma planta fecunda outra planta, é muito baixa, sendo inferior a 5% (BOITEUX *et al.*, 2007). As inflorescências (cachos de flores) desenvolvem-se junto às folhas e, posteriormente, formam os cachos de frutos. Outra característica interessante da biologia floral do tomateiro é que a abertura das flores ocorre de

forma sequencial, com as flores mais jovens abrindo primeiro, e as mais velhas, posteriormente. Isso garante que a planta possa manter a produção de frutos por um período prolongado, mesmo que ocorra uma baixa na polinização por um curto período (CARRERA *et al.*, 2016).

3.3 Aspectos Morfoanatômicos do Grão de Pólen

O grão de pólen é a estrutura responsável pela reprodução das plantas e consiste em uma célula haploide que contém o material genético masculino da planta. Ele é produzido nas anteras das flores e é dispersado pelo vento, água ou por animais polinizadores (HESLOP-HARRISON, 2018). A estrutura do grão de pólen é composta pelo seu tamanho e várias partes, incluindo a exina, intina, abertura, citoplasma, núcleo vegetativo e célula germinativa (PACINI *et al.*, 2017).

O tamanho do grão de pólen pode variar bastante entre as espécies de plantas. Algumas espécies têm grãos de pólen tão grandes que são visíveis a olho nu, enquanto outras têm grãos de pólen tão pequenos que só podem ser vistos através de um microscópio, por exemplo, os pólenes de *Solanum lycopersicum* (PACINI *et al.*, 2017).

A exina é a camada externa do grão de pólen, composta principalmente de esporopolenina, uma substância resistente à decomposição. A exina pode ter vários padrões ornamentais, como espinhos, verrugas ou lacunas, que ajudam a identificar as espécies de plantas (PACINI *et al.*, 2017).

Por outro lado, a intina é a camada interna do grão de pólen, constituída principalmente de celulose e pectina. A intina é mais fina do que a exina e é responsável por manter a forma do grão de pólen (PACINI *et al.*, 2017).

A abertura é a parte do grão de pólen por onde ocorre a germinação do tubo polínico, responsável por transportar o material genético masculino até o óvulo. A abertura pode estar localizada em diferentes partes do grão de pólen, como na extremidade ou na lateral (PACINI *et al.*, 2017).

O citoplasma é o material interno do grão de pólen e contém os núcleos haploides e outras organelas, como mitocôndrias e ribossomos (HESLOP-HARRISON, 2018).

O núcleo vegetativo é a célula haploide que contém o núcleo da célula vegetativa que se divide e se diferencia em um tubo polínico durante a germinação do grão de pólen. A célula germinativa é a célula haploide que contém o material genético masculino da planta, responsável pela fertilização do óvulo (HESLOP-HARRISON, 2018).

Assim, a forma, o tamanho e a ornamentação do grão de pólen podem ser utilizados na taxonomia das plantas e na identificação de espécies. A sua estrutura complexa e variada é essencial para a reprodução e, além disso, a análise da morfologia do grão de pólen pode fornecer informações sobre a evolução das plantas e sua relação com os polinizadores (PACINI *et al.*, 2017).

3.4 Viabilidade de grãos de pólen

Segundo Taiz e Zeiger (2013), a viabilidade do grão de pólen está relacionada à sua capacidade de germinar e produzir um tubo polínico funcional, essencial para a fertilização dos óvulos das plantas. Diversos fatores podem influenciar a viabilidade do grão de pólen, por exemplo, a idade, a temperatura, a umidade e a presença de substâncias químicas no ambiente. Para manter a viabilidade do grão de pólen a longo prazo, é necessário armazená-lo em condições adequadas de temperatura e umidade. Conforme mencionado por Heslop-Harrison (2018), é comum armazenar o grão de pólen em freezer a -20°C ou em nitrogênio líquido a -196°C .

O armazenamento de grãos de pólen em condições controladas tem diversas aplicações práticas, como a conservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção, a hibridação de plantas para produzir novas variedades, a criação de bancos de germoplasma para uso em programas de melhoramento genético e a produção de sementes híbridas. No entanto, é importante lembrar que nem todos os tipos de grãos de pólen podem ser armazenados com sucesso em condições controladas e que os protocolos de armazenamento podem variar entre as espécies vegetais, conforme destacado por PACINI *et al.*, 2017.

Segundo Silva Filho *et al.* (2007), o conhecimento sobre a viabilidade dos grãos de pólen é um fator estratégico na produção comercial de sementes híbridas e nos programas de melhoramento genético, principalmente em espécies autógamas, como é o caso do tomate. Desta forma, tecnologias eficazes de armazenamento de pólen possibilitam uma maior flexibilidade na produção de sementes híbridas, facilitando o armazenamento dos grãos de pólen da progênie masculina para futura utilização, auxiliando no processo de produção comercial de sementes híbridas. Assim, é possível garantir, também, a segurança do detentor do híbrido, permitindo o repasse desses grãos de pólen e a expansão geográfica para a rede de produtores e cooperados envolvidos na produção de híbridos.

Não há, na literatura consultada, trabalhos sobre a técnica de conservação de grãos de pólen de tomateiro para as condições brasileiras. Assim, o desenvolvimento de uma

metodologia simples e eficiente, que permita o armazenamento de grãos de pólen de tomateiro, em curto e médio prazos, é de suma importância no sistema produtivo de sementes híbridas dessa espécie no país.

Alguns autores citam que o limite prático de armazenamento de grãos de pólen de tomate para produção de sementes é de seis meses (MCGUIRE, 1952). Mas há contradições, pois trabalhos mostram que, em temperaturas de -20°C e -80°C , os grãos de pólen ainda permaneciam viáveis por até 120 dias (DA SILVA FILHO *et al.*, 2007).

No armazenamento a 4°C , pode-se garantir a conservação do pólen por até 30 dias, com uma porcentagem de germinação de 53%. De fato, trabalhos de Dutra *et al.* (2000) e Nascimento *et al.* (2003) não recomendam o armazenamento de grãos de pólen para produção de sementes híbridas por período superior a 30 dias, já que há uma queda da viabilidade após esse período.

Em síntese, para conservação de grãos de pólen por até 60 dias, pode-se utilizar o armazenamento à temperatura de -20°C . O armazenamento do pólen por um período superior a 60 dias não é recomendado para nenhuma das temperaturas testadas. Dentre as técnicas de conservação, somente a criopreservação (armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C) pode garantir um armazenamento de germoplasma em longo prazo (DUTRA *et al.*, 2000).

De acordo com Bajaj. (1995), o armazenamento de pólen em nitrogênio líquido, se realizado adequadamente, é capaz de manter sua viabilidade por longos períodos.

3.5 Armazenamento de Grãos de Pólen

Vieira *et al.* (2011) definem protocolos de criopreservação de pólen de diversas espécies, como *Mangifera indica*, *Carica papaya*, *Carica cauliflora*, *Citrus limon*, *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, entre outras (SHIVANNA & SAWHNEY, 1997). 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 (KAJIURA *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 microrganismos e, conseqüentemente, da deterioração dos grãos de pólen (FRANÇA, 2010). A otimização do processo de conservação do pólen, além do período, depende principalmente de fatores como o estágio fisiológico da flor, a temperatura e umidade relativa do ambiente de

armazenamento, e do grau de umidade do grão de pólen (AKIHAMA *et al.*, 1979; GIORDANO *et al.*, 1999).

Segundo Scorza e Sherman (1995), um pólen ideal deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem, comprometendo, dessa forma, a fertilização (FRANÇA, 2010).

A partir desses métodos estudados e citados na literatura, é possível avaliá-los e caracterizar quais apresentam vantagens e maiores eficiências no processo de armazenamento do pólen, pois, com a polinização bem conduzida, ocorrem diversos fatores importantes na agricultura. Vários benefícios já foram observados com a realização de uma boa polinização, como o aumento de vagens em soja (CHIARI *et al.*, 2008), aumento do número de frutos e de sementes em tomate (DEL SARTO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2009) e em pimentão (ROSELINO *et al.*, 2010). Além disso, ocorre o aumento da qualidade, com a uniformização do amadurecimento e diminuição dos índices de má-formação dos frutos (WILLIAMS *et al.*, 1991).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Setor de Olericultura e no Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais (IFMG) - *Campus* Bambuí, dividindo-se em três diferentes etapas.

4.1 Determinação da concentração do meio de cultura e dessecação para germinação de pólen de tomateiro

Inicialmente, foi realizado um ensaio para determinação da concentração do meio de cultura e a melhor forma de utilização de grãos de pólen dessecados ou grãos de pólen recém-extraídos.

Foram coletadas novas flores de tomate, as quais foram levadas ao Laboratório de Melhoramento Genético, retirando-se da flor as pétalas, sépalas e deixando o estigma completamente livre para a retirada do grão de pólen (Figura 1), com o auxílio de um vibrador elétrico. Para a avaliação da germinação, os grãos de pólen úmidos foram polvilhados sobre placas de Petri com meio de cultura em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar) e, posteriormente, as placas foram incubadas em câmara climatizada BOD a 22° C por 24 horas.

Figura 1 – Flores das quais foram retiradas as pétalas e as sépalas



Fonte: Arquivo do autor (2023).

A padronização do meio de cultura foi realizada através de três pré-testes. Através da consulta bibliográfica, definiu-se que o meio de cultura deveria ter em sua composição dois principais componentes, a sacarose, que tem por objetivo proporcionar o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico (STANLEY & LINSKENS, 1974). E o boro, responsável por maximizar a germinação *in vitro* e, segundo Pfahler (1968). A adição do mesmo permite a interação com o açúcar, o que forma um complexo ionizável açúcar -borato, reagindo mais rapidamente com as membranas celulares (THOMPSON & BATJER, 1950). Nos testes, foi realizada a variação das concentrações de sacarose e a concentração de boro foi mantida constante.

Seguindo para as variáveis de concentração do meio, o primeiro teste, o meio de cultura, em sua constituição, possui 10 gramas por litro de ágar, 50 gramas por litro de sacarose e 0,004 gramas por litro de ácido bórico; o segundo pré-teste, 10 gramas por litro de ágar, 100 gramas por litro de sacarose e 0,004 gramas por litro de ácido bórico; e, por último, o terceiro pré-teste, em sua constituição, possui 10 gramas por litro de ágar, 150 gramas por litro de sacarose e 0,004 gramas por litro de ácido bórico, sendo a variável a sacarose (Figuras 2 e 3).

Figura 2 – Preparo do meio



Fonte: Arquivo do autor (2023).

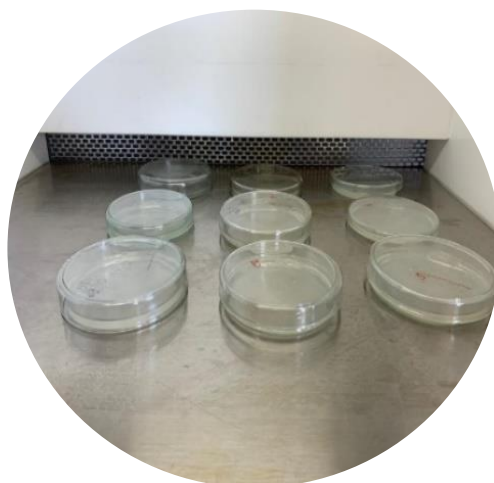
Figura 3 – Ajuste do pH



Fonte: Arquivo do autor (2023).

O pólen coletado, conforme descrito, foi utilizado para testagem dos meios de cultura. O pólen foi depositado nos diferentes meios, contidos em placas de petri, e, após 24 horas, foram preparadas lâminas desse material (Figura 4). As lâminas foram analisadas em três campos diferentes em microscópio óptico, objetiva de 40x, considerando-se germinado aquele grão de pólen que apresentasse um alongamento do tubo polínico. Ao final do ensaio, foi realizada a análise de variância dos valores médios de porcentagem de grãos de pólen germinados, considerando-se a interação entre as concentrações e a secagem dos grãos, utilizando-se o *software* Sisvar (Ferreira, 2015).

Figura 4 – Meio vertido sobre as placas de Petry



Fonte: Arquivo do autor (2023).

Para dessecação do pólen, foi utilizado um dessecador contendo sílica em gel para retirar a umidade dos grãos de pólen, os quais ficaram ali por 24 horas, sendo que, após esse 17 período, o pólen foi submetido ao meio de cultura, efetuando-se o mesmo método para o pólen recém-extraído, diferenciando-se apenas em relação à umidade.

Realizou-se a análise do desdobramento do tipo de secagem dentro de cada concentração utilizada, e, quando observadas as diferenças significativas, foram aplicados os testes de Scott-Knott para comparação de médias.

4.2 Determinação do melhor período após a abertura da flor para coleta do pólen

No trabalho conduzido em casa de vegetação do Setor de Olericultura, em delineamento de blocos casualizados, os tratamentos experimentais consistiram em quatro diferentes períodos de coleta das flores (1, 2, 3 e 4 dias), contados a partir de sua abertura, e quatro repetições (Figura 5).

Figura 5- Trabalho conduzido sob cultivo protegido no Setor de Olericultura



Fonte: Arquivo do autor (2023).

Foram utilizadas mudas de tomate da variedade IPA 6, que receberam as práticas de manejo normais recomendadas para a cultura. Os tratamentos experimentais consistiram em quatro diferentes períodos de coleta das flores (1, 2, 3 e 4 dias), contados a partir de sua abertura, e quatro repetições. Para a execução deste ensaio, quando as plantas estavam em florescimento, eliminaram-se todas as flores abertas e os frutos já formados. Todas as flores fechadas foram marcadas com um cordão de algodão. No dia seguinte, no período da manhã, foram iniciadas as coletadas de todas as flores abertas, as quais foram levadas ao Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas para extração do pólen e avaliação da germinação. Estes pólenes constituíram o primeiro tratamento, com um dia de abertura da flor. O mesmo procedimento foi adotado no segundo, terceiro e quarto dias. Os pólenes coletados foram aplicados em placas de petri contendo o meio de cultura definido no ensaio inicial, conforme descrito anteriormente. Desta forma, buscou-se determinar qual o período ideal para a coleta de pólen considerando-se a abertura da flor.

Ao final do ensaio, foi realizada a análise de variância da porcentagem de germinação de grão de pólen em função dos diferentes períodos de abertura das flores utilizando-se o *software* Sisvar (Ferreira, 2015). Quando observadas diferenças significativas, foi aplicado o teste de Scott-Knott para comparação de médias.

4.3 Avaliação do efeito de diferentes condições e períodos de armazenamento de pólen sobre a germinação

Na terceira etapa, um novo experimento foi instalado, no qual foram coletadas flores em uma propriedade privada no município de João Pinheiro-MG. As flores coletadas no período definido na etapa anterior e os pólenes foram mantidos em meio de cultura, conforme a concentração definida na primeira avaliação. O experimento foi implantado em esquema fatorial de 4 x 3 x 4, sendo quatro diferentes métodos de armazenamento dos grãos de pólen (temperatura ambiente 22° C, refrigerador 9° C, freezer -4° C e congelador -15° C), em quatro períodos de armazenamento (10,20,30,40) totalizando quarenta dias, divididos em quatro repetições. Após os diferentes períodos de armazenamento, executaram-se avaliações da viabilidade dos grãos de pólen utilizando dois métodos: avaliação *in vitro* em meio de cultura (conforme metodologia descrita acima).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração do meio de cultura e dessecação dos grãos de pólen de tomate

A análise de variância realizada para a porcentagem do grão de pólen germinado, em função da concentração do meio de cultura e da dessecação, mostrou resultados significativos para interação desses dois fatores (Apêndices 1 e 2), havendo o efeito de desdobramento da secagem do pólen nas diferentes concentrações testadas.

Na Tabela 1, podem ser observados os valores médios para a porcentagem da germinação de grãos de pólen encontrados em cada concentração e tipo de secagem, bem como o resultado do teste de média de Scott-knott (1974).

Tabela 1 - Valores médios para porcentagem de germinação de grãos de pólen de tomate em função de diferentes concentrações de sacarose do meio de cultura e da secagem.

| SECAGEM | CONCENTRAÇÕES | | |
|---------------|---------------|----------|-----------|
| | 5% | 10% | 15% |
| SECO | 0,4333 a | 2,5655 a | 10,3333 a |
| FRESCO | 76,70 b | 8,6333 a | 76,8322 b |

Fonte: Arquivo do autor (2023).

*médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Observa-se, portanto, que, nas concentrações 5 e 15%, foram observadas diferenças significativas para o tipo de pólen utilizado, sendo que o pólen fresco apresentou uma germinação consideravelmente superior à germinação obtida no pólen dessecado. Para a concentração de 10%, não houve diferença para o tipo de pólen utilizado, no entanto é possível verificar que os valores foram consideravelmente inferiores aos observados nas outras concentrações, o que, possivelmente, indica a ocorrência de algum erro experimental.

O erro experimental pode ter advindo do pólen coletado de flores com diferentes idades de abertura, motivo pelo qual se realizou a segunda etapa do trabalho em relação à determinação do período de abertura da flor para coleta do pólen. Embora a interação entre os fatores concentração e o tipo de pólen utilizado (fresco e seco) tenha sido significativa, esperava-se que a concentração interferisse na germinação, uma vez que o resultado da maior concentração foi semelhante ao da menor concentração. Por esta razão, optou-se por dar sequência ao trabalho com a concentração de 10% de sacarose.

Como descrito, o meio de cultura com a constituição de 10 gramas por litro de ágar, 100 gramas por litro de sacarose e 0,004 gramas por litro de ácido bórico, e o pH do meio ajustado para 7,0, mesmo não sendo o melhor meio, mostraram-se satisfatórios para a avaliação da germinação *in vitro* do grão de pólen, pois possibilitaram a visualização e a contagem dos grãos de pólen germinados e o estabelecimento do percentual de viabilidade. Isso possibilitará o norteamento de futuras pesquisas de conservação do grão de pólen.

Em função de resultados obtidos em outros trabalhos, possivelmente, existe um nível ideal para se determinar as concentrações de sais e nutrientes de um meio de cultura para germinação de cada espécie (OLIVEIRA, 2012).

A utilização do meio com a concentração de 10% de sacarose foi o método adotado com base em alguns trabalhos que citam, para mamoneira (*Ricinus communis L.*), sua constituição como 10 gL⁻¹ de ágar, 100 gL⁻¹ de sacarose, 0,004 gL⁻¹ de ácido bórico e pH 6,0 (CUCHIARA, 2012). Para a cultura do milho (*Zea mays*), o percentual ideal da constituição é 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico e 0,15% de cloreto de cálcio (FERREIRA *et al.*, 2007). De acordo com Andrade *et al.*, 2019, para a germinação *in vitro* de grãos de pólen para café (*Coffea canephora*), a concentração de sacarose 10% atingiu seu máximo de 95% de viabilidade. Outro resultado mostra que, para a cultura do marmeleiro (*Cydonia oblonga Mill*), o percentual ideal mostrou-se diferente, apresentando 68 gramas por litro de sacarose e 366 mg por litro de ácido bórico, sendo o pH aferido para 5,8 (ZAMBON, 2007).

No método utilizado para dessecação dos grãos de pólen, observou-se diferença estatística entre os valores encontrados, sendo que o percentual de viabilidade do pólen fresco

foi de 76,7 % e, após a secagem, 0,43%. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a dessecação afetou a germinação *in vitro* do grão de pólen de tomate, diminuindo consideravelmente sua viabilidade. Entretanto, mais estudos devem ser realizados, visando possibilitar a avaliação de diferentes tempos e técnicas de secagem e determinar o grau de umidade considerado ótimo para o armazenamento do grão de pólen.

Para algumas culturas, como berinjela (*Solanum melongena*), observou-se um excelente pegamento de frutos, independentemente da utilização de pólen recém-extraído ou seco. Os grãos de pólen com 47,2% de umidade ou secos a 4,7% proporcionaram 90% de pegamento de frutos, enquanto, nos demais teores de umidade, o pegamento de frutos foi de 100% (FRANÇA, 2010). Na cultura do maracujazeiro, a utilização do dessecador no armazenamento do fruto prejudicou a germinação do pólen (BRUCKNER *et al.*, 2000).

5.2 Período de abertura da flor para coleta de pólen

A análise estatística realizada indicou diferença significativa para o número de dias para a abertura da flor (Apêndice 3). Na Tabela 2, podem ser observadas as médias dos tratamentos realizados para se definir o melhor dia de coleta das flores.

Notou-se que, no primeiro dia, os pólenes coletados apresentaram uma taxa de germinação de 56,6%; no segundo dia, 58,6%; no terceiro, 76%; e, no quarto e último dia de avaliação, 57% (Tabela 2). A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o terceiro dia é o melhor para a realização da coleta das flores e retirada dos grãos de pólen do tomateiro.

Tabela 2- Valores médios de porcentagem de germinação de grãos de pólen de tomate em função de diferentes períodos de extração de pólen após a abertura da flor.

| Dias após a coleta das flores | Germinação de grão de pólen (%) |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 56.666 a |
| 2 | 58.666 a |
| 3 | 76.000 b |
| 4 | 57.333 a |

Fonte: Arquivo do autor (2023).

*médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferiram estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Para a coleta realizada no terceiro dia após a abertura da flor, houve uma maior taxa de germinação, sendo que os demais tratamentos (um, dois e quatro dias após a coleta das flores) apresentaram valores inferiores e iguais estatisticamente.

De acordo com Bruckner & Horst, 2000, para a cultura do maracujazeiro, o pólen coletado no dia da antese apresentou 58,30% de germinação, prejudicando o armazenamento dele, não havendo uma literatura específica que determina qual o melhor dia de coleta de flores para retirada do pólen. Alguns trabalhos citam apenas que o período da manhã é o ideal para a coleta. Em *Passifloras oriundos*, a coleta do pólen nas primeiras horas da manhã, às 8 horas, e na antese, proporcionou maior percentagem de germinação e viabilidade do pólen (SIQUEIRA, *et al.*, 2009).

5.3 Avaliação do efeito de diferentes condições e períodos de armazenamento de pólen sobre a germinação

Como observado no Apêndice 5, a análise do desdobramento dos diferentes ambientes dentro de cada uma das datas analisadas mostrou que, nos ambientes refrigerador, congelador e freezer, houve diferença significativa, exceto no último período de armazenamento (Ambiente).

Na Tabela 3, podem ser observados os valores médios de porcentagem de germinação dos grãos de pólen observados para os diferentes ambientes dentro de cada um dos períodos analisados.

Tabela 3- Valores médios da porcentagem de germinação de grãos de pólen de tomate em função de diferentes períodos e ambientes de armazenamento

| Recipientes | Dias de armazenamento | | | |
|---------------------|-----------------------|---------|---------|---------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 |
| Refrigerador | 3.983 b | 4.781 b | 5.574 b | 1.259 b |
| Congelador | 0.000 a | 2.519 b | 0.000 a | 0.000 a |
| Freezer | 2.372 b | 3.386 b | 0.000 a | 0.000 a |
| Ambiente | 0.000 a | 0.000 a | 0.000 a | 0.000 a |

Fonte: Arquivo do autor (2023).

Como pode ser observado, houve diferença estatística entre os diferentes ambientes utilizados para o armazenamento em todos os períodos, exceto aos quarenta dias de armazenamento. No entanto, apesar da germinação ter ocorrido em valores superiores até os trinta dias de armazenamento, verificaram-se valores muito baixos.

No período de dez dias de armazenamento, o refrigerador e o congelador foram os que apresentaram algum percentual de germinação, sendo superiores aos demais. No segundo período de armazenamento, aos vinte dias, observou-se que apenas a temperatura ambiente foi

inferior aos demais, não havendo germinação desta nem, posteriormente, diferença estatística entre o refrigerador, congelador e freezer. Já no período de trinta dias, o refrigerador foi o único ambiente que apresentou algum nível de germinação. Para o maior período de armazenamento, aos quarenta dias de armazenamento, foi encontrada uma pequena diferença estatística, havendo uma pequena taxa de germinação no refrigerador.

Embora tenha sido observada uma diferença estatística entre os tratamentos, notou-se que a porcentagem de germinação em todos os ambientes foi consideravelmente baixa, não sendo encontrados valores que se mostrassem eficientes para um possível armazenamento e utilização posterior destes pólenes. Isso indica a necessidade de realização de novos trabalhos, visando à adequação de um ambiente e um período de armazenamento para a cultura do tomate.

Trabalhos como o de Gomez *et al.* (2000) e Siregar & Sweet (2000) mantiveram grãos de pólen de amendoeira (*Prunus dulcis*) e de *Pinus spp.*, respectivamente, armazenados a 4° C por vários meses. Os autores observaram um decréscimo de viabilidade, porém não foi tão prejudicial como os observados no presente trabalho. Para a cultura da mamoneira (*Ricinus communis L.*), os grãos de pólen mantidos a -18 °C revelaram maior porcentagem de germinação em relação àqueles armazenados a 4 °C, em que foi notada uma viabilidade de 7,93% na quinta semana de conservação (CUCHIARA, 2012).

Evidenciou-se que, para a preservação do pólen de laranja (*Citrus sinensis*), a temperatura ambiente não foi uma boa técnica de armazenamento, sendo que a viabilidade caiu rapidamente e não passou da terceira semana (PIO, 2007). De acordo com Gomes *et al.* (2000); Oliveira *et al.* (1995) e Vaknin & Eisikowitch (2000), a viabilidade de grãos de pólen, armazenados em temperatura ambiente, pode ser mantida apenas em curto prazo, ou seja, até, no máximo, 30 dias.

Para as condições de armazenamento em freezer, os grãos de pólen de laranja (*Citrus sinensis*) apresentaram uma maior porcentagem de germinação em relação à temperatura ambiente e refrigerador (PIO, 2007). Em resumo, no que diz respeito à viabilidade do pólen em cada época de armazenamento, é observado que o pólen de *Citrus sinensis*, armazenado em temperatura ambiente, perde a sua viabilidade rapidamente, diferentemente daquele acondicionado em freezer, o qual permanece viável por um maior período. Porém, ainda assim, houve uma redução com o tempo de conservação, sendo menos intensas para aqueles tratamentos em que foram utilizados dessecadores.

A partir dos resultados, verificou-se o efeito de diferentes condições e períodos de armazenamento de pólen sobre a germinação.

6 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, pode-se concluir que a metodologia proposta não conseguiu cumprir o objetivo geral, que foi estabelecer diferentes métodos de armazenamento e conservação de grãos de pólen de tomate. Entretanto, alguns aspectos precisam ser considerados e novos estudos devem ser feitos, a fim de diminuir alguns erros experimentais encontrados ao longo do trabalho.

No que diz respeito à tolerância à dessecação e ao meio de cultura estabelecido para germinação, conclui-se que o pólen de tomate, dessecado nas condições em que foi testado, não se manteve viável, ao contrário do pólen fresco, que se manteve viável, possibilitando sua visualização e contagem.

Dentre as variáveis que possam ter interferido nos resultados encontrados, está a idade das flores, sendo que, para esse achado, concluiu-se que o terceiro dia foi considerado o melhor para a realização da coleta das flores e retirada dos grãos de pólen do tomateiro.

Para a avaliação do armazenamento do pólen em diferentes temperaturas e tempo, infere-se que as porcentagens de germinação, em todas as variáveis, foram baixas, não sendo recomendada sua utilização para esse fim.

Por fim, salienta-se que mais pesquisas devem ser realizadas para se chegar a um achado final sobre a melhor temperatura e tempo de armazenamento. Contudo, o presente trabalho serve de base para futuras pesquisas nessa área.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant pathology 5th edition: Elsevier academic press. Burlington, Ma. USA, p. 79-103, 2005..
- ANDRADE, Taynara Rodrigues et al. Percentual de germinação de grãos de pólen de *C. canephora* em diferentes concentrações de sacarose. 2019.
- BAJAJ, YPS Criopreservação de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais para a conservação de germoplasma e biodiversidade. Springer Berlin Heidelberg, 1995.
- BISPO, S.A.; ROSELINO, A.C.; HRNCIR, M.; BEGO, L.R. Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 2, p. 751-757, 2009.
- BRUCKNER, Claudio Horst et al. Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. 2000.
- BOITEUX, Leonardo S. et al. 'Brasileirinha': cultivar de abóbora (*Cucurbita moschata*) de frutos bicolors com valor ornamental e aptidão para consumo verde. *Horticultura Brasileira*, v. 25, p. 103-106, 2007.
- CHIARI, W.C.; TOLEDO, V.A.A.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; TAKASUSUKI, M.C.C.R.; TOLEDO, T.C.S.O.A.; LOPES, T.S. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.
- CROSATTI, Plant reproduction: from floral induction to pollination" Cap 5, ditora Springer. 2018.
- CUCHIARA, SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos; BOBROWSKI, Vera Lucia. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. *Revista Ceres*, v. 59, p. 82-87, 2012.
- DA SILVA FILHO, José Getúlio; TORRES, Antônio Carlos; BOITEUX, Leonardo Silva. Conservação de grãos de pólen de tomate a baixas temperaturas. 2007.
- DEL SARTO, M. C. L.; PERUQUETTI R. C., CAMPOS, L. A. O. Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, v. 98, n. 2, p. 260-266, 2005.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(S1), 5-16, 2011.
- FAO. Conservation and sustainable use of plant genetic resources for food and agriculture, 2014.
- FAO. Tomato. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, 2019.
- FERREIRA, D. F. Sisvar. Versão 5.6. Lavras: UFLA/DEX. 2015.

FLAWN, Louis N.; DO CARMO CARY, Maria. O cultivo do tomate. 1997

FRANÇA, Leomara Vieira De et al. Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. Revista Brasileira de Sementes, v. 32, p. 53-59, 2010.

FREITAS, B.M. The pollination efficiency of foraging bees on apple (*Malus domestica* Borkh) and cashew (*Anacardium occidentale* L.).197f. Tese (Doutorado em Apicultura) University of Wales, Cardiff, Grã-Bretanha, 1995.

GIORDANO, L.B.; SILVA, C. Hibridação em Tomate. In: Borém, A. (Ed). Hibridação Artificial de plantas. Viçosa:UFV. p. 463-480, 1999.

GOMEZ P, Gradziel TM, Ortega E & Dicenta F. Short term storage of almond pollen. HortScience, 35:151-152, 2000.

HESLOP-HARRISON, J. and HESLOP-HARRISON, Y. Pollen: Development and Physiology. eLS, John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0027427>, 2018.

KAJIURA, Ichiro et al. Improvement of sugar content and composition in fruits, and classifications of East Asian pears by the principal component analysis of sugar compositions in fruits. Japanese Journal of Breeding, v. 29, n. 1, p. 1-12, 1979.

MAHESHWARI, P. Plant reproductive biology and biotechnology: A primer. Narosa Publishing House, 2005.

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

MWAI, G. N., Onyango, C. A., & Ombori, O. Hybridization and genetic diversity studies in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Kenya. International Journal of Plant Breeding and Genetics, 11(1), 1-10, 2017.

OLIVEIRA JÚNIOR, Influência do armazenamento na germinação de grãos de pólen de pessegueiro cv.Aurora.In: CONGRESSO DA PÓSGRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 8., 1995, Lavras. Anais. p.117, Lavras: UFLA, 1995.

PACINI, Ettore; FRANCHI, Giancarlo G.; RIPPA, Stefano. Pollen: structure and function. Switzerland: Springer, 2017.

PFAHLER, P.L. In vitro germination and pollentube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. II.Pollen source, calcium and boron interations.Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 46, p.235-240, 1968.

PIO, Leila Aparecida Salles et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 147-153, 2007.

ROSELINO, A.C.; BISPO DOS SANTOS, S.A.; BEGO, L.R. Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona*

quadrifasciata anthidioides Lepeletier 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille 1811) sob cultivo protegido. *Revista Brasileira de Biociência*, v. 8, n. 2, p. 154-158, 2010.

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

SHIVANNA, Kundaranahalli R.; SAWHNEY, VK *Biologia do pólen para produção e melhoramento agrícola*. Cambridge University Press, 1997.

SILVA, Andreia Cristina T. Ferreira; LEITE, Izabel Cristina; BRAZ, Leila Trevizan. Avaliação da viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 156-165, 2000.

SIREGAR IZ & Sweet GB. The impact of extraction and storage conditions on the viability of radiata pine pollen. *Silvae Genetica*, 49:10-14, 2000.

SIQUEIRA, et al. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, p. 1-12, 2009.

SNYDER, E.B.; CLAUSEN, K.E. Pollen handling. In: Schoomeyer, C.S. *Seeds of woody plants in the United States*. USDA Agricultural Handbook, Whashington: USDA. 1974. p.75-97.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. *Pollen:biology, biochemistry and management*. NewYork: Springer verlag, 172 p, 1974.

TAIZ, L., & Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. Artmed Editora, 2013.

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. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, New York, v. 56, p. 227-230, 1950.

VAKNIN, Y.; EISIKOWITCH, D. Effects of short term storage on germinability of pistachio pollen. *Plant Breeding*, Tel Aviv, v. 119, n. 4 p. 347-350, Aug. 2000.

VIEIRA, L. de J. et al. Conservação e longevidade de pólen de acessos de *Manihot esculenta*. In: *Embrapa Mandioca e Fruticultura-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 14.; FEIRA BRASILEIRA DA MANDIOCA, 1., 2011, Maceió. *Mandioca: fonte de alimento e energia: anais*. Maceió: ABAM: SBM, 2011.

WILLIAMS, Ted Eugene. *Self-timed rings and their application to division*. Stanford university, 1991.

ZAMBON, Carolina Ruiz et al. Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, p. 400-407, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE – 1 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DESSECAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN DE TOMATE

| FV | GL | SQ | QM | Fc Pr>Fc |
|--------------------|------------|--------------|------------------------|--------------|
| CONCENTRAÇÃO | 2 | 5109,403333 | 2554,701667 | 84,2640,0000 |
| SECAGEM | 1 | 9343,445000 | 9343,445000 | 308,1840,00 |
| CONCENTRA *SECAGEM | 2 | 6070,043333 | 3035,021667 | 100,1070,00 |
| erro | 12 | 363,813333 | 30,317778 | |
| Total corrigido | 17 | 20886.705000 | | |
| CV (%) = | 18.82 | | | |
| Média geral: | 29.2500000 | | Número de observações: | 18 |

Análise do desdobramento de SECAGEM dentro de cada nível de: CONCENTRAÇÃO

APÊNDICE – 2 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E DESSECAÇÃO DOS GRÃOS DE PÓLEN DE TOMATE

| FV | GL | SQ | QM | Fc Pr>Fc |
|-----------|----|-------------|-------------|----------------|
| SECAGEM/1 | 1 | 8724.906667 | 8724.906667 | 287.782 0.0000 |
| SECAGEM/2 | 1 | 55.206667 | 55.206667 | 1.821 0.2021 |
| SECAGEM/3 | 1 | 6633.375000 | 6633.375000 | 218.795 0.0000 |
| Erro | 12 | 363.813333 | 30.317778 | |

APÊNDICE– 3 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM FUNÇÃO DO PERÍODO DE ABERTURA DA FLOR PARA COLETA DE PÓLEN

| FV | GL | SQ | QM | Fc Pr>Fc |
|-----------------|------------|-------------|------------------------|--------------|
| DATA_DA_AB | 3 | 771.666667 | 257.222222 | 6.391 0.0161 |
| erro | 8 | 322.000000 | 40.250000 | |
| Total corrigido | 11 | 1093.666667 | | |
| CV (%) = | 10.21 | | | |
| Média geral: | 62.1666667 | | Número de observações: | 12 |

APÊNDICE – 4 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM FUNÇÃO DA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO DE PÓLEN SOBRE A GERMINAÇÃO

| FV | GL | SQ | QM | Fc Pr>Fc |
|-----------------|-----------|------------|------------------------|---------------|
| DATA | 3 | 33.565753 | 11.188584 | 6.873 0.0010 |
| TRATAMENTO | 3 | 105.237948 | 35.079316 | 21.549 0.0000 |
| Total corrigido | 47 | 229.717772 | | |
| CV (%) = | 85.49 | | | |
| Média geral: | 1.4924269 | | Número de observações: | 48 |

APÊNDICE – 5 TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA EM FUNÇÃO DA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONDIÇÕES E PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO DE PÓLEN SOBRE A GERMINAÇÃO

| FV | GL | SQ | QM | Fc Pr>Fc |
|------------------|-----------|------------|-----------|--------------------|
| DATA | 3 | 33.565753 | 11.188584 | 6.873 0.0010 |
| TRATAMENTO | 3 | 105.237948 | 35.079316 | 21.549 0.0000 |
| DATA *TRATAMENTO | 9 | 38.821881 | 4.313542 | 2.650 0.0203 |
| erro | 32 | 52.092190 | 1.627881 | |