



MIRIÃ CRISTINA PEREIRA FAGUNDES

**CONSERVATION AND VIABILITY OF DRAGON FRUIT
(*Hylocereus polyrhizus* WEBER) POLLEN GRAINS**

**LAVRAS – MG
2017**

MIRIÃ CRISTINA PEREIRA FAGUNDES

**CONSERVATION AND VIABILITY OF DRAGON FRUIT (*HYLOCEREUS
POLYRHIZUS WEBER*) POLLEN GRAINS OF**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José Darlan Ramos
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria do Céu Monteiro Cruz
Pesq. Dr. Adelson Francisco de Oliveira
Coorientadores

**LAVRAS - MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

Fagundes, Miriã Cristina Pereira.

Conservation and viability of dragon fruit (*Hylocereus
polyrhizus* Weber) pollen grains / Miriã Cristina Pereira Fagundes. -
2017.

48 p.

Orientador(a): José Darlan Ramos.

Coorientador(a): Adelson Francisco de Oliveira, Maria do Céu
Monteiro da Cruz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Armazenamento. 2. Baixas temperaturas. 3. Cultura de
tecidos. I. Ramos, José Darlan. II. Oliveira, Adelson Francisco de.
III. Cruz, Maria do Céu Monteiro da. IV. Título.

MIRIÃ CRISTINA PEREIRA FAGUNDES

**CONSERVATION AND VIABILITY OF DRAGON FRUIT (*Hylocereus polyrhizus*
WEBER) POLLEN GRAINS**

**CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DE PITAIA (*Hylocereus*
polyrhizus WEBER)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 25 de maio de 2017.

Dr. Ângelo Albérico Alvarenga EPAMIG

Dr^a. Fabíola Villa UNIOESTE

Dr. José Carlos Moraes Rufini UFSJ

Dr. Moacir Pasqual UFLA

Prof. Dr. José Darlan Ramos
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

À minha mãe, Maria, pelo apoio e carinho em todas as etapas, e por ser o meu maior exemplo de vida. Aos meus familiares, em especial aos meus avós e à minha irmã Sirlene (in memoriam).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me guiando nos caminhos por mim escolhidos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado e ampliação dos meus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À FAPEMIG, pelo auxílio financeiro, principalmente na instalação e manutenção do experimento original.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe, pelo grande carinho, companhia, amizade e conselhos nas horas mais difíceis.

Ao professor e orientador Dr. José Darlan Ramos, pela orientação, compreensão, ensinamentos e amizade ao longo desses anos.

Aos professores do Departamento de Agricultura, pela atenção, ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência.

Aos membros da banca pela disponibilidade e pelas valiosas sugestões.

A todos os funcionários do Setor de Fruticultura com as quais tive o prazer em trabalhar e fazer grandes amizades.

A todos os amigos e colegas da universidade, que nestes anos estiveram ao meu lado, somando alegrias e aprendizados.

OBRIGADA A TODOS!

“Toda manhã na África, a gazela acorda. Ela sabe que precisa correr mais rápido que o mais rápido dos leões para sobreviver. Toda manhã um leão acorda. Ele sabe que precisa correr mais rápido que a mais lenta das gazelas senão morrerá de fome. Não importa se você é um leão ou uma gazela. Quando o sol nascer, comece a correr.”

(Provérbio Africano)

RESUMO

A pitiaia é uma frutífera exótica e promissora no Brasil, principalmente devido as suas características organolépticas. Os frutos, além do sabor agradável, são ricos em vitaminas, minerais, ácidos graxos essenciais, dentre outros benefícios. Apesar de sua expansão, são poucas as pesquisas com a cultura no Brasil. Além de estudos com relação ao manejo, são necessários estudos inerentes à biologia reprodutiva, principalmente acerca da viabilidade e conservação dos grãos de pólen, importante ferramenta nos programas de melhoramento. O objetivo dessa pesquisa foi estabelecer um meio de cultura adequado para a germinação *in vitro* e avaliar o poder germinativo dos grãos de pólen de pitiaia de polpa vermelha, após armazenamento a baixas temperaturas. No primeiro experimento, para a determinação do meio, foram instalados quatro experimentos de forma sequencial: I) Ágar (6, 8 e 10 g L⁻¹) e pH (5,6 e 7); II) Sacarose (0, 25, 50, 75, 100 e 125 g L⁻¹); III) Nitrato de cálcio (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹); IV) Ácido bórico (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹), todos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Foram avaliados comprimento do tubo polínico e porcentagem de germinação dos grãos pólen. Conclui-se que o meio para a germinação de grãos de pólen de pitiaia deve ser acrescido de 100 g L⁻¹ de sacarose, 518 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio e 636 mg L⁻¹ de ácido bórico, sendo o pH aferido para 5 e o meio solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar. A concentração de 500 mg L⁻¹ de ácido bórico propicia maiores comprimentos do tubo polínico. No segundo experimento, os grãos de pólen foram mantidos nas seguintes condições de armazenamento: T1, refrigerador (4 °C); T2, freezer (-20 °C) e T3, ultra-freezer (-80 °C), durante um período de oito semanas. A avaliação da viabilidade deste pólen foi realizada aos (7, 15, 30, 45 e 60 dias) por meio do teste de germinação *in vitro*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 5 (3 temperaturas x 5 tempo) com quatro repetições. As condições de armazenamento sob refrigerador (4 °C) e freezer (-20 °C) são recomendadas para a conservação a curto prazo, já o ultra-freezer (-80 °C), promoveu uma melhor viabilidade polínica a longo prazo.

Palavras-chave: Biotecnologia. Armazenamento. Baixas temperaturas. Cultura de tecidos.

ABSTRACT

The dragon fruit is an exotic and promising fruit in Brazil, mainly due to its organoleptic characteristics. The fruits beyond the pleasant taste are rich in vitamins, minerals, essential fatty acids, among other benefits and advantages. However, despite its expansion, there are only a few researches about dragon fruit in Brazil. In addition to studies on management, it is necessary to study the reproductive biology, especially about the viability and conservation of pollen grains, an important tool in breeding programs. The objective of this research was to establish a suitable culture medium for *in vitro* germination and to evaluate the germinative power of red pulp dragon fruit pollen grains after storage at low temperatures. In the first experiment for the determination of the medium were installed four experiments sequentially: I) Agar (6, 8 and 10 g L⁻¹) and pH (5, 6 and 7); II) Sucrose (0, 25, 50, 75, 100 and 125 g L⁻¹); III) Calcium nitrate (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹); IV) Boric acid (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹), all in a completely randomized design with four replications. Pollen tube length and percentage of germination of pollen grains were evaluated. It is concluded that the medium for the germination of dragon fruit pollen grains should be increased by 100 g L⁻¹ sucrose, 518 mg L⁻¹ calcium nitrate and 636 mg L⁻¹ boric acid, the pH being measured to 5 and the medium solidified with 6 g L⁻¹ agar. The concentration of 500 mg L⁻¹ of boric acid gives higher pollen tube lengths. In the second experiment the pollen grains were kept under the following storage conditions: T1, refrigerator (4 °C); T2, freezer (-20 °C) and T3, ultra-freezer (-80 °C), over a period of eight weeks. The evaluation of the viability of the pollen was performed (7, 15, 30, 45 and 60 days) by *in vitro* germination test. The experimental design was completely randomized, in a factorial arrangement 3 x 5 (3 temperatures x 5 time) with four replications. Storage conditions under refrigerator (4 °C) and freezer (-20 °C) are recommended for short-term storage and the ultra-freezer (-80 °C) has promoted better long-term pollen viability.

Keywords: Biotechnology. Storage. Low temperatures. Tissue culture.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIALTEÓRICO	14
2.1	A cultura da pitaia	14
2.2	Estrutura floral da pitaia	15
2.3	Polinização e fertilização	15
2.3.1	Polinização da pitaia.....	16
2.4	Grão de pólen e sua importância para o melhoramento genético de plantas	17
2.5	Testes de verificação da viabilidade do grão de pólen.....	19
2.5.1	Procedimento fluorocromático (FCR)	20
2.5.2	Testes de conteúdo celular com corantes.....	20
2.5.3	Germinação em meio artificial	20
2.6	Fatores que interferem na conservação dos grãos de pólen	21
	REFERÊNCIAS.....	24

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 - *In vitro* germination of pollen grains of *hylocereus polyrhizus* weber..... 29

1	INTRODUCTION	29
2	MATERIAL AND METHODS	30
2.1	Determination of the culture medium	31
2.2	Number of pollen grains per anther and per flower	31
2.3	Germination percentage.....	31
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	32
3.1	Number of pollen grain per anther per flower	32
3.2	Germination percentage.....	33
4	CONCLUSIONS.....	37
	REFERENCES	38

ARTIGO 2 - Condições de armazenamento de grãos de pólen de pitaia de polpa vermelha (*hylocereus polyrhizus* weber)40

1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43

4	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A pitaia (*Hylocereus polyrhizus* Weber) é originária do México e seu cultivo vem se destacando no Brasil nos últimos anos. Estudos mostram que os frutos de pitaia apresentam elevados teores de compostos com capacidade antioxidante, apresentando grande potencial comercial (DEMBITSKY et al., 2011).

De acordo com a espécie, seus frutos podem apresentar diferentes características, tais como: tamanho, formato, cor, além de características físico-químicas (PRIATNI; PRADITA, 2015).

As flores da pitaia são monóicas, grandes (cerca de 30 cm de comprimento), aromáticas e brancas. Para se produzir de forma satisfatória, é essencial que ocorra polinização, seja ela por agentes polinizadores ou artificialmente. O florescimento ocorre durante a noite, e as flores se abrem uma única vez, um dos motivos que podem causar significativa queda dos botões florais, pois nem sempre, os produtores conseguem realizar a polinização noturna, sendo necessários estudos referentes à conservação e armazenamento do pólen para que as flores possam ser polinizadas durante o dia.

O armazenamento do grão de pólen de pitaia é uma importante ferramenta nos programas de melhoramento, uma vez que visa evitar o processo de envelhecimento e manter a viabilidade máxima do pólen para uso posterior. Pelo fato de ser uma frutífera com alta procura no mercado e com baixa porcentagem de frutificação efetiva, faz-se necessário obter informações a respeito do estudo do grão de pólen da pitaia, que é uma ferramenta importante para estudos e programas de melhoramento genético e trabalhos sobre a biologia reprodutiva, pois, cada grão de pólen, leva consigo os materiais genéticos resultantes da recombinação (SOUZA; PEREIRA; MARTINS 2002).

Vários métodos podem ser utilizados para se obter informações sobre a viabilidade polínica, dentre eles, a germinação *in vitro* é o mais conveniente e recomendado, pois, segundo Marcellán e Camadro (1996), este revela a condição das membranas, o verdadeiro estado das reservas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar. Além disso, é o método mais utilizado nos programas de melhoramento genético. Por esse fato, várias pesquisas têm sido realizadas, a fim de estabelecer meios de cultura e condições ambientais para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen de várias espécies (NUNES et al., 2001).

Além de estimar a viabilidade polínica do pólen fresco, é importante realizar estudos acerca do armazenamento de grãos de pólen, pois essa é uma ferramenta requerida por várias situações nos programas de melhoramento, como possibilitar a sincronia artificial entre a

dispersão de pólen com a receptividade floral, já que o pólen pode ser empregado a qualquer tempo e, também, para complementar a ação de agentes polinizadores pouco eficientes ou mesmo inexistentes (TIGHE, 2004). Outros fatores proporcionados pela conservação do pólen são: a preservação de germoplasma, o desenvolvimento de pesquisas com pólen, a promoção de intercâmbio de germoplasma e melhoria da eficiência dos programas de melhoramento (HANNA, 1994).

Para preservação do material genético, o armazenamento do grão de pólen consiste em conservar material para futura utilização e, proporcionar ao material, condições de forma a manter o poder germinativo, vigor e integridade genética originais (WANG, 1975). A redução do teor de umidade é um procedimento geralmente empregado para o armazenamento de grãos de pólen a fim de evitar oscilações no potencial germinativo (PIO et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho, estabelecer um meio de cultura adequado para a germinação *in vitro* e avaliar o poder germinativo dos grãos de pólen de pitaia de polpa e exocarpo vermelho, após armazenamento a baixas temperaturas.

2 REFERENCIALTEÓRICO

2.1 A cultura da pitiaia

Frutas exóticas como a pitiaia (*Hylocereus* sp.) têm apresentado boa aceitação para consumo *in natura*, não apenas pelo exotismo de sua aparência, mas também em virtude de suas características sensoriais. Os preços praticados nos mercados regional, nacional ou internacional, estimularam a expansão e a intensificação do cultivo da pitiaia em diferentes sistemas de plantio. No México, Nicarágua, Malásia, Vietnã, Israel, e mesmo no Brasil, a produção se dá, predominantemente, em pequenos cultivos, e a comercialização está restrita a mercados com maior poder aquisitivo (ESTELLENA, 2013; ORTIZ-HERNÁNDEZ; CARRILLO-SALAZAR, 2012).

Dependendo da espécie, os frutos da pitiaia apresentam características diversificadas, dentre as quais podem ser citadas *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton e Rose (frutos com casca vermelha e polpa branca), *Hylocereus costaricensis* e *Hylocereus polyrhizus* (frutos com casca vermelha e polpa vermelha), *Selenicereus megalanthus* (K. Schum ex Vaupel) (frutos com casca amarela com espinhos e polpa branca) e *Selenicereus setaceus* (Rizz.) (frutos com casca vermelha com espinhos e polpa branca) (NERD; TEL-ZUR; MIZRAHI, 2002).

A propagação da cultura pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. No entanto, a maneira mais viável é a assexuada, pela técnica da estaquia, devido à planta gerada manter as mesmas características da planta mãe (clone), bem como a precocidade na produção dos frutos. A propagação sexuada ou seminífera também é viável (SILVA, 2006), pois os frutos possuem uma grande quantidade de sementes cerca de 1060, 6 (MENEZES, 2013) com alta taxa de germinação. Porém, esse tipo de propagação ocasiona lento desenvolvimento das plantas, além da ocorrência de elevada variabilidade genética, prejudicial em pomares comerciais.

No Brasil, a pitiaia tem sido considerada uma fruta exótica, apesar de serem encontradas espécies de pitiaia nativas no Cerrado e matas de transição, principalmente espécies do gênero *Selenicereus* e *Hylocereus* (JUNQUEIRA et al., 2002).

Os frutos possuem polpa rica em fibras com excelentes qualidades digestivas e de baixo teor calórico. Atualmente, no Brasil, algumas áreas têm se destacado pelo seu cultivo, tais como o Sul de Minas Gerais, onde é produzida a pitiaia vermelha de polpa branca e o interior paulista, onde se cultiva principalmente a pitiaia vermelha.

Outro fator importante no cultivo da pitaia é que a cultura traz um rápido retorno econômico, pois, dependendo, produz logo no primeiro ano após o plantio (LE BELLEC VAILLANT; IMBERT, 2006; ZEE; CHUNG-RUEY; NISHINA, 2004) e, sua produção, pode alcançar 20 t ha⁻¹ no quinto e sexto ano, mantendo esta regularidade por 15 a 20 anos (HESSEN; TELLEZ, 1995).

2.2 Estrutura floral da pitaia

Nos caules da planta de pitaia se encontram aréolas constituídas de gemas axilares, espinhos e pelos, de onde surgem flores, frutos e ramificações, sendo que os espinhos são modificações da folha, ao longo da evolução, para reduzirem a superfície de evaporação, ajudando a reter água no seu interior (PAULA; RIBEIRO, 2004).

As flores dessa planta, classificada como cactácea, são monóicas com aproximadamente 30 cm de comprimento, aromáticas e brancas (Figura 1), com os botões florais formados pouco antes da antese, apresentando um rápido desenvolvimento, com flores que possuem abertura uma única vez, ocorrendo durante a noite (DONADIO, 2009).

Figura 1 – Flores de pitaia totalmente abertas.



Fonte: SANTOS (2017).

2.3 Polinização e fertilização

Com os grãos de pólen liberados, a germinação ocorre rapidamente, quando em contato com os pelos viscosos do estilo-estigma. O tempo necessário, desde a polinização até a fertilização, depende da temperatura, da umidade e da constituição genética da planta (GOODMAN; SMITH, 1987).

A germinação do grão de pólen consiste na emissão do tubo polínico. Numa das

extremidades fica uma massa viscosa ou citoplasma, com três núcleos. Um desses, chamado vegetativo, é responsável pelo funcionamento dessa ponta apical. Os outros dois núcleos são generativos, que somente entram em ação no processo de fertilização (CHANG; NEUFFER, 1992).

Os tubos polínicos germinam e crescem, inicialmente, com base nas substâncias de reserva contidas no próprio grão de pólen, ficando depois dependente, para a sua própria nutrição, do estilo-estigma, no qual eles se desenvolvem. A direção do seu crescimento é orientada por um mecanismo quimiotrópico e, especialmente quando ele passa do estilo-estigma para a cavidade do ovário, e são substâncias produzidas por células de cada ovário que atraem o tubo polínico para o óvulo. Existem diferenças da taxa de crescimento desses tubos durante todo o seu percurso, as quais são controladas por genes denominados gametofíticos (BRIEGER; BLUMENSCHNEIN, 1966).

Quando a ponta do tubo atinge a micrópila, se desenvolve entre as células do tecido nucelar até atingir o saco embrionário. Na entrada do saco embrionário, a extremidade se rompe, liberando os dois núcleos generativos. Um dos dois núcleos se funde com a oosfera formando o zigoto, enquanto o outro núcleo se funde com os dois núcleos polares, estabelecendo o núcleo primário do endosperma.

2.3.1 Polinização da pitaia

O estudo da polinização de pitaias ainda é incipiente, e o fato de existirem trabalhos que não corroboram os mesmos fatos, são necessários mais estudos, principalmente com as pitaias vermelhas de polpa branca e vermelhas, que são as principais cultivadas no Brasil.

Para se produzir pitaia de forma satisfatória, é essencial que ocorra a sua polinização, seja ela por agentes polinizadores, como borboleta e morcego, seja artificialmente. A polinização ocorre comumente durante a noite, na medida em que as flores vão se abrindo (PUSHPAKUMARA; GUNASENA; KARIAYAWASAM, 2005).

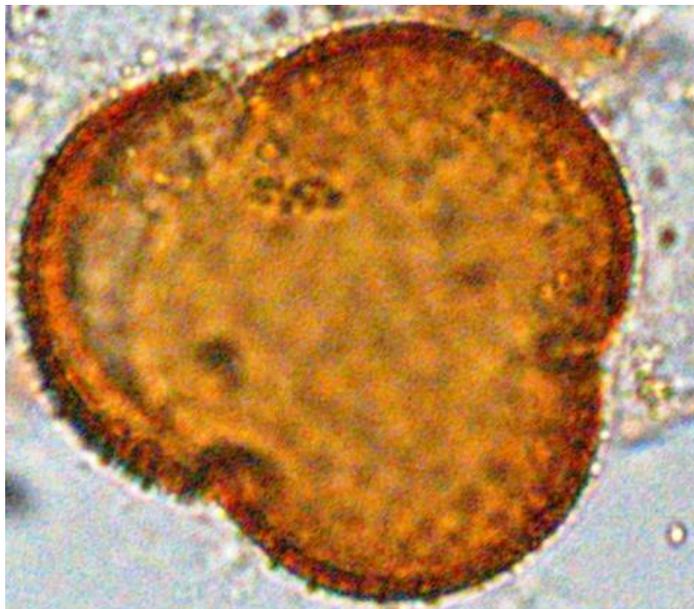
Em trabalho realizado por Silva et al. (2011), avaliando a qualidade de frutos de pitaia em função da época de polinização, da fonte de pólen e coloração da cobertura, não verificou-se frutificação nas flores autopolinizadas, indicando autoincompatibilidade. Por outro lado, os mesmos autores obtiveram 100% de frutificação em plantas que sofreram polinização cruzada. Pushpakumara, Gunasena e Kariyawasam (2005), em estudo conduzido em Sri Lanka, obtiveram 100% de frutificação em flores autopolinizadas, resultado também obtido em estudo realizado por Lone, Takahashi e Faria (2010).

A polinização cruzada e autopolinização em pitaia (*Hylocereus undantus*) foi estudada por Menezes et al. (2015), em duas épocas, e sua influência sobre a qualidade de fruto em pitaia vermelha de polpa branca, os autores constataram que ocorreu variação na porcentagem de polinização, quando se comparou os dois tipos de polinização, tanto em janeiro, quanto em abril, evidenciando que a polinização é altamente influenciada pelas condições ambientais.

2.4 Grão de pólen e sua importância para o melhoramento genético de plantas

O grão de pólen é uma estrutura microscópica de coloração amarelada que apresenta número haploide de cromossomos e dará origem ao gameta masculino (Figura 2). É formado nas anteras, em estruturas chamadas sacos polínicos que contêm as ‘células-mãe’ dos grãos de pólen; cada uma sofre meiose e origina quatro micrósporos, que sofrerão modificações morfológicas, transformando-se em grão de pólen adulto. O núcleo do pólen sofre mitose, resultando em dois núcleos, um reprodutivo e outro vegetativo. O núcleo reprodutivo originará dois microgametas e o vegetativo formará o tubo polínico (VIDAL; VIDAL, 1995).

Figura 2 – Grão de pólen de pitaia de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus* Weber). Aumento 100x.



Fonte: Da Autora (2017).

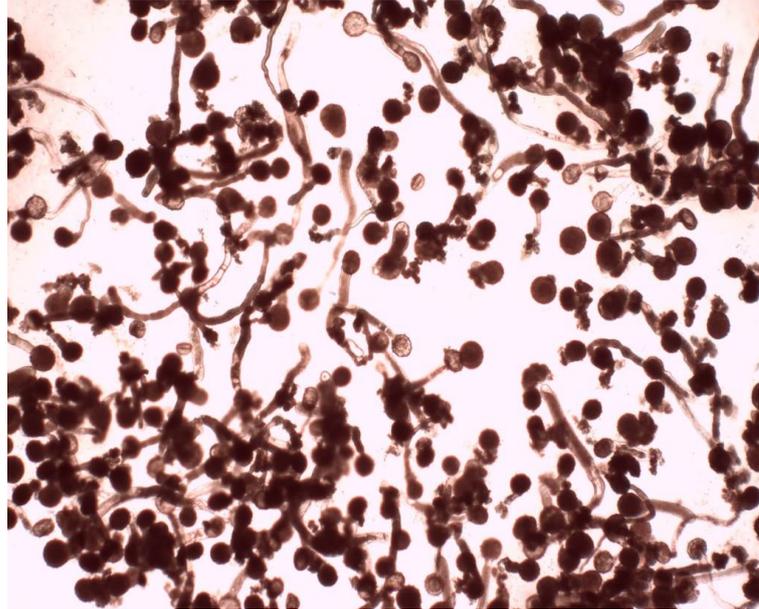
O período de formação do tubo polínico é controlado por substâncias naturais de crescimento, as quais incluem tanto promotores quanto inibidores (CARVALHO, 1983). A emissão do tubo polínico é estimulada por meio de componentes químicos, como água destilada, ácido bórico, ácido nítrico, nitrato de cálcio, sulfato de magnésio, sacarose e nitrato de potássio (KWACK; BREWBAKER, 1963; PFAHLER, 1967).

A hibridação controlada no campo, e a posterior avaliação das progênies, é a técnica mais utilizada na obtenção de novas cultivares. A análise da fertilidade dos grãos de pólen dos progenitores coletados no campo ou armazenados é indispensável antes de iniciar os cruzamentos, uma vez que o período anual de floração das plantas em estudo pode ser curto e, caso os pólenes não estejam viáveis, pode inviabilizar os cruzamentos (CHAGAS et al., 2010).

As técnicas para testar a fertilidade dos grãos de pólen são de fundamental importância para os trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genéticos de várias espécies, permitindo um maior sucesso nos cruzamentos, que são realizados com a finalidade de obter novos híbridos e/ou aumentar a variabilidade (NUNES et al., 2001).

Testes de viabilidade polínica são estudos aplicados no melhoramento genético de plantas por meio de uma ciência denominada palinologia, ou seja, ciência que estuda os grãos de pólen e esporos (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999). A viabilidade polínica pode ser verificada por meio da emissão, alongamento e formação do tubo polínico *in vitro* (Figura 3), auxiliando assim, os programas de melhoramento genético (SILVA, 1996).

Figura 3 – Emissão de tubo polínico em grãos de pólen de pitaia de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus* Weber.), submetidos a teste de germinação *in vitro*. Aumento de 10x.



Fonte: Da Autora (2017).

A composição do meio de cultura, o estado de maturação fisiológica do grão de pólen, sua origem, as características genéticas e os agentes ambientais, como umidade e temperatura, são alguns dos fatores primordiais para os testes de fertilidade do grão de pólen (OLIVEIRA JÚNIOR, 1999).

Fatores ambientais também podem interferir na viabilidade polínica. Quando a abertura da antera coincide com elevada umidade do ar, a alta pressão osmótica do conteúdo celular do grão de pólen, aliada à baixa resistência de sua parede, diminui a viabilidade polínica (SOUSA, 1994).

2.5 Testes de verificação da viabilidade do grão de pólen

Em programas de melhoramento genético de frutíferas, os testes de germinação de grão de pólen *in vitro* são técnicas imprescindíveis, pois, por meio dessas análises preliminares torna-se possível verificar sua viabilidade, assim como realizar as primeiras inferências sobre problemas de esterilidade intrínsecos das cultivares estudadas (PIO et al., 2004).

São utilizados três métodos para avaliar a fertilidade do pólen *in vitro*, sendo: procedimento fluorocromático (FCR); testes de conteúdo celular com corantes e; germinação de pólen em meio artificial.

2.5.1 Procedimento fluorocromático (FCR)

Esse teste contém metodologia que faz a correlação entre a integridade da membrana e o crescimento do tubo polínico dos grãos de pólen, por meio de técnicas de microscopia de fluorescência. Com esta técnica, os grãos de pólen que não são completamente fluorescentes são considerados inviáveis, por apresentarem algum tipo de problema em sua estrutura, enquanto os grãos de pólen que ficam completamente fluorescentes são metodologicamente considerados aptos à germinação, sendo então, viáveis (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

2.5.2 Testes de conteúdo celular com corantes

Apresenta atividade enzimática da desidrogenase durante o processo respiratório dos tecidos, estando esse tipo de atividade enzimática no grão de pólen relacionado com a sua capacidade de germinação. O corante, então, reage com o hidrogênio produzido na respiração celular do pólen, fazendo o grão de pólen adquirir uma coloração diferenciada (HUANG et al., 2004).

2.5.3 Germinação em meio artificial

Esta metodologia tem sido muito atrativa entre os pesquisadores, uma vez que oferece facilidade para a incorporação de açúcar ou outros estimulantes à germinação do pólen, além de proporcionar umidade relativa constante. Outra vantagem também é a preparação de quantidades que podem ser estocadas. Estudos têm sido conduzidos no sentido de determinar, qualitativa e quantitativamente, os componentes necessários para a melhor composição do meio de cultura para a germinação do grão de pólen. Os componentes são constituídos, basicamente, por carboidratos e elementos estimulantes (BARBOSA et al., 1991; NUNES et al., 2001; PIO, 2003). Segundo Miranda e Clement (1990), para a germinação de grãos de pólen, os principais componentes do meio de cultura têm sido de diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico.

Segundo Askin, Hepaksoy e Ozcagiran, (1990), o boro, na presença de sacarose, forma o complexo ionizável sacarose-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares, facilitando o desenvolvimento *in vitro*. O emprego de cálcio e boro é importante para promover a germinação e o alongamento do tubo polínico (KWACK; BREWBAKER, 1963; SAHAR; SPIEGEL, 1980).

O ágar solidifica o meio de cultura e facilita o depósito dos grãos de pólen no meio. As concentrações e o tipo de frutífera a ser estudado propiciam uma variação na germinação do grão de pólen. Algumas espécies podem germinar melhor em meio com maior concentração de ágar (FREITAS et al., 2006), enquanto outras necessitam de quantidades menores (CHAGAS et al., 2006).

O pH do meio de cultura também é um fator importante, pois pode influenciar a disponibilidade de nutrientes e de fitorreguladores, bem como interferir no grau de solidificação do ágar (PASQUAL et al., 2002). Segundo Pierik (1987), o pH que proporciona um crescimento adequado da maioria das espécies situa-se na faixa de 5 a 6,5. Valores acima destes podem ocasionar uma paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE, 1974).

2.6 Fatores que interferem na conservação dos grãos de pólen

Sabe-se que o armazenamento, como meio de manutenção da viabilidade do pólen, é uma ferramenta valiosa empregada por melhoristas e geneticistas, justificando-se em programas de hibridação quando há defasagem no florescimento entre as espécies de interesse ou quando os mesmos se encontram em regiões distintas.

O armazenamento pode ser classificado em dois tipos: curto e longo prazo. Segundo Sousa (1988), normalmente, procede-se o armazenamento a curto prazo, visando estudos de genética e de melhoramento e, a longo prazo, para a conservação genética, e é comum ocorrer alterações que podem levar, após muitos anos, a populações geneticamente diferentes das originais.

Dentre os fatores que mais influenciam na longevidade do pólen durante o armazenamento, destacam-se a umidade relativa, a temperatura de armazenamento e as embalagens de armazenamento. Essas variáveis devem ser definidas para possibilitar a manutenção da viabilidade por um período maior possível (SOUSA, 1988). A maioria dos métodos empregados envolve a redução do teor de água e a manutenção do pólen à baixa temperatura, de modo que as oscilações sejam evitadas.

Os fatores genéticos e fisiológicos também podem afetar a longevidade do pólen. Muitos autores relatam que grãos de pólen binucleados possuem maior viabilidade, comparados com os trinucleados, que se classificam em tolerantes ou sensíveis à desidratação, respectivamente. Dentre as possíveis explicações para o fato, Sousa (1988) cita que a segunda divisão meiótica priva o grão de pólen de reservas suficientes para propiciar uma boa longevidade e germinação. Kirby e Smith (1974) chegaram à conclusão de que há maior quantidade de compostos de superfície na parede dos polens binucleados. O pólen das cactáceas é trinuclear, incluindo a pitaia, dificultando assim, o armazenamento dos gametas masculinos (BREWBAKER, 1967).

Podem ocorrer também alterações fisiológicas durante o armazenamento do pólen, o que contribui para um decréscimo na viabilidade.

O teor de água do pólen é um dos fatores mais importantes que envolvem o armazenamento e, normalmente, encontra-se negativamente relacionado à longevidade (SOUSA, 1988). Mas, o teor de água ideal varia para cada caso empregado. Sousa (1988) afirma que o cuidado para a secagem de pólen trinucleado deve ser muito grande, pois os componentes nucleares das células masculinas podem ser danificados, provocando redução da viabilidade.

Vários métodos são empregados para conseguir a redução do teor de água dos grãos de pólen, como a manipulação por meio de sais saturados, como LiCl, MgCl₂, Mg(NO₃)₂, NH₄NO₃, KCl, CuSO₄.5H₂O, P₂O₅, ZnCl₂, Ca(NO₃)₂, NaNO₂, sílica gel, dessecação a vácuo e vapor de nitrogênio líquido (CONNOR; TOWIL, 1993; HONG et al., 1999). O processo de desidratação/hidratação está no equilíbrio entre a umidade relativa do ar e a umidade contida no grão de pólen (CONNOR; TOWIL, 1993).

Além do teor de água do grão de pólen, a temperatura e a umidade relativa do ar também são fatores a serem considerados para garantir o sucesso no processo de conservação do pólen.

O emprego de baixas temperaturas, normalmente, encontra-se ligado à redução do metabolismo do pólen, o que propicia maior longevidade. Pode-se conseguir redução de temperatura por meio de refrigeradores e freezer, que são de fácil acesso, entretanto, há outros métodos mais sofisticados, como gases liquefeitos.

O estado nutricional da planta fornecedora de pólen é também um fator a ser considerado. Stanley e Linskens (1974) evidenciaram que a nutrição mineral da planta, durante o desenvolvimento do pólen, pode afetar a longevidade do mesmo. Estes autores destacaram a sensibilidade que as anteras apresentam ao boro, cuja ausência pode levar

alguns tecidos ao colapso e induzir uma concentração nuclear anormal, causada pela inibição da divisão nuclear. A formação da parede pode ser impedida e, em muitos casos, ocorrer a desintegração da célula.

REFERÊNCIAS

- ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Univ. Zirat Fakult. Dergise**, v. 27, p. 105-116, 1990.
- BARBOSA, W. et al. Polinização das frutíferas de caroço, ameixeira, nectarineira e pessegueiro. **O Agrônomo**, Campinas, v. 43, n. 1, p. 3-13, 1991.
- BREWBAKER, J. L. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. **American Journal of Botany**, New York, v. 54, n. 9, p. 1069-1083, 1967.
- BRIEGER, F. G; BLUMENSCHIEIN, A. Botânica e origem do milho. **Cultura e adubação do milho**. São Paulo/Piracicaba: Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1966.
- CARVALHO, N. M. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 23 p. (Circular, 23).
- CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 261-266, 2010.
- _____. Ajuste da concentração de ágar e sacarose para germinação in vitro de grãos de pólen de nectarina. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD ROM.
- CHANG, M.T; NEUFFER. M.G. Position of the vegetative and sperm cells of germinating pollen grain in maize (*Zea mays* L.). **Maydica**, v. 37, p. 233-243,1992.
- CONNOR, F.K.; TOWILL, L.E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, v. 68, n. 1, p. 77-84, 1993.
- DEMBITSKY, V. M. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1671-1701, 2011.
- DONADIO, L. C. Pitaya. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 31, n. 3, 2009.
- ESTELLENA, N. T. Dragon fruit production guide. **Pinoy bisnes ideas: money making business ideas for entrepreneurs**. Disponível em: <<http://www.pinoybisnes.com/agribusiness/dragon-fruit-production>>. Acesso em: 15 abr. 2017.
- FREITAS, D. A. F. et al. Avaliação da germinação in vitro de grãos de pólen de *Pyrus calleriana* Dcne. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. 1 CD ROM.

GOODMAN, M. M.; SMITH, J. S. C. **Botânica**. Melhoramento e Produção do Milho. Fundação Cargill, Campinas, p. 41-78, 1987.

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

HESSEN, A.J.; TELLEZ, A. La pitahaia se abre paso! **Cultivo exótico com pontecial para exportación para las regiones tropicales de la America Latina**. Agricultura de las Américas. p. 6-10, 1995.

HONG, T. D. et al. A model of the effect of temperature and moisture on pollen longevity in air-dry storage environments. **Annals of Botany**, v. 83, n. 2, p. 167-173, 1999.

HUANG, Z. et al. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 93, n. 3, p. 295-30, jan. 2004.

JUNQUEIRA, K. P. et al. **Informações preliminares sobre uma espécie de pitaya do Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002.

KIRBY, E.G.; SMITH, J.E. Elutable substances of pollen grain walls. In: LINSKENS, H.F. **Fertilization in higher plants**. Amsterdam: North-Holland, 1974. p. 127-130.

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

LE BELLEC, F.; VAILLANT, F.; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v. 61, n. 1, p. 237-250, 2006.

LONE, A. B.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T. Qualidade de frutos de pitaya em função de diferentes fontes de pólen. **Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal**, SP, v. 33, n. 4, p. 1162-1168, dez. 2011.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 67, n. 1-2, p. 101-104, 1996.

MENEZES, T. P. **Polinização e maturação de pitaia vermelha [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose]**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.

MENEZES, T. P. et al. Características físicas e físico-químicas de pitaia vermelha durante a maturação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 631-643, 2015.

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

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

NERD, A.; TEL-ZUR, N.; MIZRAHI, Y. Fruit of vine and columnar cacti. In: NOBEL, P. S. (Ed.). **Cacti: biology and uses**. Los Angeles: UCLA, p. 254-262. 2002.

NUNES, J. C. O. et al. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 35-39, 2001.

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

ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a short review. **Comunicata Scientiae**, v. 3. n. 4, p. 220-237, 2012.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 199-200, 2002.

PAULA, C. C.; RIBEIRO, O. B. C. **Cultivo prático de cactáceas**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 94 p.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops**. 1987. Disponível em: <<https://www.akademika.no/in-vitro-culture-of-higher-plants/r-l-m-pierik/9789024735303>>. Acesso em: 22 jan.2017.

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, n. 6, p. 839-845, 1967.

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

PIO, L. A. S. et al. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, p. 293-296, 2004.

PIO, R. et al. Emergência e desenvolvimento de plântulas de cultivares de marmeleiro para uso como porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 133-136, 2007.

PUSHPAKUMARA, D. K. N. G.; GUNASENA, H. P. M.; KARIYAWASAM, M. Flowering and fruiting phenology, pollination vectors and breeding system of dragon fruit (*Hylocereus* spp.). **Sri Lankan Journal of Agricultural Science**, v. 42, p. 81-91, 2005.

PRIATNI, S.; PRADITA, A. Stability study of betacyanin extract from red dragon fruit (*Hylocereus polyhizus*) peels. **Procedia chemistry**. v. 16, p. 438-444, 2015.

SAHAR, N.; SPIEGEL, R. P. Citrus pollen storage. **HortScience**, Duke Street, v. 15, n. 1, p. 81-82, 1980.

SANTOS, V. A. dos. **Flores de pitaia totalmente abertas**. 2017. 1 fotografia.

SILVA, M. M. **Influência das abelhas na polinização e de agrotóxicos na germinação de pólen do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.)**. 1996. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

SILVA et al. Qualidade de frutos de pitaya em função da época de polinização, da fonte de pólen e da coloração da cobertura. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1162-1168, 2011.

SOUSA, V.A. de. **Manejo e viabilidade do pólen de *Eucalyptus* spp.** 1988.155 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 1988.

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

SOUZA, M. M. de.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

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

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant Grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (*Poaceae* *Poales*) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.

TIGHE, M. E. **Manual de recolección y manejo de polen de pinus tropicales y subtropicales procedentes de rodales naturales**. 1. ed. Raleigh, NC, USA: NC State University 2004. 20 p.

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

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

ZEE, F.; CHUNG-RUEY, Y; NISHINA, M. **Pitaya (dragon fruit, strawberry pear)**. Manoa: University of Hawaii, 2004. 3 p.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - *In vitro* germination of pollen grains of *Hylocereus polyrhizus* Weber

ABSTRACT

The objective of the work was to adjust the culture medium for germination of dragon fruit pollen grains (*Hylocereus polyrhizus* Weber). Four experiments were installed: I) Agar (6, 8 and 10 g L⁻¹) and pH (5, 6 and 7); II) Sucrose (0, 25, 50, 75, 100 and 125 g L⁻¹); III) Calcium nitrate (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹); IV) Boric acid (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹). Pollen tube length and percentage of germination of pollen grains were evaluated. It is concluded that the medium to obtain the maximum germination of dragon fruit pollen grains should be increased by 100 g L⁻¹ sucrose, 518 mg L⁻¹ calcium nitrate and 636 mg L⁻¹ boric acid. The pH measured for 5 and the medium solidified with 6 g L⁻¹ of agar. The concentration of 500 mg L⁻¹ of boric acid gives higher pollen tube lengths.

Keywords: Dragon fruit. Genetic improvement. Biotechnology. Tissue culture.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi ajustar o meio de cultura para germinação de grãos de pólen de pitaia (*Hylocereus polyrhizus* Weber). Quatro experimentos foram instalados: I) Ágar (6, 8 e 10 g L⁻¹) e pH (5, 6 e 7); II) Sacarose (0, 25, 50, 75, 100 e 125 g L⁻¹); III) Nitrato de cálcio (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹); IV) Ácido bórico (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹). Foram avaliados comprimento do tubo polínico e porcentagem de germinação dos grãos pólen. Conclui-se que o meio para se obter a máxima germinação de grãos de pólen de pitaia, deve ser acrescido de 100 g L⁻¹ de sacarose, 518 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio e 636 mg L⁻¹ de ácido bórico, sendo o pH aferido para 5 e o meio solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar. A concentração de 500 mg L⁻¹ de ácido bórico propicia maiores comprimentos do tubo polínico.

Palavras chaves: Pitaia. Melhoramento genético. Biotecnologia. Cultura de tecidos.

1 INTRODUCTION

The awareness of the population in the search for a healthier diet promoted a considerable growth in the consumption of fruits, with emphasis on exotic fruits.

Taking into account nutritional characteristics, especially its high levels of vitamin C (20.69 mg 100 g⁻¹) and phenolic compounds (124.55 mg 100 g⁻¹) (ABREU et al., 2012), dragon fruit appears as an interesting alternative to producers and consumers. It is a fruit cactus originating in the tropical forests of Mexico and Central and South America

(HERNANDEZ, 2000). The dragon fruits can be divided into four large groups: *Stenocereus* Britton & Rose, *Cereus* Mill., *Selenicereus* (A. Beger) Riccob and *Hylocereus* Briton & Rose, the genus *Hylocereus* being the most cultivated, with two species, red dragon fruit with white pulp [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose] and red dragon fruit with red pulp (*Hylocereus polyrhizus* Weber).

One of the basic premises for success in breeding programs of any specie is the prior knowledge of the viability of pollen, whose objectives in the case of dragon fruit is the search for more attractive aesthetically and nutrient rich cultivars.

The pollen performance of the species can be diagnosed by *in vitro* germination (MARCELLÁN; CAMADRO, 1996). According to Bolat and Pirlak (1999) there is a direct relationship between germination percentage and pollen viability.

Pollen germination is influenced by several factors such as species, season, composition and concentration of the medium, temperature and incubation time, stage of flower development when collected and method of collection, and storage conditions (MOURA; MACHADO; LEDO, 2015; SHARAFI, 2010; STANLEY; LINSKENS, 1974).

The aim of this study was to adjust the culture medium to verify the germination capacity of the pollen grains of dragon fruit of red peel and pulp (*H. polyrhizus*).

2 MATERIAL AND METHODS

The experiments were conducted at the Tissue Culture Laboratory of the Federal University of Lavras, MG. Pollen grains from red peel and pulp of dragon fruit flowers (*Hylocereus polyrhizus* Weber), collected from healthy plants with four years of implantation in the Fruit sector / UFLA from January to March, 2016.

Considering that the opening of the flowers only occurs at dawn, floral buds that showed at the ends, between the sepals and the petals, white coloration, were selected during the afternoon, indicating that they would open at dawn the next day. Posteriorly, they were protected with paper bags in order to prevent future losses and contaminations from other species and the following morning, they were collected and taken to the laboratory for *in vitro* germination tests.

2.1 Determination of the culture medium

The basic culture medium for in vitro pollen germination was determined from the steps described below, using distilled water as the basic ingredient, where the best result from the previous experiment was used for the next step.

- a) Concentrations of agar (6, 8 and 10 g L⁻¹) and pH of the medium (5, 6 and 7);
- b) Concentrations of sucrose (0, 25, 50, 75, 100 and 125 g L⁻¹);
- c) Concentrations of calcium nitrate (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹);
- d) Concentrations of boric acid (0, 200, 400, 600, 800 and 1000 mg L⁻¹).

2.2 Number of pollen grains per anther and per flower

The number of pollen grains per anther and per flower was obtained by simple counting in order to characterize the species studied. The amount of anthers per flower in ten flowers was evaluated. of these flowers, six anthers were randomly collected and each set of anthers was stored in Eppendorf tubes uncovered at controlled temperature at 27 °C for 24 hours in the dark to promote dehiscence and thus the release of pollen grains according to methodology established by Ramos et al. (2008).

After 24 hours, 1000 µL of lactic acid solution was added inside the tubes. After 48 hours, a 10 µL sample from each Eppendorf was placed on a 'Neubauer' reading sheet for the quantification of the number of pollen grains with the aid of an optical microscope in the objective of 100x. This experiment was conducted with five repetitions each repetition consists of four readings on the blade.

The amount of pollen grains per anther was obtained by multiplying the average number of pollen grains of each sample by the volume of lactic acid in the solution (1000 µL) and dividing this value by the product by the volume of lactic acid in the sample (10 µL) and the number of anthers of each tube. The number of pollen grains per flower was calculated by multiplying the mean estimate of pollen grains per anther by the medium number of anthers per flower.

2.3 Germination percentage

Pollen were uniformly distributed with brush on petri dishes containing 20 mL of medium for each step. After the distribution, the medium was incubated at 27 °C, according to

methodology described by Chagas et al. (2010) and Figueiredo et al. (2013). After 24 hours of incubation, an optical microscope with a 10x magnification objective was used and then four fields of vision were evaluated, corresponding to four replications. Pollen grains whose pollen tube length exceeded twice their diameter were considered germinated (SOUSA; REGO; DOS SANTOS, 2013).

During the definition of the appropriate basic medium in the step of determining the concentration of boric acid for the germination of the pollen grain was also evaluated the length of the pollen tube, through measurements made by Motic Image Plus 3.0 software.

All steps were conducted in a completely randomized design, with four replicates, equivalent to the four fields of vision.

The data were submitted to analysis of variance, the means were compared by the Tukey test at 5% of probability and the quantitative data submitted to the regression. The analyzes were performed by SISVAR software (FERREIRA, 2011).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Number of pollen grain per anther per flower

In dragon fruit of red peel and pulp the following values were observed: mean 993 anthers per flower, 180.67 pollen grains per anther and 180,847.30 pollen grains per flower (Table 1).

Table 1 - Number of anther per flower, number of pollen grains per anther and per flower of dragon fruit of red peel and pulp.

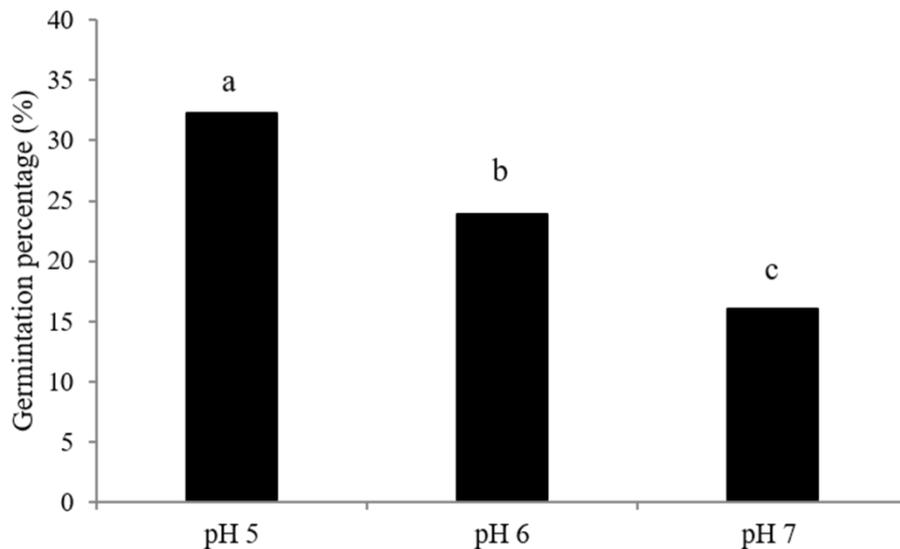
Floristic characteristic	Number		
	Anther per flower	Pollen grains per anther	Pollen grains per flower
Means	993.00	180.67	180,847.3

Despite the high value of the anther average, it cannot be stated that it is indicative of a higher quantity of pollen grains per flower, since the number of anthers per flower of a cultivar can vary annually due to the environmental conditions to which the plants are found (STANTON et al., 2007; ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2010).

3.2 Germination percentage

There was no significant interaction between pH and agar, but the pH values differed significantly at the 5% level by the Tukey test. It was observed that when the pH was adjusted to 5, a higher germination rate of pollen grains (32.24%) occurred, and with pH elevation to 6 and 7, the values recorded were 23.92% and 16.05 %, respectively (Figure 1). This fact was also investigated by Cuchiara et al. (2015) studying cultivars of *Ricinus communis* L. and Nogueira et al. (2016) studying different pear cultivars. However, they differ from those found by Ramos et al. (2008), which affirm that there is an increase in the germination rate of pollen grains in citrus with increasing pH in the culture medium.

Figure 1 - Germination percentage *in vitro* of pollen grains of dragon fruit of red peel and pulp submitted to different pH in the culture medium.



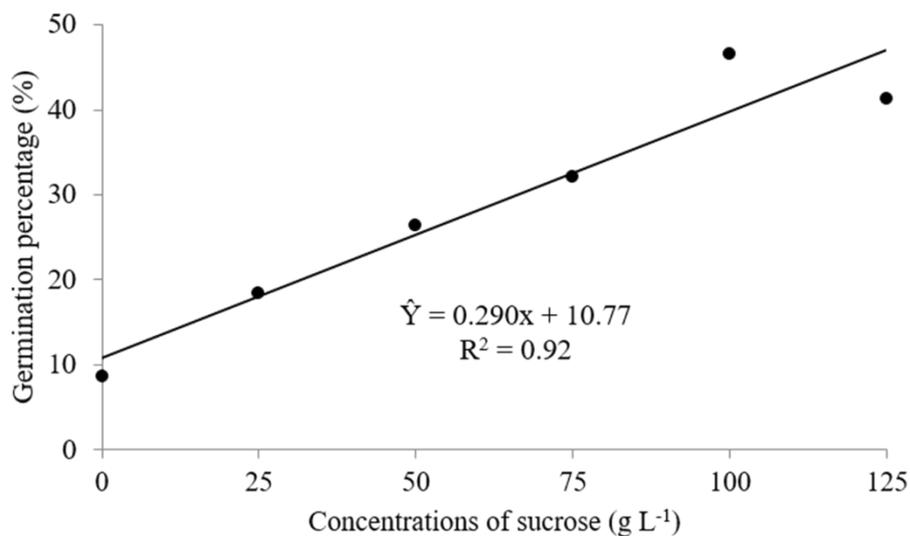
The pH is an important factor in determining the basic medium for the *in vitro* germination of pollen grains, it can influence the availability of nutrients and plant growth regulators, as well as interfere with the degree of solidification of agar (PASQUAL et al., 2002). According to Pio et al. (2006), the pH has great importance in the physiological processes involved in the germination of the pollen grains, also influencing the chances of fertilization and, consequently, the fruiting and production.

The concentration of agar is also considered a relevant characteristic in the composition of the medium for germination of pollen grains. However, in the present study there was no significant difference between the concentrations, so the concentration of 6 g L⁻¹ was used, as it presented a higher percentage of germination (25.42%).

The agar together with pH acts as a solidifying agent of the medium, in addition to influencing osmotic equilibrium and nutrient absorption. Each fruit has different results in their need for agar concentration in the medium to maximize germination. Some species may germinate better in medium with lower agar concentration (SOUSA et al., 2016), while others require larger amounts (SOARES et al., 2016).

There was a tendency for linear increase in the percentage of germination of pollen grains as the concentration of sucrose increased, registering the highest value (46.6%) when 100 g L⁻¹ was used, and the lowest (8.63%) in the absence of sucrose (Figure 2).

Figure 2 - Germination percentage *in vitro* of pollen grains of dragon fruit of red peel and pulp submitted to different concentrations of sucrose in the culture medium.

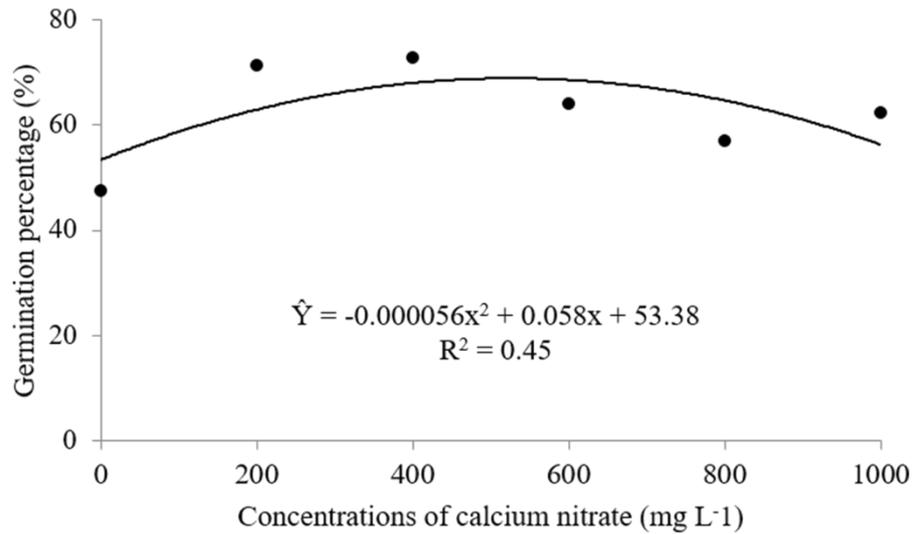


Similar results were observed by Xie et al. (2004) with Asian pear trees and by Chagas et al. (2010), with pear tree rootstocks, where higher percentages of pollen grain germination were achieved with higher concentrations of sucrose added to the medium.

This fact can be justified as a result of the sucrose aiming to provide energy in the biosynthetic processes involved in cell growth, differentiation and morphogenesis. Thus, high germination rates achieved with the increase of the sugar concentration may be a consequence of the higher energy supply in the carbohydrate form, favoring the growth of the pollen tube. However, according to Rosell, Herrero and Saúco (1999), the requirement of sucrose for complete germination of the pollens can vary between species and even within the same species.

The maximum germination was obtained at a concentration of 518 mg L⁻¹ calcium nitrate (68.87%), 29% increase compared to the absence of this component. At higher concentrations the percentage gradually decreased (Figure 3).

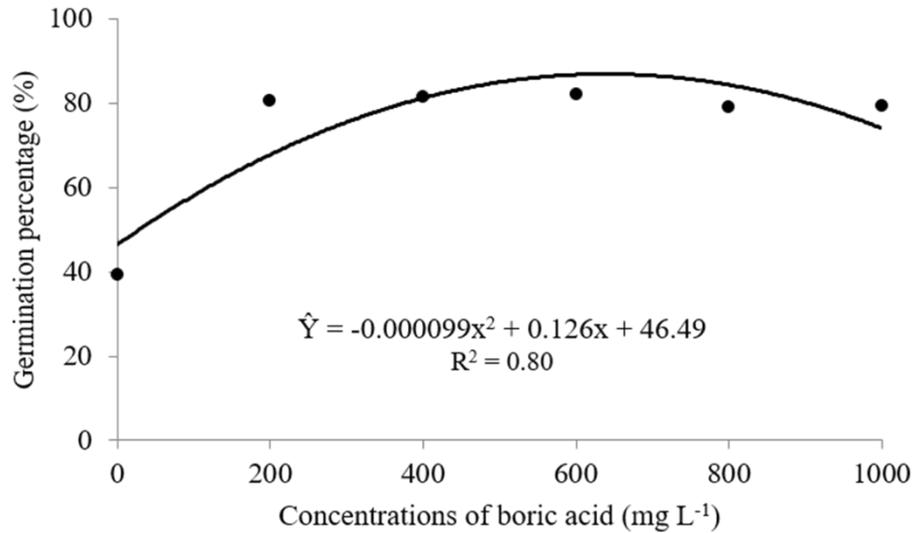
Figure 3 - Germination percentage *in vitro* of pollen grains of dragon fruit of red peel and pulp submitted to different concentrations of calcium nitrate in the culture medium.



These results corroborate those of Santos et al. (2011) who studied the germination of pollen grains of the ornamental banana tree (*Musa Valentina* H. Wendl. & Drude), and differ from those found by Pio et al. (2004) for citrus pollen germination and that a higher percentage obtained with 800 mg L⁻¹ calcium nitrate.

The maximum germination with the addition of the different boric acid doses was obtained with 636 mg L⁻¹, reaching 86.97%, with a gradual fall in the upper doses (Figure 4), showing an increase of approximately 87% in the germination rate. Similar results were obtained by Figueiredo et al. (2013) in the addition of boric acid in black berry (*Rubus* spp.) and by Chagas et al. (2010) in pear.

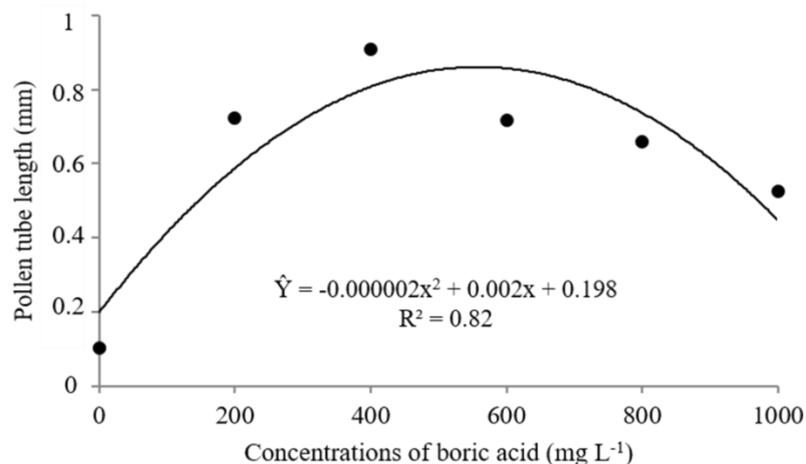
Figure 4 - Germination percentage *in vitro* of pollen grains of dragon fruit of red peel and pulp submitted to different concentrations of boric acid in the culture medium.



A possible explanation for such a significant increase in germination may be the fact that boric acid forms an ionizable complex with sugar, sugar borate, which reacts with the plasma membrane, promoting greater growth of the pollen tube and thus possibly increasing germination index (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Longer length of the pollen tube (0.85 mm) was achieved with 500 mg L⁻¹ of boric acid (Figure 5). This increase can be attributed to the fact that boron stimulates pollen tube growth and decreases the probability of his break up (FRANZON; RASEIRA, 2006).

Figure 5 - Pollen tube length of pollen grains of dragon fruit of red peel and pulp submitted to different concentrations of boric acid in the culture medium.



4 CONCLUSIONS

The culture medium for pollen grain germination of dragon fruit peel and red pulp (*Hylocereus polyrhizius* Weber) must be increased by 100 g L⁻¹ sucrose 518 mg L⁻¹ calcium nitrate, 636 mg L⁻¹ boric acid, 6 g L⁻¹ agar and pH 5.

Boric acid favors germination and increases the length of the pollen tube.

REFERENCES

- ABREU, W. C. D. et al. Características físico-químicas e atividade antioxidante total de pitaias vermelha e branca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 656-661, 2012.
- ALBUQUERQUE JUNIOR, C. L. D. et al. Número de anteras por flor, grãos de pólen por antera e capacidade germinativa do pólen de diferentes cultivares de macieiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1255-1260, 2010.
- BOLAT, Y.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 23, n. 4, p. 383-388, 1999.
- CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 261-266, 2010.
- CUCHIARA, C. C. et al. Pollen germination and viability of castor bean (*Ricinus communis* L.): culture medium composition and environmental conditions. **Científica**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FIGUEIREDO, M. A. et al. Características florais e carpométricas e germinação *in vitro* de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 731-740, 2013.
- FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. D. C. B. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (*Myrtaceae*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2006.
- HERNANDEZ, Y. D. O. **Hacia el conocimiento y la conservación de la pitahaya**. Mexico: IPN-SIBEJ-CONACYT-FMCN, 2000. 124 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas – princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.
- MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 7, n. 1-2, p. 101-104, 1996.
- MOURA, C. R. F.; MACHADO, C. A.; LEDO, A. S. *In vitro* germination and viability of pollen grains of coconut accessions. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 421-427, 2015.
- NOGUEIRA, P. V. et al. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains and germination of pear tree cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 380-386, 2016.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2002.

PIO, L. A. S. et al. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 3, p. 293-296, 2004.

_____. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

RAMOS, J. D. et al. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, v. 33, n. 1, p. 51-55, 2008.

ROSELL, P.; HERRERO, M.; SAÚCO, V. G. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): In vivo characterization and optimization of *in vitro* germination. **Scientia Horticulturae**, v. 81, n. 3, p. 251-265, 1999.

SANTOS, M. R. A. et al. Estabelecimento de protocolo para germinação de pólen de *Musa velutina* H. WENDL. & DRUDE. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 7, n. 1, p. 22-29, 2011.

SHARAFI, Y. Suitable *in vitro* medium for studying pollen viability in some of the Iranian hawthorn genotypes. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 19, p. 1967-1970, 2010.

SOARES, T. L. et al. Viability of pollen grains of tetraploid banana. **Bragantia**, v. 75, n. 2, p. 145-151, 2016.

SOUSA, A. S.; REGO, E. J. L.; DOS SANTOS, F. A. R. Viability and action of CPL lectin on *in vitro* germinability of pollen grains of *Malpighia emarginata* DC. (*Malpighiaceae*). **American Journal of Plant Science**, v. 4, p. 53-58, 2013.

SOUSA, A. S. et al. Testing culture media for pollen germination of *Elaeis guineensis* Jacq. (oil palm, Arecaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 182, n. 2, p. 536-542, 2016.

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

STANTON, M. A. et al. Floral competence of primocane-fruiting blackberries prime-jan and prime-jim grown at three temperature regimens. **HortScience**, v. 42, n. 3, p. 508-513, 2007.

XIE, S. et al. Pollen viability of Asian pear and effect of PGR, B and sucrose on germination and pollen tube development. **Journal of Fruit Science**, v. 21, p. 289-294, 2004.

ARTIGO 2 - Condições de armazenamento de grãos de pólen de pitaita de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus* Weber)

RESUMO

A finalidade do armazenamento do grão de pólen é conservar material para futura utilização, proporcionando-lhe condições ótimas, de forma a manter seu poder germinativo, vigor e integridade genética originais. O objetivo deste trabalho foi verificar o poder germinativo dos grãos de pólen de pitaita de polpa vermelha, após armazenamento a baixas temperaturas. Os grãos de pólen foram coletados, colocados em Eppendorf e mantidos nas condições de armazenamento: T1, refrigerador (4 °C); T2, freezer (-20 °C) e T3, ultra-freezer (-80 °C), durante um período de oito semanas. A avaliação da viabilidade deste pólen foi realizada aos (7, 15, 30, 45 e 60 dias) por meio do teste de germinação *in vitro*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 5 (3 temperaturas x 5 tempo), contendo quatro repetições. As condições de armazenamento sob refrigerador (4 °C) e freezer (-20 °C) são recomendadas para a conservação a curto prazo já o ultra-freezer (-80 °C) promoveu uma melhor viabilidade polínica a longo prazo.

Palavras chave: Conservação. Temperatura. Polinização.

ABSTRACT

The purpose of pollen grain storage is to conserve material for future use, providing optimum conditions to maintain its original germinative power, vigor and genetic integrity. The objective of this work was to verify the germinative power of red pulp dragon fruit pollen grains after storage at low temperatures. The pollen grains were collected, placed in Eppendorf and kept under storage conditions: T1, refrigerator (4 °C); T2, freezer (-20 °C) and T3, ultra-freezer (-80 °C), over a period of eight weeks. The evaluation of the viability of this pollen was performed at (7, 15, 30, 45 and 60 days) by means of the *in vitro* germination test. The experimental design was completely randomized, in a factorial arrangement 3 x 5 (3 temperatures x 5 time), containing four replications. Storage conditions under refrigerator (4 °C) and freezer (-20 °C) are recommended for short-term storage and the ultra-freezer (-80 °C) has promoted better long-term pollen viability.

Keyword: Conservation. Temperature. Pollination.

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que a pitaita é uma frutífera nativa das Américas. Atualmente, a espécie de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus* Weber) vem ganhando mercado com grande

intensidade, dado o interesse do consumidor pelo seu sabor agradável, aparência, propriedades nutraceuticas e benefícios antioxidantes (TENORE; NOVELLINO; BASILE, 2012).

Para se produzir pitaia de forma satisfatória, é essencial que ocorra polinização, seja ela por agentes polinizadores ou artificialmente. A polinização ocorre comumente durante a noite, a medida que as flores vão se abrindo (PUSHPAKUMARA; GUNASENA; KARIAYAWASAM, 2005). No entanto, durante a floração, ocorre significativa queda dos botões florais, pois nem sempre os produtores conseguem conciliar e fazer polinização noturna, sendo necessário estudos referentes à conservação e armazenamento do pólen para que as flores possam ser polinizadas durante o dia.

O armazenamento do grão de pólen em pitaia e outras frutíferas é uma importante ferramenta também nos programas de melhoramento, uma vez que visa evitar o processo de envelhecimento e manter a viabilidade máxima do pólen para uso posterior.

A conservação de pólen permite a sincronia artificial entre a dispersão de pólen com a receptividade floral, uma vez que o pólen pode ser empregado a qualquer tempo e também para complementar a função de agentes polinizadores pouco eficientes ou mesmo inexistentes (TIGHE, 2004).

Muitos estudos têm sido conduzidos acerca da viabilidade de grãos de pólen armazenados em diversas espécies, como coco, bromélia, dendê, *Leonurus cardiaca* L., bacuri e avelã (DE SOUZA et al., 2015; DE MOURA VALE et al., 2016; MACHADO et al., 2014; NOVARA et al., 2017; SHEKARI; NAZERI; SHOKRPOUR, 2016; YOUMBI et al., 2015).

O tempo de armazenamento do pólen é influenciado por diversos fatores como fase fisiológica da flor, temperatura de armazenamento, umidade relativa e umidade de pólen (SOARES et al., 2008). Monitorar a viabilidade antes, durante e após o armazenamento é crítico para um protocolo eficiente. Dessa forma, estabelecer o período máximo para o qual o pólen pode ser armazenado sem perda de germinabilidade e fertilidade é uma ferramenta importante para a reprodução e o intercâmbio de germoplasma (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008; GANESHAN et al., 2008).

Para ser considerado um pólen com características eficientes, sua taxa de germinação deve situar entre 50 a 80%. Entretanto, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem à medida que o pólen envelhece, mas mesmo que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos indica que o mesmo ainda é suficientemente bom para assegurar, pelo menos, uma moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação (SCORZA; SHERMAN, 1995).

A verificação da viabilidade do pólen armazenado pode ser realizada por vários métodos, incluindo histoquímica, germinação *in vitro*, uso de corantes e polinização *in vivo* seguida de porcentagem de frutificação (GALLETA, 1983). Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho, verificar o poder germinativo dos grãos de pólen de pitaia de polpa vermelha (*H. polyrhizus*), após armazenamento a baixas temperaturas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Citogenética da Universidade Federal de Lavras, MG, no período de janeiro a março de 2017. Grãos de pólen provenientes de flores de pitaia de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus* Weber.), foram coletados de plantas sadias, oriundas de propagação vegetativa com quatro anos de implantação no Setor de Fruticultura/ UFLA.

Considerando que a abertura das flores só ocorre durante a madrugada, botões florais que apresentavam nas extremidades, entre as sépalas e as pétalas, coloração branca, foram selecionados durante o final da tarde, indício de abertura na madrugada do dia seguinte. Posteriormente, foram protegidos com sacos de papel, a fim de impedir futuras perdas e contaminações provenientes de espécies de polinização e, na manhã seguinte, foram coletados e levados aos laboratórios para a realização da montagem dos experimentos.

No Laboratório de Citogenética, com o auxílio de um pincel, os grãos de pólen foram retirados e colocados em tubos Eppendorf. Foram testados três ambientes de armazenamento: refrigerador (4 °C), freezer (-20 °C) e ultra-freezer (-80 °C), durante o período de oito semanas. As amostras foram divididas em várias alíquotas para reduzir o estresse ligado ao descongelamento.

A viabilidade do pólen foi estudada através da germinação *in vitro* utilizando meio de cultura contendo 6 g L⁻¹ de ágar e 100 g L⁻¹ de sacarose, 518 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O), 636 mg L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₃) e pH corrigido para 5. Pólens foram distribuídos homogeneamente com pincel, sobre placas de petri, contendo 20 mL de meio de cultura para cada etapa. Após a distribuição, o meio foi incubado a 27 °C, de acordo com metodologia descrita por Chagas et al. (2010) e Figueiredo et al. (2013). Após 24 horas de incubação, foi utilizado para leitura em quatro campos de visão, microscópio óptico, com objetiva de aumento de 10x, equivalendo a quatro repetições. Foram considerados germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico ultrapassava o dobro do seu diâmetro (SOUSA; REGO; DOS SANTOS, 2013).

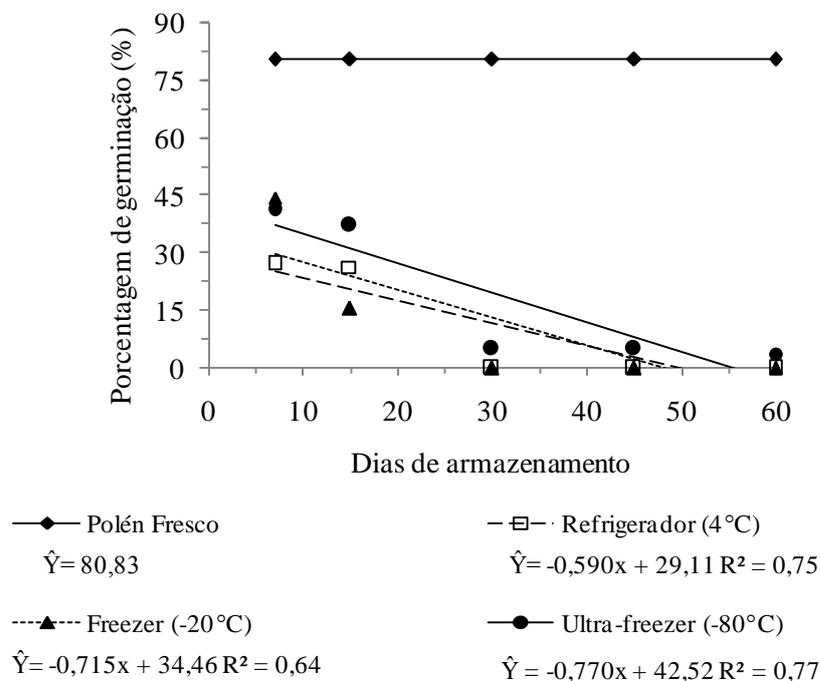
O experimento de conservação foi conduzido em um fatorial 3x5, onde foram testados três ambientes de armazenamento [refrigerador (4 °C), freezer (-20 °C) e ultra-freezer (-80 °C)] e cinco tempo de armazenamento (7, 15, 30, 45 e 60 dias), em delineamento inteiramente casualizado, contendo quatro repetições, equivalentes a quatro campos de visões. O tratamento considerado como testemunha (pólen fresco) não foi submetido ao armazenamento, sendo o pólen avaliado logo após a antese.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro e os dados quantitativos submetidos à regressão. As análises foram realizadas pelo software Sisvar (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao armazenamento verificou-se que houve interação significativa a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey, entre os fatores temperatura e tempo (Figura 1).

Figura 1 - Porcentagem de germinação *in vitro* de grãos de pólen pitiaia de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus* Weber) submetidos a diferentes temperaturas e tempo de armazenamento.



Todos os tratamentos apresentaram médias inferiores de germinação em relação ao tratamento controle. Os grãos de pólen frescos apresentaram uma taxa de germinação de

80,83%, porém, quando colocados no ambiente de conservação, não houve resultado satisfatório, evidenciado pelas baixas taxas apresentadas pelos tratamentos.

Observa-se uma tendência linear decrescente para todos os ambientes testados ao longo do tempo de armazenamento. Para os grãos de pólen armazenados no refrigerador, a maior taxa de germinação foi aos 7 dias com média de 27,16%, entretanto, esse valor não diferiu estatisticamente da média de germinação alcançada aos 15 dias, não sendo detectada germinação nos dias posteriores.

Esses resultados demonstram que o armazenamento a 4 °C, não foi eficiente, pois foi observada redução drástica na viabilidade polínica, ao longo do armazenamento, quando comparado com a porcentagem de germinação de pólen fresco. Esses resultados corroboram os resultados de Pio et al. (2007) e Cuchiara, Silva e Bobrowski (2012), testando diferentes condições de armazenamento em cultivares de laranja doce e de mamoneira, e diferiram dos encontrados por Shekari, Nazeri e Shokrpour (2016), que conseguiram armazenar grãos de pólen de *Leonorus cardiaca* por um período de 50 dias.

Em relação ao uso do freezer observa-se uma taxa de germinação máxima aos 7 dias de conservação (44,43%), decrescendo bruscamente até a inexistência de germinação a partir do 30° dia, evidenciando que o freezer seria uma boa alternativa para o armazenamento a curto prazo. Resultados contraditórios foram encontrados por Macovei et al. (2016) estudando o efeito da temperatura -20 °C no armazenamento de grãos de pólen de rosas e aos de De Moura Vale et al. (2016) que conseguiram armazenar grãos de pólen de bacurizeiro por 450 dias.

A germinação máxima obtida no ultra-freezer foi aos 7 dias (41,01%) decrescendo ao longo do tempo, apresentando uma taxa de 3,71% aos 60 dias, o que representa uma diminuição de 90,95% na capacidade germinativa do grão de pólen. Tais resultados estão de acordo com resultados encontrados por Shekari, Nazeri e Shokrpour (2016) com grão de pólen de *Leonorus cardiaca* e Machado et al. (2014) com grãos de pólen de coqueiro. Entretanto, esses resultados divergiram dos encontrados por Metz, Nerd e Mizrahi (2000), que conseguiram manter os grãos de pólen de pitaia de polpa vermelha (*H. polyrhizus*) viáveis por 9 meses, porém, com baixa taxa de germinação (11%).

Fica evidente que o pólen que não germina bem em meios adequados para o pólen fresco não é necessariamente inviável (RAJASEKHARAN et al., 1994, SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992) e pode produzir um conjunto satisfatório de frutos. Em contrapartida, mesmo se o pólen é julgado viável por ensaio *in vitro*, a capacidade do pólen para definir frutos não pode ser prevista (YATES; SPARKS, 1990).

No presente trabalho, as condições de armazenamento com temperaturas mais baixas mostraram-se mais eficientes, tal fato pode estar relacionado com a maior velocidade de congelamento, que causa menores danos as células, por menor desidratação e menos rompimento de membranas (DUMONT; MARECHAL; GERVAIS, 2004; FELLOWS, 2006). Contudo, nenhum dos tratamentos ultrapassaram as 8 semanas de armazenamento.

Para preservar maior longevidade nos grãos de pólen, deve-se promover a redução do metabolismo celular, por meio do efeito de baixas temperaturas. No processo de armazenamento de grãos de pólen, umas das maiores dificuldades encontradas é a formação de cristais de gelo no interior das células, que podem ocasionar a perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular, devido a possibilidade de ruptura das membranas, conseqüentemente, resultando em colapso e morte (lise) das células (SALOMOM, 2003; SANTOS et al., 2002). A formação de cristais de gelo se dá através da expansão da água durante o congelamento, provocando injúrias mecânicas nas células (SANTOS, 2001).

Outra possível explicação seria que, durante o armazenamento dos grãos de pólen, pode ocorrer o decréscimo da viabilidade, por causa das alterações fisiológicas ocasionalmente ocorridas no processo. São exemplos de tais transformações: variação na velocidade de respiração e alteração de conversão de açúcares resultando em ácidos orgânicos, produtos metabólicos secundários em acúmulo e alteração dos lipídeos da exina presentes no pólen (STANLEY; LINSKENS, 1974).

4 CONCLUSÕES

O refrigerador e o freezer podem ser usados como ambiente de armazenamento de grãos de pólen de *Hylocereus polyrhizus* Weber em curto prazo.

O ultra-freezer se mostrou mais eficiente na conservação de grão pólen de até os 60 dias.

Esse estudo demonstra que estudos subsequentes devem ser realizados *in vivo*, visando a confirmação do poder germinativo dos grãos de pólen, através do pegamento de frutos em campo.

REFERÊNCIAS

- CHAGAS, E. A. et al. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 261-266, 2010.
- CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Revista Ceres**, v. 59, n. 1, 2012.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. Conservação de grão de pólen de mamoeiro. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 433-438, 2008.
- DE MOURA VALE, E. et al. Conservação e desengorduramento de grãos de pólen de bacurizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 2, p. 192-195, 2016.
- DE SOUZA, E. H. et al. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (*Bromeliaceae*) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, n. 1, p. 13-28, 2015.
- DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 1, p. 268-272, 2004.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. São Paulo: Artmed, 2006.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FIGUEIREDO, M. A. et al. Características florais e carpométricas e germinação in vitro de grãos de pólen de cultivares de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 7, p. 731-740, 2013.
- GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J. N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit Breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p. 23-47.
- GANESHAN, S. et al. Cryopreservation of Pollen. In: REED, B. M. (Ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 281-332.
- MACHADO, C. D. A. et al. Pollen grain viability of coconut accessions at low temperatures. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 2, p. 227-232, 2014.
- MACOVEI, A. et al. Prolonged Cold Storage Affects Pollen Viability and Germination along with Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide Content in. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 1, p. 6, 2016.
- METZ, C.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. **HortScience**, v. 35, n. 1, p. 22-24, 2000.

NOVARA, C. et al. Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 295-303, 2017.

PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 147-153, 2007.

PUSHPAKUMARA, D. K. N. G.; GUNASENA, H. P. M.; KARIAYAWASAM, M. Flowering and fruiting phenology, pollination vectors and breeding system of dragon fruit (*Hylocereus* spp.). **Sri Lankan Journal of Agricultural Science**, v. 42, p. 81-91, 2005.

RAJASEKHARAN, P. E. et al. Freeze preservation of gladiolus pollen. **Euphytica**, v. 80, n. 1-2, p. 105-109, 1994.

SALOMOM, M. V. **Trigo: avaliação de linhagens diplóides obtidas via cultura de anteras**. 2003. 180 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 2003.

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

SANTOS, I. R. I. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica*). **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2002. (Comunicado Técnico,)

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

SHEKARI, A.; NAZERI, V.; SHOKRPOUR, M. Pollen viability and storage life in *Leonurus cardiaca* L. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 101-104, 2016.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. *In vitro* germination methods. In: **Pollen Biology**. Berlin Heidelberg: Springer, 1992. p. 9-22.

SOARES, T. L. et al. In vitro germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 111-118, 2008.

SOUSA, A. S.; REGO, E. J. L.; DOS SANTOS, F. A. R. Viability and Action of CPL Lectin on *in vitro* Germinability of Pollen Grains of *Malpighia emarginata* DC.— (Malpighiaceae). **American Journal of Plant Sciences**, N. 4, p. 53-58, 2013.

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

TENORE, G.; NOVELLINO, E.; BASILE, A. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 129-136, 2012.

TIGHE, M. E. **Manual de Recolección y Manejo de Polen de Pinos Tropicales y Subtropicales Procedentes de Rodales Naturales**. 1. ed, Raleigh, NC, USA: NC State University 2004. 20 p.

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

YOUMBI, E. et al. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) improvement: pollen assessment for better conservation and germination. **Journal of Oil Palm Research**, v. 27, n. 3, p. 212-219, 2015.