

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**TATIANE EBERLING**

**ESTABELECIMENTO DO MEIO DE CULTURA E CONSERVAÇÃO DA  
VIABILIDADE POLÍNICA DE HEMEROCALE**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ  
2019**

**TATIANE EBERLING**

**ESTABELECIMENTO DO MEIO DE CULTURA E CONSERVAÇÃO DA  
VIABILIDADE POLÍNICA DE HEMEROCALÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Villa

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Alves  
Fogaça

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ  
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Eberling, Tatiane  
ESTABELECIMENTO DO MEIO DE CULTURA E CONSERVAÇÃO DA  
VIABILIDADE POLÍNICA DE HEMEROCALIS / Tatiane Eberling;  
orientador(a), Fabíola Villa; coorientador(a), Luciana  
Alves Fogaça, 2019.  
42 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,  
2019.

1. Agronomia . 2. Floricultura. 3. Melhoramento. I.  
Villa, Fabíola . II. Alves Fogaça, Luciana. III. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

## TATIANE EBERLING

Estabelecimento do meio de cultura e conservação da viabilidade polínica de  
Hemerocale

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em  
Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Manejo de  
Culturas, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Fabiola Villa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Marcia de Moraes Leher

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Daniel Fernandes da Silva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon  
(UNIOESTE)

Lilian Yukari Yamamoto

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)

Marechal Cândido Rondon, 27 de fevereiro de 2019

Aos meus pais, João Eberling e Marcia Helena Marafon Eberling, pelo amor, carinho, confiança e ensinamentos dedicados durante toda a minha vida. Ao meu irmão, Marcos André Eberling, pelo apoio, amizade e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde e por permanecer comigo nos momentos difíceis, mantendo-me no caminho certo.

Aos meus pais e irmão, por terem me proporcionado a oportunidade da realização desse curso tão almejado por mim, pelo apoio, carinho e amor. Obrigada pela minha educação e pelas cobranças realizadas no decorrer da minha jornada estudantil.

À minha família e amigos, que estão sempre comigo, e me apoiaram desde o início da graduação.

À minha orientadora Fabíola Villa, pela sua orientação, amizade, auxílio e atenção durante o processo de elaboração desta pesquisa.

À minha coorientadora Luciana Alves Fogaça, pela amizade, coorientação, auxílio e atenção durante o desenvolvimento da dissertação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA).

Aos colegas mestrandos, pela amizade e companheirismo durante estes dois anos, em especial, Daniele, Giovana, Leila e Tauane, por todo o apoio e cumplicidade durante esta caminhada.

Ao Daniel Fernandes da Silva, pela amizade e por toda a ajuda prestada no decorrer deste trabalho.

Ao grupo de estudos em Floricultura e Fruticultura, obrigada por toda a ajuda e companheirismo ao longo destes dois anos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) pela possibilidade de aperfeiçoamento profissional.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), e equipe de funcionários pelo apoio durante o período de realização do trabalho e disponibilidade da estrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos. Lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

## RESUMO

EBERLING, Tatiane. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro - 2019. **Estabelecimento do meio de cultura e conservação da viabilidade polínica de hemerocale.** Orientadora: D.Sc. Fabíola Villa.

A hemerocale é uma planta monóica usada em hibridações inter e intraespecíficas, o que tem proporcionado o surgimento de uma grande diversidade de cultivares com diferentes cores e formas por meio de programas de melhoramento. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho estabelecer um meio de cultura para avaliação da viabilidade polínica em cultivares de hemerocale e avaliar condições de desidratação e armazenamento de grãos de pólen sobre sua germinação e viabilidade. Foram montados experimentos sequenciais em laboratório, onde, no primeiro, a cultivar Morgana A. S. Piske, foi utilizada para a realização dos experimentos de estabelecimento do meio de cultura, nos quais testou-se faixas de pH (4, 5, 6, 7), juntamente a concentrações de ágar (4, 6, 8, 10 g L<sup>-1</sup>). No teste seguinte, testou-se concentrações de sacarose (0, 30, 60, 90, 120 g L<sup>-1</sup>). Prosseguindo, adicionou-se ao meio concentrações de ácido bórico (0, 400, 800, 1200 mg L<sup>-1</sup>) e, por fim, foram concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg L<sup>-1</sup>). Após o estabelecimento do meio de cultura, avaliou-se o tempo de incubação necessário para máxima germinação dos grãos de pólen. O meio obtido foi testado em quatro cultivares, visando a verificação das porcentagens de germinação. Para a segunda parte dos experimentos, avaliaram-se os tempos (0, 12, 24, 48 horas) e locais de secagem (estufa tipo BOD a 25°C e dessecador de sílica gel). Foram realizados testes de germinação *in vitro* e viabilidade polínica. Após a determinação do melhor tempo e local de secagem, realizou-se o armazenamento dos grãos de pólen; os mesmos foram armazenados em freezer a -20 ± 3°C, geladeira a 4 ± 3°C e estufa BOD 25°C, por 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Após o armazenamento, repetiram-se os testes de germinação e viabilidade. O maior percentual de germinação *in vitro* ocorreu com as concentrações de 4 g L<sup>-1</sup> de ágar, 74,6 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 800 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 590 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, com pH de 5,74 e tempo ideal de incubação de 3 horas, sendo a cv. Regina aquela com maior percentual de germinação. Os grãos de pólen das cultivares de hemerocale apresentaram maior porcentagem de germinação quando frescos, não havendo a necessidade de desidratação. O melhor local de armazenagem foi o freezer, onde o pólen manteve 50% de sua

germinação, mesmo após 28 dias de armazenamento. O corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% não foi eficiente na determinação da viabilidade polínica do pólen de hemerocale.

**Palavras-chave:** *Hemerocallis x hybrida* Hort., palinologia, germinação *in vitro*, conservação *in vitro*.

## ABSTRACT

EBERLING, Tatiane. Western Paraná State University – UNIOESTE. February – 2019. **Establishment of the culture medium and conservation of the pollen viability of hemerocale.** Advisor: D.Sc. Fabíola Villa.

The hemerocale is a monoic plant used in inter and intraspecific hybridizations, which has given rise to a great diversity of cultivars with different colors and forms through programs of improvement. Taking the aforementioned into account, the objective of this work was to establish a culture medium to evaluate pollen viability in day-old cultivars and to evaluate the dehydration and storage conditions of pollen grains regarding their germination and viability. A sequential experiment was carried out in the laboratory, where the cultivar Morgana AS Piske was used for the establishment of the culture medium, in which the pH ranges (4, 5, 6, 7) together with concentrations of agar (4, 6, 8, 10 g L<sup>-1</sup>). In the following test, concentrations of sucrose (0, 30, 60, 90, 120 g L<sup>-1</sup>) were tested. Afterwards, concentrations of boric acid (0, 400, 800, 1200 mg L<sup>-1</sup>) were added to the medium and, finally, calcium nitrate concentrations (0, 200, 400 and 800 mg L<sup>-1</sup>). After the establishment of the culture medium, the incubation time required for maximum germination of the pollen grains was evaluated. The obtained medium was tested in four cultivars, aiming at the verification of germination percentages. For the second part of the experiments, four times (0, 12, 24, 48 hours) and two drying sites (BOD greenhouse at 25°C and silica gel desiccator) were evaluated. In vitro germination and pollen viability tests were performed. After the determination of the best time and place of drying, the pollen grains were stored. They were stored in a freezer at  $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , refrigerator at  $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$  and BOD 25°C, for 0, 7, 14, 21 and 28 days. After storage, germination and viability tests were repeated. The highest percentage of in vitro germination occurred with the concentrations of 4 g L<sup>-1</sup> agar, 74.6 g L<sup>-1</sup> sucrose, 800 mg L<sup>-1</sup> boric acid, 590 mg L<sup>-1</sup> calcium nitrate, pH of 5.74 and ideal incubation time of 3 hours, being cv. Regina the one with the highest percentage of germination. The pollen grains of the hemerocale cultivars had a higher percentage of germination when fresh, and there was no need for dehydration. The best storage site was the freezer, where the pollen kept 50% of its germination, even after 28 days of storage. The 1% dye 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) was not efficient in determining the pollen viability of hemerocale pollen.

**Key words:** *Hemerocallis x hybrida* Hort., palynology, *in vitro* germination, *in vitro* conservation.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1.

**Figura 1** - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de hemerocale em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ágar e pH (A), sacarose (B), ácido bórico (C), nitrato de cálcio (D) e porcentagem de germinação ao longo do tempo (E). ..... 16

### Artigo 2.

**Figura 1.** Porcentagem de germinação de grãos de pólen de três cultivares de hemerocale [Morgana A. S. Piske (A), Regina (B) e Luciana Alves Fogaça (C)], submetidos a locais e tempos de desidratação. .... 20

**Figura 2.** Porcentagem de germinação de grãos de pólen de três cultivares de hemerocale [Morgana A. S. Piske (A), Regina (B) e Luciana Alves Fogaça (C)], submetidos a locais e tempos de armazenamento..... 22

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1.

Tabela 1 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de quatro cultivares de hemerocale. Toledo, PR, 2019.....	15
--	----

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2 ARTIGO 1.....</b>	<b>2</b>
INTRODUÇÃO.....	2
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS .....	6
DISCUSSÃO .....	6
CONCLUSÕES .....	10
REFERÊNCIAS .....	10
<b>3 ARTIGO 2.....</b>	<b>17</b>
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS .....	24

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção e comercialização de flores e plantas ornamentais vem se fortalecendo no cenário econômico do país. O setor está sendo reconhecido não só por englobar atividades economicamente relevantes, mas, ainda, pelo aspecto social em que está vinculado. O ramo da floricultura é dominado por pequenos produtores, o que contribui para uma maior distribuição de renda.

Na região oeste paranaense, dentre as espécies ornamentais cultivadas, predomina o cultivo de orquídeas. Em vista disso, grande parte de seu mercado é abastecido por produtores de São Paulo, o que gera uma demanda por áreas de cultivo de flores e plantas ornamentais na região. No Brasil, a *hemerocale* – também conhecida como lírio-de-São-José, lírio-de-um-dia e lírio-amarelo – se destaca por apresentar elevado potencial para o setor da floricultura. Teve seu nome dado por Linnaeus, em 1753, tendo origem grega *hemero* (dia) e *kallos* (beleza) e sendo uma de suas mais importantes características o fato de que cada flor dura apenas um dia. Ressalta-se, ainda, que ela se trata de uma angiosperma, pertencente ao gênero *Hemerocallis* L., da família Hemerocallidaceae e ordem Liliales.

Devido a sua rusticidade, é considerada uma espécie excepcional para o paisagismo, pois possui boa resistência à seca, pragas e doenças, além de adaptar-se bem a diferentes tipos de solos e climas. Sua propagação é tradicionalmente feita de forma vegetativa, por meio de divisão de touceiras, brotações das hastes florais, cultura de tecido e indução do enraizamento de coroa. Outra forma de propagação é via sementes, no entanto, esse é um processo lento, que não gera indivíduos idênticos à planta-matriz. Esta forma de propagação é usada na obtenção de novos híbridos.

O *hemerocale* pode ser plantado durante o ano todo no Brasil, porém, os períodos mais indicados são no início ou final da floração. A florada começa em outubro e prolonga-se até o início de abril, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, podendo cada haste florescer por um período de três a seis semanas.

É uma planta monóica, usada em hibridações inter e intraespecíficas que, por meio de programas de melhoramento, tem proporcionado o surgimento de uma grande diversidade de cultivares, com diferentes cores e formas.

As cultivares podem apresentar florescimento sem sincronia, e tendo em vista que o pólen perde sua viabilidade rapidamente devido as flores durarem apenas um dia, o armazenamento do mesmo pode ser uma alternativa eficaz para aumentar sua longevidade.

## ARTIGO 1

### **Estabelecimento de meio de cultura para avaliação da viabilidade polínica em cultivares de hemerocale**

Tatiane Eberling<sup>1\*</sup>, Fabíola Villa<sup>1</sup>, Luciana Alves Fogaça<sup>2</sup>, Daniel Fernandes da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica (PUCPR), *Campus* Toledo, PR, Brasil.

\*e-mail: tatiane\_eberling@hotmail.com

(Elaborado segundo as normas da revista *Plant Biosystems*)

**Resumo:** Objetivou-se estabelecer um meio de cultura para avaliação da viabilidade polínica em quatro cultivares de *Hemerocallis*. Em laboratório, a cultivar Morgana A. S. Piske foi utilizada para a realização dos experimentos de estabelecimento do meio de cultura, nos quais testou-se faixas de pH (4, 5, 6, 7) juntamente às concentrações de ágar (4, 6, 8, 10 g L<sup>-1</sup>). No teste seguinte, testou-se concentrações de sacarose (0, 30, 60, 90, 120 g L<sup>-1</sup>). Prosseguindo, adicionou-se ao meio concentrações de ácido bórico (0, 400, 800, 1200 mg L<sup>-1</sup>) e, por fim, foram concentrações de nitrato de cálcio (0, 200, 400 e 800 mg L<sup>-1</sup>). Os testes foram de forma sequencial. Após o estabelecimento do meio de cultura, avaliou-se o tempo de incubação necessário para máxima germinação dos grãos de pólen. O meio obtido foi testado em quatro cultivares, visando verificação as porcentagens de germinação. Maior percentual de germinação *in vitro* ocorreu com as concentrações de 4 g L<sup>-1</sup> de ágar, 74,6 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 800 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 590 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, com pH de 5,74 e tempo ideal de incubação de três horas, sendo Regina a cultivar com maior percentual de germinação.

**Palavras Chave:** *Hemerocallis x hybrida* Hort., pólen *in vitro*, melhoramento genético, planta ornamental.

#### **Introdução**

A hemerocale (*Hemerocallis x hybrida* Hort.) é uma planta florífera conhecida como lírio de São-José, lírio-de-um-dia ou lírio-amarelo. Ela pode ser cultivada em bordaduras ao

longo de canteiros, uma vez que se trata de uma planta que exige pouca manutenção. Além disso, ela possui resistência a períodos de seca, tem a capacidade de adaptação aos mais diferentes tipos de solo e clima, e boa resistência a pragas e doenças (TOMBOLATO, 2004). Botanicamente, as flores do hemerocale são monóclicas, usadas em hibridações inter e intraespecíficas, o que tem proporcionado o surgimento de uma grande diversidade de cultivares com diferentes cores e formas por meio de programas de melhoramento (MENEZES e OLIVEIRA, 2011).

Para que as hibridações ocorram com sucesso, o pólen deve apresentar-se viável e com alto potencial germinativo, o que pode ocorrer não só por fatores intrínsecos ao próprio pólen – relacionados ao seu estado de maturação fisiológica, origem, características genéticas, nutrição da planta –, como, também, por fatores extrínsecos, relativos ao ambiente em que a planta doadora do pólen está cultivada, a exemplo da temperatura, umidade, período de coleta, entre outros (STANLEY e LINSKENS, 1974).

Há pelo menos cinco metodologias para se estimar a viabilidade polínica: a) medidas de respiração ou condutividade química do pólen (raramente usado); b) técnicas de coloração; c) germinação *in vivo* e *in vitro*; d) conteúdo de prolina; e) capacidade de frutificação (STANLEY e LINSKENS, 1974). Desse modo, antes da realização de polinizações, a verificação da capacidade germinativa dos grãos de pólen a serem utilizados é uma forma de averiguar sua viabilidade, subsidiando a realização de inferências sobre problemas de esterilidade intrínsecos das cultivares em estudo, de forma precoce.

A verificação da capacidade germinativa de grãos de pólen pode ser realizada em testes laboratoriais *in vitro*. A técnica de germinação *in vitro* consiste em germinar uma pequena amostra de pólen em um meio de cultura apropriado e a realização da contagem com visualização em microscópio óptico. Entre os fatores que afetam a germinação *in vitro*, estão os componentes químicos, a consistência do meio de cultura e o tempo e condições de incubação. Entre os componentes químicos requeridos em geral para a germinação de grãos de pólen de angiospermas, estão uma fonte de carbono (sacarose), boro (ácido bórico) e, frequentemente, alguns outros nutrientes, como o cálcio (cloreto de cálcio) (GALLETA, 1983).

Knudson (1946); Murashige e Skoog (1962) citam que a escolha do meio adequado ao cultivo de determinada espécie é importante, pois, por meio dele, tecidos e órgãos são supridos com macronutrientes, micronutrientes e outros produtos orgânicos necessários à germinação e ao desenvolvimento *in vitro*. Além da composição do meio de cultura, o período de incubação necessário para a germinação do grão de pólen é um fator de suma importância,

uma vez que está diretamente relacionado a fertilidade do pólen (STANLEY e LINSKENS, 1974), sendo necessário a determinação do tempo ideal para a germinação em cada espécie.

Poucas são as pesquisas relacionando as condições ideais para a germinação dos pólenes *in vitro*, sobretudo em espécies floríferas, ressaltando a importância de estudos desta natureza. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho estabelecer um meio de cultura para avaliação da viabilidade polínica em quatro cultivares de *Hemerocale*.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica (PUC), *Campus* Toledo (PR), durante os meses de janeiro e fevereiro de 2018, período em que as plantas se encontravam em pleno florescimento. As plantas matrizes, das quais foram coletadas as flores para obtenção do pólen, foram adquiridas da empresa Agrícola da Ilha, no ano de 2013, e implantadas na Fazenda Experimental pertencente à mesma instituição.

A área de plantio está localizada sob coordenadas geográficas de latitude 24°43'48"S, longitude 53°44'24"W e altitude de 560 m. O solo da unidade experimental é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS et al., 2013) e o clima, segundo Köppen, classificado como *Cfa*, subtropical mesotérmico úmido, com verões quentes (ALVARES et al., 2013).

As mudas de raiz nua, oriundas de divisão de touceiras, foram plantadas em canteiros com o espaçamento de 0,30 m x 0,30 m, entre plantas, e receberam cuidados constantes, como capinas e irrigação. Ao final de cada ciclo anual, foram realizadas podas, eliminando todas as folhas e adubações com 50 g por planta, da formulação NPK 4-14-08, para renovação da massa verde e fortificação das plantas, preparando-as para a florada a partir de outubro. No ano de 2017, elas foram arrancadas e a área foi novamente encanteirada, sendo que as mudas mais vigorosas das touceiras foram replantadas para realização do estudo.

Foram utilizadas quatro cultivares de *hemerocale*, sendo: Morgana A. S. Piske, Lígia Fagundes Teles, Regina e Luciana Alves Fogaça. A primeira cultivar citada foi escolhida para a realização dos testes iniciais de composição do meio de cultura, uma vez que apresenta maior número de flores e precocidade no florescimento. As flores foram coletadas por volta de nove horas da manhã, quando as anteras se apresentavam completamente abertas – expondo totalmente os grãos de pólen – e imediatamente levadas ao laboratório. Lá, as anteras foram retiradas das flores com o auxílio de uma pinça, enquanto que o pólen foi retirado das anteras com a ajuda de um pincel de cerdas macias e depositado em placas de Petri.

Posteriormente, ele foi distribuído sobre o meio de cultura a ser avaliado, evitando, assim, que as flores pudessem apresentar qualquer anomalia morfológica que influenciasse o resultado final.

Com os pólenes coletados, procedeu-se o estudo do estabelecimento do meio de cultura. Para a sua determinação, inicialmente foram testados quatro faixas de pH (4, 5, 6, 7) e quatro concentrações de ágar da marca Himedia® (4, 6, 8, 10 g L<sup>-1</sup>). O melhor resultado de pH x ágar foi utilizado para o teste seguinte, onde foram testadas cinco concentrações de sacarose (0, 30, 60, 90, 120 g L<sup>-1</sup>). Após a determinação da melhor concentração de sacarose prosseguiram-se os testes, adicionando ao meio de cultivo quatro concentrações de ácido bórico (0, 400, 800, 1200 mg L<sup>-1</sup>) e, por fim, mais quatro de nitrato de cálcio (0, 200, 400, 800 mg L<sup>-1</sup>), sempre em forma sequencial, utilizando o melhor resultado do teste anterior, segundo metodologia proposta por Chagas et al. (2010).

Os componentes do meio de cultura foram devidamente pesados e adicionados à água destilada e, só então, tiveram seu pH aferido. Posteriormente, eles foram levados ao micro-ondas, onde foram aquecidos até a fervura para que ocorresse a dissolução completa dos componentes. Imediatamente após aquecimento, os meios foram vertidos em placas de Petri em volume de 10 mL por placa, onde, após endurecimento do mesmo os grãos de pólen, foram dispersos e incubados em BOD, permanecendo por 24 horas a 25°C na presença de luz até o momento da avaliação. Após o final de todas as etapas, com o meio de cultura ideal pré-estabelecido, pólenes das quatro cultivares foram avaliados nas mesmas condições descritas acima.

A partir do estabelecimento completo do meio de cultura, determinou-se o tempo de incubação necessário para a completa germinação de grãos de pólen das cultivares de hemerocale, realizando contagens do número de pólenes germinados e não germinados a cada hora até a estabilização da germinação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo quatro repetições, e sendo cada repetição representada por uma placa de Petri, nas quais contaram-se o número de grãos de pólen não germinados e o número de grãos germinados em cinco campos de visão em microscópio óptico, num aumento de 10 vezes, transformando os valores obtidos em porcentagem. Foram considerados germinados aqueles que apresentavam tubos polínicos que ultrapassavam o comprimento do diâmetro do próprio grão de pólen (FIGUEIREDO et al., 2013).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão em função de seu caráter quantitativo, e a comparação da porcentagem de germinação entre as cultivares comparadas

pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

## Resultados

Constatou-se que houve interação entre pH e concentração de ágar no meio de cultura, interferindo na porcentagem de germinação dos grãos de pólen. A maior porcentagem de germinação ocorreu em meio de cultura solidificado com 4 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH = 5,74 (Figura 1A). Para a porcentagem de germinação de grãos de pólen, variando as concentrações de sacarose, observa-se um aumento na germinação até a concentração de 74,6 g L<sup>-1</sup>, com posterior decréscimo (Figura 1B).

A adição de ácido bórico ao meio propiciou um aumento na porcentagem de germinação de grãos de pólen, embora de forma discreta, com germinação máxima de 2,56% na concentração de 800 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1C). Ao variar as concentrações de nitrato de cálcio, observou-se que a germinação do pólen aumentou gradativamente até à concentração de 590 mg L<sup>-1</sup>, a partir da qual os percentuais começaram a cair (Figura 1D).

Quando avaliado o tempo para máxima germinação de grãos de pólen de *hemerocale*, verificou-se que a porcentagem de germinação aumentou com o decorrer das horas – até duas horas pós-inoculação – sendo que, após esse período, a partir da terceira hora pode observar-se a estabilização na germinação (Figura 1E).

Finalizado o estabelecimento do meio de cultura ideal para *hemerocale* e determinado o tempo de incubação ideal para máxima germinação dos grãos de pólen da espécie, a análise estatística mostrou diferença significativa entre a porcentagem de germinação do pólen das quatro cultivares estudadas no trabalho (Tabela 1).

A cultivar Regina apresentou maior porcentagem de grãos de pólen germinados em comparação com as demais cultivares, que não diferiram estatisticamente entre si. Apesar da variação na porcentagem de germinação identificada entre as cultivares, todas apresentaram alto percentual de germinação, com valor mínimo de 66% na cultivar Morgana.

## Discussão

Segundo Chagas et al. (2009), a aferição adequada do pH é um importante fator para o meio de cultura, pois influencia diretamente na solidificação do mesmo. Canhoto (2010) afirma que o pH determina vários aspectos importantes da estrutura e atividade das

macromoléculas biológicas. Para a maioria das espécies, o pH ideal dos meios de cultura *in vitro* está próximo de 5,6 a 5,8, o que pode ser aplicado também à hemerocale, pois nestas condições todos os íons estão em solução e facilmente disponíveis para as células. O mesmo autor explica, ainda, que esta faixa de pH favorece o desenvolvimento *in vitro* por ser próxima daquela que em condições naturais envolve as células vegetais.

Ressaltando ainda a importância do pH para o meio, Chawla (2009) cita que valores acima de 7,0 e abaixo de 4,5 geralmente resultam na inibição do crescimento e desenvolvimento vegetal, como também na geleificação do ágar, que nessas condições não é satisfatória, pois torna-se demasiado sólido ou fluído. Para lírios, espécies botanicamente próximas de hemerocale, pHs entre 4,5 e 6,0 proporcionam maior germinabilidade de grãos de pólen de *Lilium formosanum* Wallace (HOLDAWAY-CLARKE et al., 2003), bem como 5,6 é considerado adequado para a germinação de grãos de pólen de *L. longiflorum* Thunb (PERTL et al., 2010).

Corroborando as afirmações acima, Chagas et al. (2010) relatam que a faixa de pH ideal para a germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira está entre 5,2 a 5,8, bem como Silva et al. (2017), que encontraram pH em torno de 5,4 como melhor para germinação de pólen de cinco espécies de fisális. Juntamente com o pH, a concentração de ágar é importante para a solidificação do meio de cultura e garantia de uma boa germinação dos grãos de pólen (ZAMBON et al., 2014). O ágar facilita a sua germinação, pois controla a consistência do meio, equilibrando o potencial osmótico (CHAGAS et al., 2009).

Os meios de cultura líquidos facilitam o desprendimento do tubo polínico, promovendo uma subestimativa da viabilidade, uma vez que os grãos de pólen sem tubo polínico são considerados como não germinados. Por outro lado, altas concentrações de ágar podem atuar como barreira física, dificultando a absorção de água do meio pelo grão de pólen, impedindo assim a emissão do tubo polínico (ALMEIDA et al., 2011).

Não há consenso quanto a concentração de ágar e, conseqüentemente, firmeza do meio necessária para uma boa germinação de grãos de pólen, parecendo estar este parâmetro mais ligado a espécie estudada (RAMOS et al., 2008), como, por exemplo, a utilização de 10 g L<sup>-1</sup> descrita como ótima por Nogueira et al. (2016) para cultivares de pereira, 8 g L<sup>-1</sup> para noqueira inglesa (*Juglans regia* L.), cultivar Geisenheim 251 (JANKOVIĆ et al., 2014) e a utilização de meios líquidos (sem ágar) para a germinação de grãos de pólen de milho (VEIGA et al., 2012).

Entre os constituintes do meio de cultivo, a concentração de sacarose é um fator fundamental (ALMEIDA et al., 2011). Muitos pesquisadores citam a importância da sacarose

na composição dos meios de cultura, tendo em vista que esta tem como finalidade fornecer energia para os processos biossintéticos do crescimento, e na diferenciação e morfogênese das células (CHAGAS et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2013). Assim, a maior porcentagem de germinação com a elevação da concentração de sacarose pode ser justificada pela maior oferta de energia, com favorecimento do crescimento do tubo polínico.

A maior porcentagem de germinação foi encontrada quando se adicionou ao meio 7,4% de sacarose, o que demonstra a sua importância, porém, sem a utilização de concentrações muito altas, acima de 30%, o que, segundo Rossel et al. (1999), podem inibir a germinação dos grãos de pólen, desempenhando papel de regulador osmótico e nutricional, devendo a concentração ideal ser estabelecida de acordo com a espécie em questão.

Corroborando este resultado, mais especificamente para *hemerocale*, Ahn et al. (2003) relatam a necessidade de sacarose para a germinação dos grãos de pólen de duas espécies do gênero, sendo o melhor resultado quando se adiciona 15% de sacarose ao meio, chegando a 68 e 23% de germinação dos pólenes de *Hemerocallis dumortieri* C. Morren e *H. fulva* L., respectivamente.

A adição de cálcio e boro individualmente ao meio propiciou aumento na porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *hemerocale*, no entanto, pode-se observar com o presente estudo que a ação do nitrato de cálcio está ligado à presença de ácido bórico no meio, pois testes prévios adicionando primeiramente o nitrato de cálcio não proporcionaram melhorias no percentual de germinação, ao passo que, quando adicionado após a determinação da concentração ideal de ácido bórico a ser utilizada, o nitrato elevou de forma acentuada a germinação de grãos de pólen.

Pfahler (1968) afirma que o boro maximiza a germinação *in vitro* e a adição do mesmo permite a sua interação com o açúcar, o que forma um complexo ionizável açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares, facilitando o desenvolvimento *in vitro*. Além disso, também realiza papel importante no controle de inúmeras enzimas, desempenhando, assim, ação fisiológica e bioquímica na germinação dos grãos de pólen (KHATTRA e MALIK, 1992).

A exemplo disso, inúmeros estudos comprovam a melhoria da germinação dos grãos de pólen em meio de cultivo enriquecido com boro, como *Datura metel* L. (KATARA e MANKAD, 2016), *Musa velutina* H. WENDL. & DRUDE (SANTOS et al., 2011) e *Dypsis lutescens* (H. Wendl.) Beentje (LIU et al., 2013).

A adição de uma fonte de cálcio é benéfica para viabilizar a germinação de grãos de pólen em algumas espécies, como, por exemplo, o *Physalis* spp. e *Lilium formosanum*

Wallace (SILVA et al., 2017; HOLDAWAY-CLARKE et al., 2003), embora nem todas apresentem necessidade deste nutriente no meio de cultura como genótipos de pereira, usados como porta-enxertos para esta frutífera (CHAGAS et al., 2010).

O aumento da germinação pela adição de cálcio pode estar associado às suas inúmeras funções ligadas a germinação do grão de pólen e desenvolvimento do tubo polínico. De acordo com Steinhorst e Kudla (2013), o cálcio está envolvido na maioria, senão em todos os processos relativos a germinação do grão de pólen. Ainda segundo estes mesmos autores, o cálcio participa no direcionamento do crescimento do tubo polínico, regulação do citoesqueleto, influencia na dinâmica de vesículas e no tráfego através das membranas, tem papel na constituição da parede celular, e atua, também, como mensageiro na prevenção da autofertilização, de forma secundária.

Fang et al. (2016) explicam que a ligação entre cálcio e boro no desenvolvimento do tubo polínico é estreita, pois a concentração de boro no meio intracelular e na parede celular modula diretamente o influxo de cálcio que permeia o grão de pólen em germinação, afetando diretamente o alongamento do tubo polínico, caso ambos nutrientes não se encontrem em proporções adequadas nesta fase. Resultados semelhantes demonstrando essa interação entre cálcio e boro, favorecendo a germinação de grãos de pólen, que podem ser verificados também na viabilidade polínica de ciclamen e noqueira inglesa (KERMANS SHAHANI, 2014; JANKOVIĆ et al., 2014).

Para o pólen de nove cultivares de nespereira, Nogueira et al. (2015) verificaram a necessidade de 5 horas para a máxima germinação de grãos de pólen. No entanto, outras espécies, como, por exemplo, a cerejeira laurel (*Prunus laurocerasus* L.) – uma ornamental pertencente ao gênero *Prunus* – e a oliveira necessitam de longos períodos de incubação para germinação de seus grãos de pólen, sendo 48 e 60 horas, respectivamente (SULUSOGLU e CAVUSOGLU, 2014; SILVA et al, 2016). Estes resultados confirmam que cada espécie ou até mesmo cultivar tem um tempo de incubação ideal para o início e estabilização da germinação *in vitro* (FRANZON e RASEIRA, 2006). Essa diferença na porcentagem de germinação dos grãos de pólen, provavelmente, ocorreu em razão das características intrínsecas de cada genótipo, assim como observado por Souza et al. (2017) em 17 diferentes bromélias e Figueiredo et al. (2013) em cultivares de amoreira-preta.

Essa variação pode ser benéfica, pois permite identificar cultivares com maior viabilidade polínica, que podem ser utilizados como doadores de pólen em futuras hibridações. Além disso, o alto percentual de germinação comprova a eficiência do meio de cultura estabelecido para a germinação de grãos de pólen de diferentes cultivares de

hemerocale, podendo o mesmo ser adotado para hemerocale em geral, ressaltando também a importância do estabelecimento de um meio de cultura próprio para a espécie a ser estudada.

### Conclusões

O meio de cultura para germinação *in vitro* de grãos de pólen de Hemerocale deve ser composto por 4 g L<sup>-1</sup> de ágar; 74,6 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 800 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 590 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, ajustado ao pH = 5,74.

São necessárias três horas para atingir a germinação máxima de grãos de pólen de hemerocale, sendo Regina a cultivar com maior percentual de germinação.

### Referências

- AHN, M.S., JO, J.H., CHOI, S.R., LIM, H.C., CHOI, D.C. e PAK, Y.J. Pollen germination of *Hemerocallis* spp. affected by media type and storage temperature. Korean. **Journal of Horticultural Science and Technology**, v.21, n.4, p. 359-361, 2003.
- ALMEIDA, C., AMARAL, A.L., BARBOSA NETO, J.F. e SERENO, M.J.C.M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.4, p.493-497, 2011.
- ALVARES, C.A., STAPE, J.L., SENTELHAS, P.C., GONÇALVES, J.L.M. e SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2013.
- CANHOTO J. M. **Biotechnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, [s.n.], p. 407, 2010.
- CHAGAS, E.A., BARBOSA, W., PIO, R., CAMPO DALL'ORTO, F.A., TIZATO, L.H. G., SAITO, A., CHAGAS, P.C. e SCARPARE, J.A.F. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Prunus persica* (L.) *Batsch Vulgaris*. **Bioscience Journal**, v.25, n.5, p.8-14, 2009.
- CHAGAS, E.A., PIO, R., CHAGAS, P.C., PASQUAL, M. e BETTIOL NETO, J. E. 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.231- 266, 2010.

CHAWLA, H. S. **Introduction to plant biotechnology**. 3ed. Enfield: Science Publishers, 2009.

FANG, K., GAO, S., ZHANG, W., XING, Y., CAO, Q. e QIN, L. Addition of phenylboronic acid to *Malus domestica* pollen tubes alters calcium dynamics, disrupts actin filaments and affects cell wall architecture. **Plos One**, v.11, n.2, e0149232, 2016.

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

FIGUEIREDO, M.A., PIO, R., SILVA, T.C. e SILVA, K.N. 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. e RASEIRA, M.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.

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

HOLDAWAY-CLARKE, T.L., WEDDLE, N.M., KIM, S., ROBI, A., PARRIS, C., KUNKEL, J.G. e HEPLER, P. K. Effect of extracellular calcium, pH and borate on growth oscillations in *Lilium formosanum* pollen tubes. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.380, p.65-72, 2003.

JANKOVIĆ, D., JANKOVIĆ, S., PAUNOVIĆ S.M., ĆIRKOVIĆ, B. e NIKOLIĆ, Z. Effect of different concentrations of agar, sucrose, boric acid and calcium chloride on pollen germination in english walnut cultivar ‘Geisenheim 251’. **International Journal of Biosciences**, v.4, n.7, p.217-223, 2014.

KATARA. L. e MANKAD, A. **Studies on pollen germination: storage and viability of *Datura metel* L.** Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2016. 76p.

- KERMANS SHAHANI, M., NADERI, R., FATTAHI, R. e KHALIGHI, A. Pollen Germinability and Cross-Pollination Success in Persian cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). **Journal of Ornamental Plants**, v.4, n.4, p.65-73, 2014.
- KHATTRA, S. e MALIK, C.P. **Advances in Pollen Spore Research**. 19 Ed. New Delhi: Today and Tomorrow's Printers and Publishers, p. 139-164, 1992.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, v.15, n.9, p.214-217, 1946.
- LIU, L., HUANG, L. e LI, Y. Influence of Boric Acid and Sucrose on the Germination and Growth of Areca pollen. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, n.8, p.1669-1674, 2013.
- MENEZES, S.P. e OLIVEIRA, A.C. Biologia floral, sistema reprodutivo e métodos artificiais de hibridação de *Hemerocallis hybrida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.1, p.28-34, 2011.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NOGUEIRA, P.V., SILVA, D.F., PIO, R., SILVA, P.A.O., BISI, R.B. e BALBI, R. V. Germinação de pólen e aplicação de ácido bórico em botões florais de nespereiras. **Bragantia**, v.74, n.1, p.9-15, 2015.
- NOGUEIRA, P.V., COUTINHO, G., PIO, R., SILVA, D.F. e ZAMBON, C.R. 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.
- PERTL, H., PÖCKL, M., BLASCHKE, C. e OBERMEYER, G. Osmoregulation in *Lilium* pollen grains occurs via modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity by 14-3-3 proteins. **Plant Physiology**, v.154, n.4, p.1921-1928, 2010.

- PFAHLER, P.L. *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen. II. Pollen source, calcium and boron interactions. **Canadian Journal of Botany**, v.46, n.3, p.235-240, 1968.
- RAMOS, J.D., PASQUAL, M., SALLES, L.A., CHAGAS, E.A. e PIO, R. 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.
- ROSSEL, P., HERRERO, M. e SAÚCO, G. Pollen germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) *in vitro* characterization and optimization of *in vitro* germination. **Scientia Horticulturae**, v.81, n.3, p.251-265. 1999.
- SANTOS, H.G. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. 306p.
- SANTOS, M.R.A., FERREIRA, M.G.R., ROCHA, J.F. e CORREIA, A.O. 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.
- SILVA, D.F., PIO, R., NOGUEIRA, P.V., SILVA, P.A.O. e FIGUEIREDO, A.L. Viabilidade polínica e quantificação de grãos de pólen em espécies de fisális. **Revista Ciência Agronômica**, v.48, n.2, p.365-373, 2017.
- SILVA, L.F.O., ZAMBON, C.R., PIO, R., OLIVEIRA, A.F. e GONÇALVES, E.D. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. **Bragantia**, v.75, n.1, p.26-32, 2016.
- SOUZA, E.H., SOUZA, F.V.D., ROSSI, M.L., PACKER, R.M., CRUZ-BARROS, M.A.V. e MARTINELLI, A.P. Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.4, p.3067-3082, 2017.
- STANLEY, R.G. e LINSKENS, H.F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer-Verlag, 1974. 172 p.

STEINHORST, L. e KUDLA, J. Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1833, n.7, p.1573-1581, 2013.

SULUSOGLU, M. e CAVUSOGLU, A. *In vitro* pollen viability and pollen germination in cherry laurel (*Prunus laurocerasus* L.). **The Scientific World Journal**, v.2014, n.1, p.1-7, 2014.

TOMBOLATO, A.F.C. Hemerocale - *Hemerocallis hybrida*. In: **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, p.176-211, 2004.

VEIGA, P.O.A., VON PINHO, R.G., VON PINHO, E.V.R., VEIGA, A.D., OLIVEIRA, K.C. e DINIZ, R.P. Meios de cultura para germinação de grãos de pólen de milho. **Agrarian**, v.5, n.17, p.206-211, 2012.

ZAMBON, C.R., SILVA, L.F.O., PIO, R., FIGUEIREDO, M.A. e SILVA, K.N. Estabelecimento de meio de cultura e quantificação da germinação de grãos de pólen de cultivares de marmeleiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.400-407, 2014.

Tabela 1 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de quatro cultivares de hemerocale. Toledo, PR, 2019.

Cultivares	Percentagens de germinação
Morgana A. S. Piske	66,09b*
Luciana Alvez Fogaça	66,25b
Ligia Fagundes Telles	68,68b
Regina	72,25 <sup>a</sup>
CV(%)	3,06

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

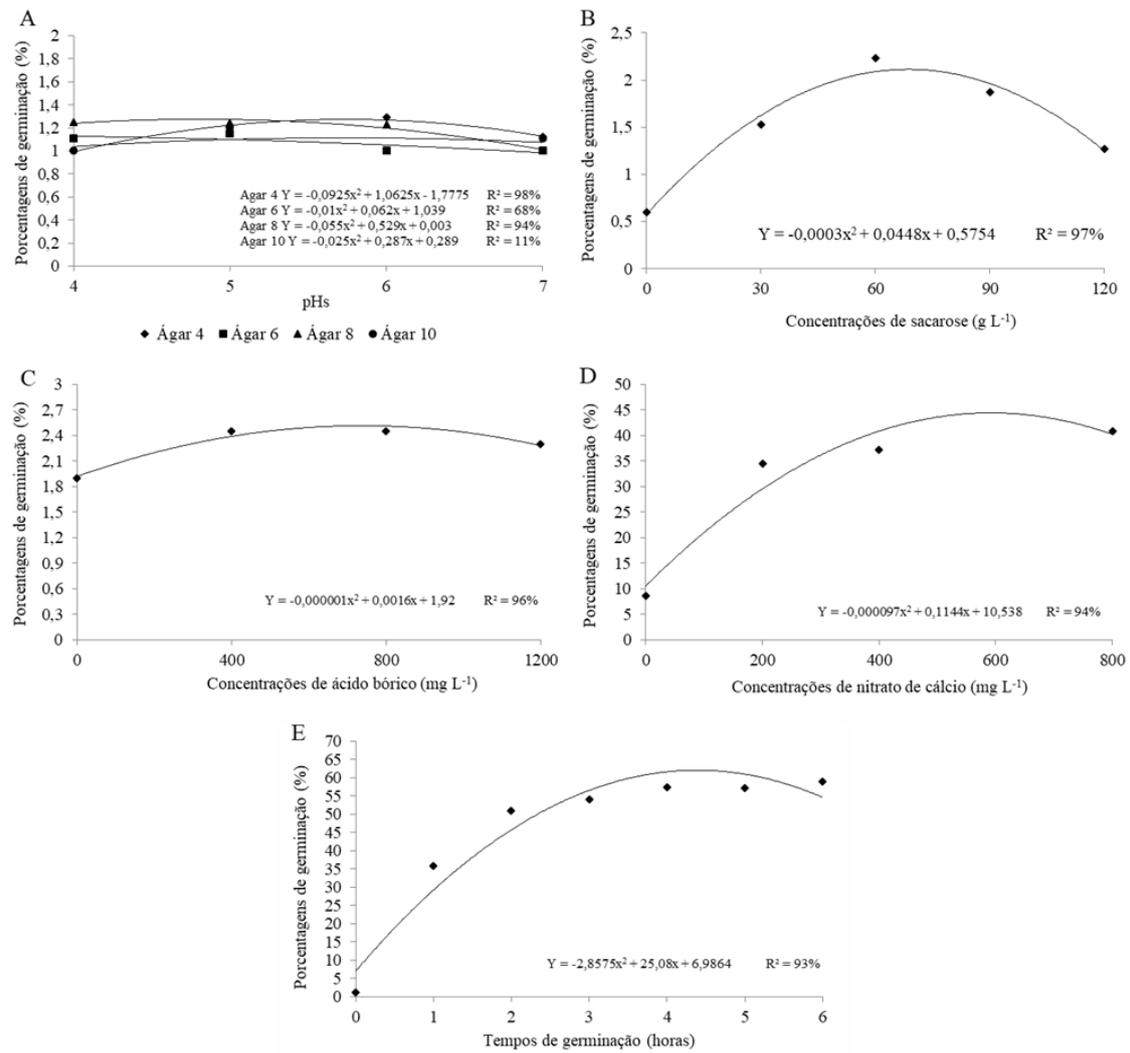


Figura 1 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen de hemerocale em meios de cultura contendo diferentes concentrações de ágar e pH (A), sacarose (B), ácido bórico (C), nitrato de cálcio (D) e porcentagem de germinação ao longo do tempo (E).

## ARTIGO 2

### VIABILITY AND STORAGE METHODS OF HEMEROCALÉ POLLEN GRAIN

#### VIABILIDADE E MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO DO PÓLEN DE HEMEROCALÉ

Tatiane Eberling<sup>1\*</sup>, Fabíola Villa<sup>1</sup>, Daniel Fernandes da Silva<sup>1</sup>,  
Luciana Alves Fogaça<sup>2</sup>, Marcos André Eberling<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* Marechal Cândido Rondon, PR,  
Brasil.

<sup>2</sup>Pontifícia Universidade Católica (PUCPR), *Campus* Toledo, PR, Brasil.

\*e-mail: tatiane\_eberling@hotmail.com

(Elaborado segundo as normas da revista Bioscience Journal)

**ABSTRACT:** The viability of pollen grains is a subject that has few reports and studies, mainly in tropics. The objective of this work was to evaluate the conditions of dehydration and storage of pollen grains on their viability and germination in three cultivars of hemerocale. The experiment was conducted at the Biotechnology Laboratory of the Pontifícia Universidade Católica (PUC), Toledo Campus (PR), during the months of October to January (2018/2019). Three hemerocale cultivars were used, being Morgana A. S. Piske, Regina and Luciana Alves Fogaça. Four times (0, 12, 24, 48 hours) and two drying sites (BOD stove at 25 ° C and Silica gel desiccator) were tested. In vitro germination and pollen viability tests were performed. After the determination of the best time and place of drying, the pollen grains were stored. They were stored in a freezer at  $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , refrigerator at  $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$  and BOD 25°C, for 0, 7, 14, 21 and 28 days. After storage, germination and viability tests were repeated. The pollen grains of the three hemerocale cultivars showed a higher percentage of germination when fresh, not tolerating any of the two methods of dehydration. The best storage site was the freezer, where the pollen kept 70% of its germination, even after 28 days of storage. The dye 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) at 1%, was not efficient in determining the pollen viability of the pollen of hemerocale.

**KEYWORDS:** *Hemerocallis*, germination, pollen grain, *in vitro*, storage.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a hemerocale, também conhecida como lírio-de-são-josé, lírio-de-um-dia e lírio-amarelo, se destaca por apresentar elevado potencial para o setor da floricultura. (TOMBOLATO, 2004).

Hemerocale é uma planta monóica usada em hibridações inter e intraespecíficas, o que tem proporcionado o surgimento de uma grande diversidade de cultivares com diferentes cores e formas por meio de programas de melhoramento (MENEZES & OLIVEIRA, 2011).

A viabilidade de grãos de pólen é um tema que se têm poucos relatos e estudos, principalmente em áreas tropicas. Pesquisas sobre a viabilidade do pólen são de extrema importância, principalmente para programas de melhoramento genético, tanto para se obter genótipos melhorados ou com vigor híbrido e bom pegamento do fruto, quanto para vários tipos de polinização cruzada (BORÉM & MIRANDA, 2007). Várias técnicas são utilizadas para avaliar a viabilidade de grãos de pólen, sendo as mais comuns o teste com corantes químicos e a germinação *in vitro* e *in vivo*, na qual permitem analisar a capacidade de emissão do tubo polínico (PIO et al., 2004).

O estabelecimento de metodologia de conservação de pólen é de grande interesse nos programas de melhoramento, pois permite realizar cruzamentos entre genótipos sem sincronia reprodutiva, como materiais não adaptados e espécies afins (CONNOR & TOWILL, 1993). A preservação da viabilidade de pólen envolve redução do teor de umidade e armazenamento em baixas temperaturas (AKIHAMA et al., 1978).

Cultivares de hemerocale apresentam florescimento sem sincronia e o grão de pólen perde sua viabilidade em um curto espaço de tempo, portanto, o armazenamento do pólen pode ser um método eficaz para aumentar sua longevidade. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de condições de desidratação e armazenamento sobre a viabilidade e germinação de grãos de pólen de três cultivares de hemerocale.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica (PUC), *Campus* Toledo (PR), dentre o período de 16 de outubro/2018 e 25 de janeiro/2019, quando as espécies de hemerocale se encontravam em pleno florescimento. As plantas matrizes, das quais foram coletadas as flores para obtenção do pólen, foram adquiridas em 2013 da empresa Agrícola da Ilha e cultivadas na Fazenda Experimental, pertencente a mesma instituição.

A área de plantio está localizada sob coordenadas geográficas de latitude 24°43'48"S, longitude 53°44'24"W e altitude de 560 m. O solo da unidade experimental é classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef) (SANTOS et al., 2013) e o clima, segundo Köppen, como *Cfa*, subtropical mesotérmico úmido, com verões quentes (ALVARES et al., 2013).

Para a realização do experimento foram utilizadas três cultivares de *hemerocale* (Morgana A. S. Piske, Regina e Luciana Alves Fogaça), escolhidas por produzirem grande quantidade de flores. Estas foram coletadas às 9:00 horas da manhã, com anteras completamente abertas, expondo totalmente os grãos de pólen, sendo imediatamente levadas ao Laboratório. Neste, as anteras foram retiradas das flores com o auxílio de pinça. Os grãos de pólen foram coletados das anteras com ajuda de um pincel de cerdas macias e depositado em placas de petri revestidas com papel alumínio devido ao tamanho dos grãos de pólen.

Foram testados quatro tempos de desidratação dos grãos de pólen (0, 12, 24, 48 horas) e dois tipos de desidratação (estufa tipo BOD a 25°C e dessecador de sílica gel). As placas contendo o pólen foram mantidas abertas nos locais de secagem, onde cada local continha uma placa identificada com cada um dos quatro horários destinada a realização dos testes de germinação e viabilidade e outra para determinação da umidade. Após cada período de secagem, o pólen foi depositado com auxílio de pincel em placas de petri com meio de cultura previamente estabelecido, composto por 4 g L<sup>-1</sup> de ágar; 74,6 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 800 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 590 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio e pH ajustado para 5,74, visando realizar os testes de germinação.

Juntamente com os testes de germinação *in vitro*, examinou-se o uso do corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% como teste de viabilidade polínica. Este corante reflete a atividade das enzimas desidrogenase envolvidas na atividade respiratória de tecidos vivos. Uma amostra de pólen foi distribuída sobre uma lâmina de vidro e em seguida adicionou-se uma gota do corante, fechando o conjunto com uma lamínula.

O delineamento experimental utilizado para métodos de secagem, testes de germinação e viabilidade polínica, foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (4 tempos de desidratação x 2 locais), contendo 4 repetições, sendo cada uma constituída de uma placa de petri e uma lâmina de vidro.

Após a determinação do melhor tempo e local de desidratação, prosseguiu-se com os testes, realizando-se, então, o armazenamento dos grãos de pólen. Os mesmos foram armazenados em frascos do tipo eppendorf em freezer a -20°C ± 3°C, geladeira a 4 ± 3°C e estufa BOD a 25°C (simulando a temperatura do ambiente), por 0, 7, 14 e 21 e 28 dias. Após cada período de armazenamento, repetiram-se os testes de germinação e viabilidade para determinação do melhor local e período de armazenagem.

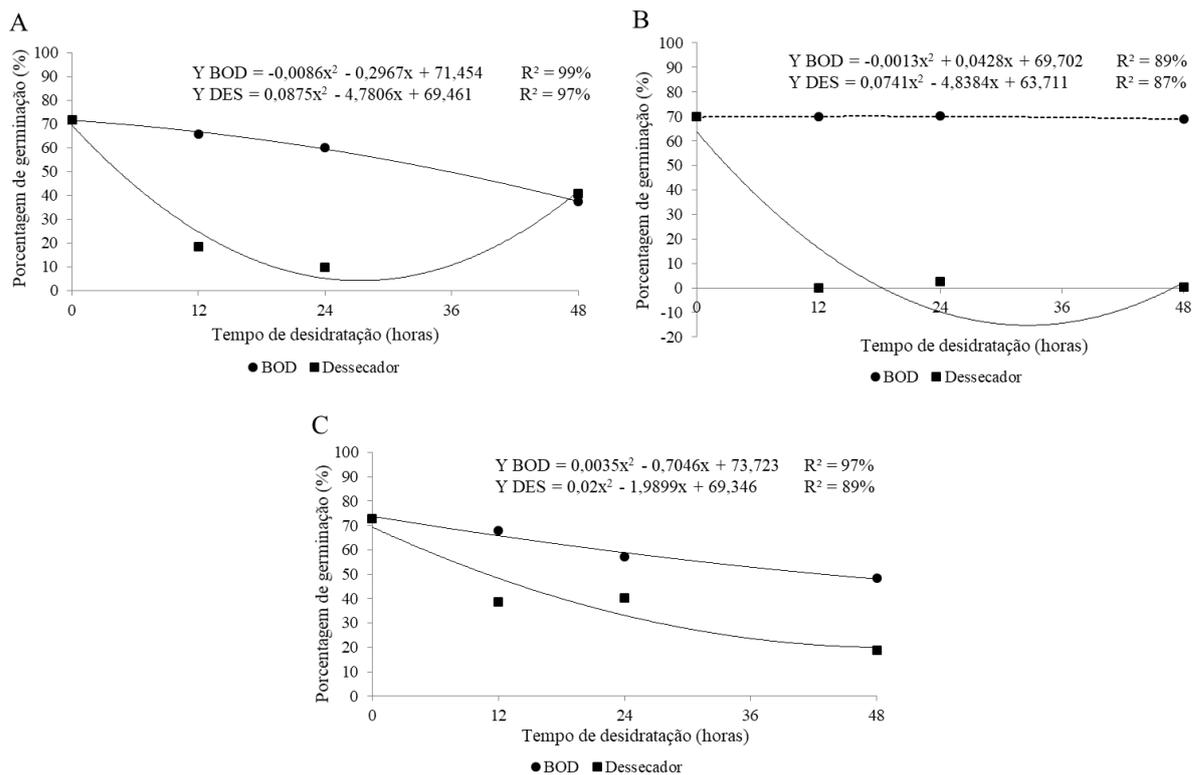
O delineamento experimental utilizado para armazenamento de pólen foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, onde cada horário e local de secagem continha quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de petri nos testes de germinação e uma lâmina para viabilidade, nas quais contaram-se o número de grãos de pólen não germinados e germinados, viáveis e inviáveis em cinco campos de visão em microscópio óptico, em aumento de 10 vezes, transformando os valores obtidos em porcentagem. Foram considerados germinados grãos de pólen que apresentavam tubos polínicos que ultrapassavam o comprimento do diâmetro do próprio

grão de pólen (FIGUEIREDO et al., 2013), e pólen viável aquele que coloriu (vermelho) e inviável aquele que não coloriu (marrom).

As médias das variáveis qualitativas obtidas foram submetidas à análise de variância, sendo posteriormente comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro e a média das variáveis quantitativas submetidas à regressão por meio do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que a desidratação dos grãos de pólen interferiu negativamente na germinação dos mesmos para as três cultivares de hemerocale, independente do local de secagem (BOD a 25°C e dessecador de sílica gel). A maior porcentagem de germinação ocorreu às 0 horas de desidratação, ou seja, com o pólen fresco, logo após ser retirado das anteras e colocado em meio de cultura para germinação em estufa BOD a 25°C (Figura 1).



**Figura 1.** Porcentagem de germinação de grãos de pólen de três cultivares de hemerocale [Morgana A. S. Piske (A), Regina (B) e Luciana Alves Fogaça (C)], submetidos a locais e tempos de desidratação.

Os grãos de pólen podem apresentar um comportamento variável de espécie para espécie no que diz respeito à tolerância à dessecação. Diante disso, o pólen de algumas espécies pode não tolerar a desidratação (FRANÇA et al., 2010). Ferreira et al. (2006) citam que a retirada de água do pólen de milho reduz sua viabilidade. Hecker et al. (1986) afirmam que, em plantas de beterraba, essa

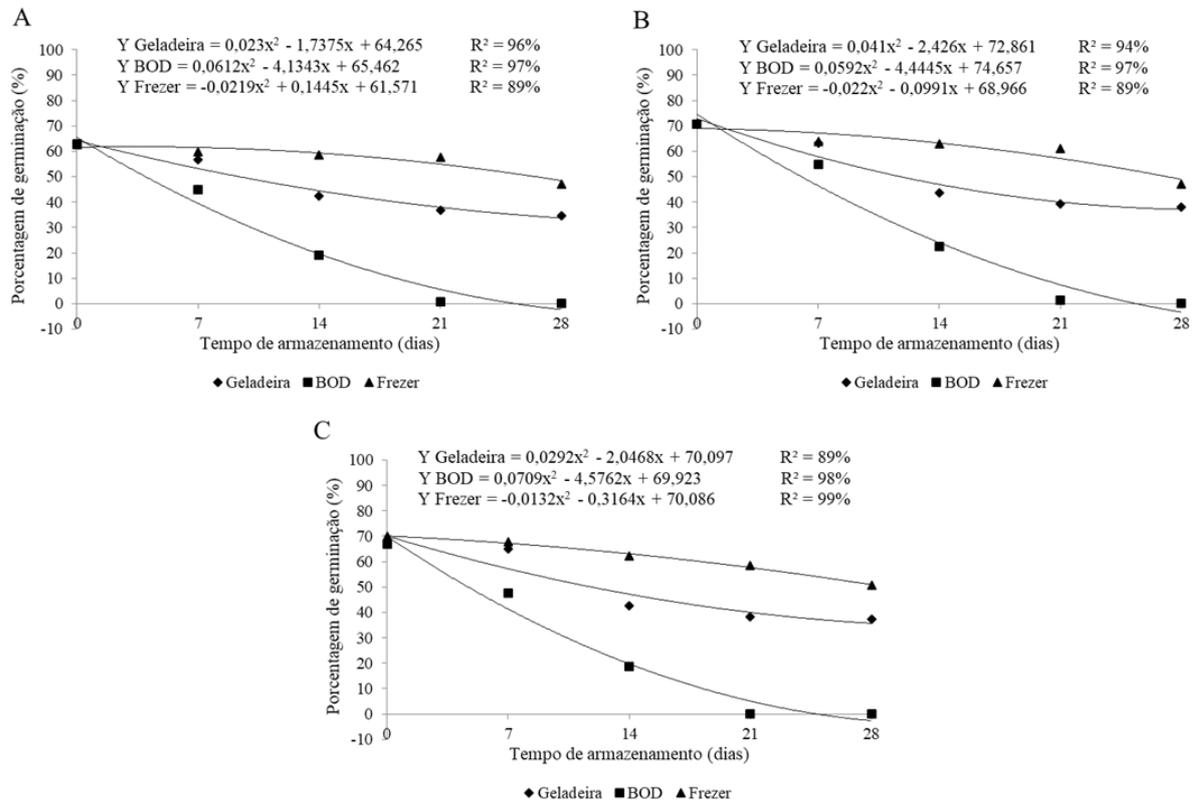
viabilidade é mantida. O processo de dessecação do pólen requer muito cuidado, pois se o pólen estiver extremamente seco, pode perder água de constituição, reduzindo, assim, seu poder germinativo (FRANÇA et al., 2010).

Os grãos de pólen toleram a dessecação até determinado ponto, sendo que, em diferentes espécies, a perda da viabilidade tem correlação com a perda de água e manutenção do estado de desidratação tanto em condições naturais quanto em laboratório (LINSKENS & CRESTI, 1988; NEPI & PACINI, 1993; LISCI et al., 1994).

O uso do corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% como teste de viabilidade polínica para as cultivares de hemerocale não retratou a germinação, apresentando índices muito baixos de coloração dos grãos de pólen, não sendo possível concluir se o pólen não coloriu por estarem inviáveis ou devido a metodologia utilizada não ter sido a adequada para que os grãos reagissem com a solução e colorissem.

Embora a coloração seja um protocolo considerado simples e de baixo custo, ele pode não colorir os grãos de pólen que apresentam exina espessa e/ou mucilaginosas, não revelando a real capacidade de germinação dos mesmos, podendo gerar subestimativas ou superestimativas dos valores de viabilidade (EINHARDT et al., 2006; ALEXANDER, 1980). Munhoz et al. (2008) sugerem a realização de estudos que comparem o método de germinação *in vitro* com o de viabilidade por coloração para verificar qual o corante estima com maior fidelidade a viabilidade polínica, de forma que exista uma correlação entre os métodos.

Após o pólen das três cultivares de hemerocale serem armazenados por 28 dias em freezer ( $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), geladeira ( $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e BOD ( $25^{\circ}\text{C}$ ), pôde-se observar que os mesmos apresentaram comportamento semelhante, onde aquele armazenado em freezer manteve seu potencial germinativo por mais tempo quando comparado com aquele armazenado em geladeira e BOD (Figura 2).



**Figura 2.** Porcentagem de germinação de grãos de pólen de três cultivares de hemerocale [Morgana A. S. Piske (A), Regina (B) e Luciana Alves Fogaça (C)], submetidos a locais e tempos de armazenamento.

Vários autores citam que, independente do período que o pólen é armazenado, para que se tenha sucesso na conservação, fatores como a temperatura, umidade relativa do ambiente de armazenamento e também a umidade do grão de pólen são de extrema importância (LINSKENS, 1964; DEAN, 1965; KHAN et al., 1971; CASALI et al., 1984; BEZDICKOVA, 1989; LACERDA et al., 1995; USMAN et al., 1999; YOGESHA et al., 1999).

O pólen armazenado em estufa BOD, teve sua viabilidade reduzida rapidamente com o decorrer dos dias, não sendo uma boa técnica de armazenamento para longos períodos. Pio et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes ao armazenar pólen de laranjeiras doces, onde observaram que a viabilidade do pólen caiu rapidamente e não passou da terceira semana de armazenamento em nenhuma das cultivares estudadas. Vários autores apresentaram resultados que corroboram aqueles encontrados no presente trabalho, onde constatam que a viabilidade de grãos de pólen armazenados em temperatura ambiente pode ser mantida por no máximo 30 dias (GOMEZ et al., 2000; VAKNIN & EISIKOWITCH, 2000).

Quando armazenado em geladeira (refrigerador), o pólen apresentou-se viável por mais tempo do que quando armazenado em estufa BOD a 25°C, que simula a temperatura do ambiente. Resultados

semelhantes foram encontrados por GOMEZ et al., 2000; SIREGAR & SWEET, 2000; PIO et al., 2007, que armazenaram pólen por vários meses em refrigerador e observaram um decréscimo na viabilidade em função do tempo de armazenamento.

Quando armazenados em freezer, os grãos de pólen mantiveram sua germinação acima dos 70%, mesmo após serem armazenados durante 28 dias. O pólen da cultivar Regina foi o que apresentou a maior porcentagem de perda do seu poder germinativo em relação ao pólen fresco, com 29,03%, seguido da cultivar Luciana, com 27,41% e Morgana, 21,33%. Normalmente, baixas temperaturas estão relacionadas à diminuição do metabolismo dos grãos de pólen, o que propicia uma maior longevidade dos mesmos. Oliveira et al. (2001) encontraram resultados semelhantes, obtendo maior longevidade em pólen congelado de pessegueiro. Kanazawa et al. (1992) observaram perda da capacidade geminativa de pólen de alho quando o mesmo foi mantido armazenado à 5°C. Pio et al. (2007) observaram que o pólen de laranjeira doce, armazenado à -20°C, apresentou maior viabilidade que quando armazenado à 5°C.

Quanto aos testes de viabilidade usando o corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1%, após os períodos de armazenamento pôde-se observar novamente que os resultados encontrados não foram satisfatórios, contradizendo os resultados obtidos com os testes de germinação.

Como descrito anteriormente, o corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1% pode não ser o mais indicado para determinar a viabilidade polínica de *hemerocale*, pois cada corante reage de maneira diferente com as atividades vitais dos grãos de pólen. Futuros trabalhos testando outros tipos de corantes, como o carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio e verde malaquita poderão ser realizados, a fim de determinar qual expressaria melhor a viabilidade polínica dessa espécie.

## CONCLUSÕES

Os grãos de pólen das três cultivares de *hemerocale* apresentaram maior porcentagem de germinação quando frescos, não tolerando nenhum dos dois métodos de desidratação.

O melhor local de armazenagem foi o freezer.

O corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1%, não foi eficiente na determinação da viabilidade polínica do pólen de *hemerocale*.

**RESUMO:** A viabilidade de grãos de pólen é um tema que se tem poucos relatos e estudos, principalmente em áreas tropicais. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar condições de desidratação e armazenamento de grãos de pólen sobre sua viabilidade e germinação em três cultivares de *hemerocale* visando o seu armazenamento. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica (PUC), *Campus* Toledo (PR) dentre os meses de

outubro e janeiro (2018/2019). Foram utilizadas três cultivares de *hemerocale*, sendo Morgana A. S. Piske, Regina e Luciana Alves Fogaça, e testados quatro tempos (0, 12, 24, 48 horas) e dois locais de secagem (estufa tipo BOD a 25°C e dessecador de Sílica gel). Foram realizados testes de germinação *in vitro* e viabilidade polínica. Após a determinação do melhor tempo e local de secagem, realizou-se o armazenamento dos grãos de pólen. Os mesmos foram armazenados em freezer a  $-20 \pm 3^\circ\text{C}$ , geladeira a  $4 \pm 3^\circ\text{C}$  e estufa BOD 25°C, por 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Após o armazenamento, repetiram-se os testes de germinação e viabilidade. Os grãos de pólen das três cultivares de *hemerocale* apresentaram maior porcentagem de germinação quando frescos, não tolerando nenhum dos dois métodos de desidratação. O melhor local de armazenagem foi o freezer. O corante 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 1%, não foi eficiente na determinação da viabilidade polínica do pólen de *hemerocale*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hemerocallis*, germinação, grão de pólen, *in vitro*, armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOZAKI, I. **Further investigation of freezer-drying for deciduous fruit tree pollen.** In long term preservation of favorable germoplasm in arboreal crops. AKIHAMA, T; NAKAJIMA, K. (Eds.). Kokusai Print Service, p. 1-7, 1978.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Baltimore:** Stain Technology, v. 55, p. 13-18, 1980.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- BATALHA, M.O.; BUAINAIN, A.M. **Cadeias produtivas de flores e mel.** Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.
- BEZDICKOVA, A. Viability of sweet pepper stored at freezing temperatures. **Bulletin Vyzkumny a Slechtitelsky Ustav Zelinarsky**, n. 33, p. 51-60. CAB Abstracts, 1989.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas.** 4ª. ed. Viçosa: UFV, 2007. 525p. Disponível em: <<http://www.fag.edu.br/graduacao/agronomia/csvolume42/14.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

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

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.

DEAN, C.E. Effects of temperature and humidity on the longevity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen in storage. **Crop Science**, v. 11, n. 2, p. 125-127, 1965.

ERHARDT, W. **Hemerocallis Daylilies**. Portland, Oregon: Timber Press, 1992, 160 p.

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

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

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

FIGUEIREDO, M.A.; PIO, R.; SILVA, T.C.; SILVA, K.N. 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.

FRANÇA, L.V.; NASCIMENTO, W.M.; CARMONA, R.; FREITAS, R.A. Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 53-59, 2010.

GATLIN, F. L. **An illustrated guide to daylilies**. USA: American Hemerocallis Society, 1999. 100 p.

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

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

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

KHAN, M.N.; HEYNE, E.C, GOSS, A.F. Effect of relative humidity on viability and longevity of wheat pollen. **Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 125-127, 1971.

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

LINSKENS, H.F. Pollen physiology. **Annual Review Plant Physiology**, v. 14, n. 1, p. 225-226, 1964.

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

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

MENEZES, S.P.; OLIVEIRA, A. C. Biologia floral, sistema reprodutivo e métodos artificiais de hibridação de *Hemerocallis hybrida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 28-34, 2011.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER FILHO, P.E.; BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**, v. 72, n. 2, p.527-536, 1993.

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

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

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

SANTOS, H.G. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. 306p.

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

TOMBOLATO, A.F.C. **Hemerocale - *Hemerocallis hybrida***. In: Cultivo comercial de plantas ornamentais. Campinas: Instituto Agronômico, p. 176-211, 2004.

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

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

YOGESHA, H.S.; NAGARAJA, A.; SHARMA, S.P. Pollination studies in hybrid tomato seed production. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 115-122, 1999.