

EFEITO DA TEMPERATURA NO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO DO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

HELLEN CRISTINA DA PAIXÃO MOURA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MARÇO – 2016

EFEITO DA TEMPERATURA NO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO DO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

HELLEN CRISTINA DA PAIXÃO MOURA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas”

Orientadora: Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MARÇO – 2016

EFEITO DA TEMPERATURA NO COMPORTAMENTO
REPRODUTIVO DO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

HELLEN CRISTINA DA PAIXÃO MOURA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas

Aprovada em: 28 de março de 2016

Comissão Examinadora:

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Plant Breeding) – UENF

Prof. Willian Krause (DSc. Genética e Melhoramento de Plantas) - UNEMAT

Prof. Geraldo de Amaral Gravina (DSc. Produção Vegetal) - UENF

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D, Plant Breeding) – UENF
(Orientadora)

Aos meus pais Claudionor Moura e Maria Benedita Moura e à minha irmã Cláudia Moura, pelo apoio incondicional, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus Cristo, pela vida e realização desse sonho;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade;

À FAPERJ, pela concessão da bolsa sem a qual não seria possível a realização dessa conquista;

À empresa Caliman Agrícola, pela doação de material genético para a realização da pesquisa;

Aos trabalhadores da PESAGRO-Rio pelo apoio na implantação, condução e manutenção do experimento no campo.

À minha orientadora Telma Nair Santana Pereira pela orientação;

A todos os Professores do Programa, pelos ensinamentos;

Aos colegas de laboratório, pelo apoio na condução da pesquisa e pela amizade, Loraine, Milene, Rodrigo e Mateus.

Aos meus pais Claudionor e Maria Benedita e à minha irmã Cláudia, por sempre acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem em todas as situações;

Ao Diego Marmolejo pelo apoio incondicional, carinho em todos os momentos e auxílio na condução do experimento;

Ao secretário Daniel, por todo o apoio durante o doutorado;

A todos os que me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 - Aspectos gerais da cultura	5
3.2 - Aspectos florais e anomalias florais	6
3.3 - Biologia Reprodutiva	8
3.4 - Melhoramento do mamoeiro.....	9
3.5 - Gametogênese.....	11
3.6 - Temperatura e reprodução sexual das plantas	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 - Teste de viabilidade polínica	15
4.1.1 - Material Genético e condições experimentais.....	15
4.2.- Efeito da temperatura na viabilidade dos gametas	17
4.2.1 Material vegetal e condições experimentais.....	17

4.2.2 - Teste de germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico <i>in vitro</i>	18
4.2.3 - Teste de germinação e crescimento do tubo polínico <i>in vivo</i>	19
4.2.4- Determinação das temperaturas cardinais.....	20
4.2.5 - Receptividade do estigma	21
4.3 - Análise da composição química dos grãos de pólen submetidos a diferentes temperaturas.....	21
4.3.1 - Análise do conteúdo de amido	21
4.3.2 - Análise de lipídeos	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 - Teste de Viabilidade Polínica	23
5.2 - Efeito da temperatura na viabilidade dos gametas.....	26
5.2.1 - Germinação e crescimento do tubo polínico <i>in vitro</i>	26
5.2.2 - Germinação e Crescimento do tubo polínico <i>in vivo</i>	33
5.2.3 - Temperaturas cardinais.....	38
5.2.4 - Receptividade do estigma	41
5.3 - Análise da composição química dos grãos de pólen submetidos a diferentes temperaturas.....	42
6. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

MOURA, Hellen Cristina da Paixão; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; março 2016. Efeito da temperatura no comportamento reprodutivo do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Orientador: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Rosana Rodrigues.

A temperatura é um fator indispensável para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Variações climáticas como temperaturas baixas ou elevadas durante o florescimento podem afetar a polinização e a fertilização. O desempenho do pólen, que incluem a sua germinação e o crescimento do tubo polínico é componente importante para a produção de frutos/sementes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico, receptividade do estigma e composição química dos grãos de pólen em genótipos de mamoeiro. A viabilidade polínica foi realizada com o corante Alexander em botões florais coletados na antese e fixados em etanol. Na germinação *in vitro* botões florais de plantas hermafroditas foram coletados e os grãos de pólen colocados em solução meio de crescimento (5% de sacarose e 15ppm de ácido bórico), posteriormente colocados em incubadoras nas temperaturas 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C. Na germinação *in vivo*, um dia antes da antese, cinco botões florais de plantas hermafroditas foram coletados e colocados na BOD, em temperaturas já citadas, por um período de 12 horas. Depois, os pistilos foram fixados em FAA por 24hs, amaciados em hidróxido de sódio a 0,5M por 12hs e corados com anilina azul a 0,1% por quatro horas.

Posteriormente, os grãos de pólen e seus tubos polínicos foram visualizados em microscópio Olympus fluorescente. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Skott - knot, utilizando o programa Genes. A receptividade do estigma foi testada com o corante Alfa-naftil e a composição química testada com o corante Lugol para detecção de amido e corante Sudan IV para detecção de lipídeos. Os resultados mostraram que houve efeito significativo entre genótipo, temperatura e genótipo x temperatura. A viabilidade polínica identificou previamente no grupo Formosa: Formosa brilhoso e JS12 (tolerantes), Maradol e Waimanalo (intermediário) e Sekati e Costa Rica (suscetíveis). Grupo Solo: SS72/12 e Golden (tolerantes), Baixo super e Kapoho solo (intermediários) e Triawan (suscetível). Foi observado que em temperaturas baixas, 5 a 15°C, poucos grãos de pólen germinaram e o comprimento do tubo polínico foi menor, porém houve um aumento gradual da germinação e do tubo polínico até o valor máximo de 25 °C. Acima desta temperatura os índices de germinação decresceram. A maior porcentagem de grãos de pólen viáveis na germinação in vitro foi de 90,03 % para Maradol a 25°C e comprimento do tubo polínico também, 295,5 µm, a 25°C. Na germinação in vivo Maradol também obteve maior porcentagem, 68,54 % e comprimento do tubo polínico, 590,5 µm, a 25 °C. O modelo de regressão quadrática permitiu descrever a resposta à temperatura da germinação dos grãos de pólen. As temperaturas cardinais variaram de 2 a 47 °C. Em todas as temperaturas os estigmas foram receptivos, com exceção da temperatura de 45 °C. A histoquímica mostrou que as variações de temperaturas, tanto altas como baixas, não tiveram efeito na composição química do grão de pólen de mamoeiro.

ABSTRACT

MOURA, Hellen Cristina da Paixão; D. Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2016. Temperature effect on the reproductive behavior of papaya (*Carica papaya* L.). Adviser: Telma Nair Santana Pereira; Committeemembers: Messias Gonzaga Pereira e Rosana Rodrigues.

Temperature is an essential factor for growth and development of plants. Climate variations and low temperatures or high during flowering can affect pollination and fertilization. The performance of pollen, including the germination and pollen tube growth are important components for successful fertilization and fruit yield / seed. The objective of this study was to evaluate the effect of temperature on the germination of pollen grains and pollen tube growth, stigma receptivity and histochemistry of pollen in papaya genotypes. The pollen viability was performed with the dye Alexander, using buds collected in anthesis and fixed in ethanol. To evaluate the in vitro germination of pollen grains, buds of hermaphroditic plants were collected and the pollen grains placed in growth medium solution, (5% sucrose and 15 ppm of boric acid) then subsequently placed in incubators at temperatures 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 °C. To evaluate the germination in vivo, one day before anthesis five flower buds of hermaphrodite plants were collected and placed in BOD at temperatures cited previously in a period of 12 hours. After the pistils were fixed in FAA for 24 hours, softened in 0.5M sodium hydroxide for 12hs and stained with 0.1% aniline blue for 4 hours. Subsequently, the pollen grains and their pollen tubes were visualized in fluorescent Olympus

microscope. The stigma receptivity was tested with the alpha-naphthyl colorant and the chemical test with Lugo's stain for detection and starch Sudan IV dye for detection of lipids. The variables were submitted to analysis of variance and means were compared by Skott - Knot test, using the software Genes. The results showed significant effect of genotype, temperature and genotype x temperature. The pollen viability previously identified in the Formosa group: Formosa brilhoso and JS12 (tolerant), Maradol and Waimanalo (intermediate) and Sekati and Costa Rica (susceptible). In the Solo group: SS72 / 12 and Golden (tolerant), Baixo Super and Kapoho Solo (intermediate) and Triawan (susceptible). It was observed that at low temperatures 5 to 15 °C, few pollen grains germinated and the length of the pollen tube was lower, but there was a gradual increase in germination and pollen tube to a maximum of 25 °C value. Above this temperature the germination rates decreased. The highest percentage of viable pollen grains in vitro germination was 90.03% for Maradol at 25 °C and length of pollen tube also 295.5 micrometres to 25 °C. In in vivo germination Maradol also obtained the highest percentage, 68.54% and length of the pollen tube, 590.5 micrometres to 25 °C. The quadratic regression model described the response to the temperature of the germination of pollen grains. The cardinal temperatures ranged from 2 to 47 °C. At all temperatures are receptive stigmas except for the temperature of 45 °C. The immunohistochemistry showed that variations in temperatures, both high and low, had no effect on the chemical composition of the papaya tree pollen grain.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a comunidade científica tem se preocupado com as ameaças das alterações climáticas que afetam a vida de todo o planeta. De acordo com Camargo (2010) e Sivakumar e Stefanski, (2008) é previsto para a América Latina que até 2100 haja um aumento na temperatura média do ar entre 1,1 °C a 6,4 °C sendo que a agricultura e os recursos hídricos serão os mais afetados devido às temperaturas extremas e as mudanças nas precipitações pluviométricas. Além disso, as alterações climáticas também preveem um aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, dentre outros fatores (IPCC, 2007). Essas mudanças terão grandes efeitos nos processos biológicos nas próximas décadas, em especial nas plantas que se reproduzem sexuadamente (Hedhly *et al.*, 2008). Além disso, os modelos climáticos preveem grandes alterações de temperatura durante o dia, com picos de temperatura durante o dia e quedas bruscas de temperatura durante a noite (IPCC, 2013).

Estresses devido a temperaturas altas e baixas causam danos nos tecidos reprodutivos das plantas como a falta de sincronia do desenvolvimento dos órgãos masculinos e femininos, defeitos na estrutura e função dos tecidos (corola, carpelos, e estames), e defeitos na formação dos gametas (Hedly, 2011).

Os processos envolvidos durante a fase reprodutiva das plantas são determinantes na produção final em espécies cultivadas pelos seus frutos e/ou sementes. A predição é de que haverá uma redução na produção de

aproximadamente 10% para cada 1 °C de aumento na temperatura durante a fase de crescimento das plantas (USDA, 2009).

Da mesma forma, estresses devido a altas temperaturas durante a formação dos gametas em plantas, da polinização a fertilização, ou também durante a formação do embrião têm sido relatados como maléficos em várias culturas (Hedhly *et al.*, 2008). A cultura do mamoeiro (*Carica papaya* L.) se adapta bem em regiões com temperaturas entre 21 e 33 °C, sendo que a temperatura ótima é de 25 °C e umidade relativa do ar de 60-85% (Martins *et al.*, 2009). É uma espécie originária da América Central ou, mais precisamente do Sul do México e Costa Rica (Martins *et al.*, 2009). No Brasil a cultura encontrou condições climáticas favoráveis para a sua exploração comercial, sendo amplamente cultivado na região norte do Espírito Santo, no sul da Bahia e Pará (Martins *et al.*, 2009). No Espírito Santo o cultivo ocorre em região onde a temperatura máxima no verão é de 32,3 °C e no inverno 27,3 °C, e as mínimas no verão 22,3 °C e no inverno 14,6 °C (Incaper. es.gov.br).

Apesar da sua boa adaptação ao Brasil, a literatura sobre a cultura do mamoeiro já registra a grande influência da temperatura na expressão sexual das flores (Damasceno *et al.*, 2008; Gaburro, 2007), apresentando alterações florais como a esterilidade de verão (temperaturas altas) além da carpeloidia e pentandria (temperaturas baixas). Assim, a cultura tem problemas sérios de produção de frutos em decorrência de alterações da temperatura, principalmente as altas, que provocam o surgimento da esterilidade do verão que nada mais é a reversão sexual de flores hermafroditas em flores masculinas (Marin *et al.*, 1995). Temperaturas de verão, acima de 35 °C, tendem a provocar o surgimento de flores hermafroditas com o pistilo abortado, por outro lado, flores hermafroditas podem produzir frutos carpeloides quando a temperatura mínima é inferior a 17 °C (Nakasone e Paul, 1998). Storey (1938) propôs que as alterações na expressão sexual são devido a fatores genéticos e ambientais sendo que nos fatores genéticos há dois conjuntos independentes, um afetando o aborto do carpelo (esterilidade de verão) e outro provocando a carpeloidia nos estames.

A temperatura também pode ter um efeito sobre a formação, germinação e crescimento do tubo polínico prejudicando assim a fecundação e formação de frutos e sementes (Parés *et al.*, 2002). Apesar da importância desse elemento ambiental há poucos estudos em mamoeiro, porém já foi observado que a

viabilidade dos grãos de pólen é menor no inverno do que no verão (Nakasone e Paul, 1998); Gaburro, (2007). Cohen *et al.*, (1989) trabalhando com mamoeiro observou que a 5 °C nenhum grão de pólen germinou *in vitro* e a 40 °C o crescimento do tubo polínico foi retardado; a alta umidade relativa (70 - 80%) acelerou o processo de crescimento do tubo polínico comparado com a baixa umidade relativa (30 - 40%).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura na viabilidade dos gametas masculinos e na receptividade do estigma bem como definir temperaturas cardinais para a boa capacidade de germinação dos grãos de pólen de mamoeiro.

Os objetivos específicos foram:

Avaliar a viabilidade polínica de genótipos de mamoeiro cultivados no campo;

Testar a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico *in vitro* cultivado sob diferentes regimes de temperatura;

Testar a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico *in vivo* cultivado sob diferentes regimes de temperatura;

Determinar as temperaturas cardinais para os genótipos;

Testar a receptividade do estigma cultivado sob diferentes regimes de temperatura;

Realizar análise da composição química dos grãos de pólen cultivados em diferentes regimes de temperatura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Aspectos gerais da cultura

O mamoeiro pertence à classe *Eudicotyledonae*, subclasse *Archichlamidae*, ordem *Violales*, subordem *Caricinae*, família *Caricaceae*, gênero *Carica*. A família *Caricaceae* é composta de seis gêneros: *Vasconcellea*, considerado o maior deles, composto por 20 espécies; *Jacaratia*, composto por sete espécies; *Jarilla*, composto por três espécies; *Cylicomorpha* com duas espécies; *Horovitzia* e *Carica* com uma espécie cada. O gênero *Cylicomorpha* é nativo da África equatorial, os gêneros *Carica* e *Jacaratia* são amplamente distribuídos no continente americano, e os gêneros *Horovitzia* e *Jarilla* são restritos à América Central (Badillo, 1971, 2000 e 2001).

Segundo Badillo (1993), o mamoeiro é originário do Sul do México e Norte da América Central, onde se encontra na forma dioica. A maioria dos membros do gênero *Vasconcellea* ocorre ao longo da Cordilheira dos Andes, desde o sul da Bolívia e Peru até a Venezuela, em uma área que forma o centro primário de diversidade do gênero (Aradhya *et al.*, 1999). As espécies *Vasconcellea microcarpa* e *Vasconcelle apubescens* são encontradas nesta região até o norte do Panamá, e espécie *Vasconcellea cauliflora* pode ser encontrada desde o norte ao sul do México (Badillo, 1971).

Apesar de ser nativo do sul do México, nas proximidades da América Central, atualmente o mamoeiro é encontrado em países tropicais e subtropicais.

A história de dispersão do mamoeiro se iniciou aproximadamente no ano de 1500 quando os conquistadores espanhóis levaram sementes para o Panamá e República Dominicana. Durante o século seguinte, viajantes espanhóis e portugueses levaram sementes da espécie para as Filipinas, Malásia e Índia. O mamoeiro foi descrito pela primeira vez em 1526 pelo espanhol Oviedo, que viu o fruto na costa do Panamá e Colômbia. A espécie se propagou rapidamente nos trópicos por encontrar solos propícios e precipitação pluviométrica abundante. Nos anos de 1600, o fruto já era produzido na América Central e do Sul, no Sudeste do México, Antilhas, Bahamas, Bermudas, Sul dos Estados Unidos, posteriormente, em Nápoles, na Itália. A cultura do mamoeiro chegou ao Havaí entre 1800 e 1820. As linhagens do grupo Solo têm sido cultivadas no Havaí desde 1911, provavelmente trazida de Barbados e Jamaica (FAO, 2004).

O fruto do mamoeiro é uma baga de forma variável de acordo com o tipo de flor, podendo ser arredondado, oblongo, alongado, cilíndrico e piriforme. A casca é fina e lisa, de coloração amarelo-clara a alaranjada, protegendo uma polpa de 2,5 a 5,0 cm de espessura e de coloração, que pode variar de amarela, rosada a alaranjada. As sementes são pequenas, arredondadas, rugosas e recobertas por uma camada mucilagínosa, apresentando coloração de acordo com a variedade (Dantas *et al.*, 2002).

3.2 - Aspectos florais e anomalias florais

O mamoeiro é uma espécie considerada trioica, ou seja, pode apresentar plantas masculinas, femininas e hermafroditas (Ming *et al.*, 2007). As flores femininas apresentam ovário grande (em relação à flor hermafrodita) e arredondado, que se afunila para o ápice, onde se inserem cinco estigmas em forma de leque. Por sua vez, a flor hermafrodita apresenta ovário, geralmente alongado, cinco estigmas em forma de leque no ápice e dez estames funcionais, cinco superiores e cinco inferiores, com anteras de cor amarela (Horovitz *et al.*, 1953). As variedades comerciais do mamoeiro, ou são dioicas, apresentando plantas femininas e masculinas, ou são ginodioicas, apresentando plantas femininas e hermafroditas (Yu *et al.*, 2008).

No mamoeiro, temperaturas altas ou baixas podem ocasionar algumas alterações nas flores. Essas alterações são chamadas de anomalias, destacando-se, a carpeloidia, pentandria e a reversão sexual.

A carpeloidia é um tipo de deformação floral provocada pela transformação dos estames em carpelos, de modo que carpelos normais, juntamente com o ovário, são suprimidos em vários graus de desenvolvimento, dando origem a frutos deformados, conhecidos como “cara de gato”, impróprios para a comercialização (Couto e Nacif, 1999). De acordo com Awada e Ikeda (1957) condições de alta umidade no solo, baixas temperaturas e excesso de nitrogênio no solo favorecem a produção de frutos carpeloides, sendo a temperatura o principal fator.

Na flor hermafrodita pentândrica, as pétalas são soldadas e inseridas na base do ovário, os estames ocorrem em número de 5 em vez de 10 conforme observado na flor hermafrodita típica ou alongada, daí a denominação pentândrica. Os frutos formados são arredondados, com cinco sulcos longitudinais profundos, caracterizando-os de modo inconfundível (Couto e Nacif, 1999).

A esterilidade de verão é encontrada em plantas hermafroditas durante os meses mais quentes do ano, daí ser conhecida como esterilidade de verão. Esta anomalia floral é caracterizada pelo pistilo atrofiado, tornando-se não funcional, sendo a flor, neste caso, considerada essencialmente masculina e funcional, ou seja, ocorre a reversão do sexo da forma hermafrodita para a masculina. Por esse motivo, ela não produz frutos, tornando-se, assim, indesejável (Damasceno *et al.*, 2008). Arkle Júnior e Nakasone (1984) constataram que o início da esterilidade ocorre durante a fase de diferenciação do ovário, geralmente seis a sete semanas antes da abertura das flores. O aborto do ovário é observado cerca de cinco semanas antes da antese, portanto, durante a fase de completo desenvolvimento dos estames, uma semana antes do desenvolvimento completo do ovário.

Damasceno *et al.* (2008) avaliando genótipos de mamoeiro dos grupos Solo e Formosa, observaram que a reversão sexual tem uma elevada taxa em temperaturas elevadas e em altas taxas de precipitação pluviométrica, o que conduz a planta a uma situação de estresse. O autor relata que se todas as flores hermafroditas emitidas pela planta fossem convertidas em frutos, poderia ocasionar um elevado desgaste fisiológico, podendo levar a planta, em alguns

casos, até a morte. Ainda segundo o autor os genótipos do grupo Formosa são os mais propensos a ter reversão sexual nas plantas hermafroditas.

3.3 - Biologia Reprodutiva

O processo de polinização inicia-se com o amadurecimento e a exposição do grão de pólen, que por sua vez é exposto a condições ambientais adversas e tem que atingir, durante sua vida, o estigma receptivo (Dafni, 1992). A avaliação da viabilidade do grão de pólen é o primeiro passo no entendimento das chances que ele tem de germinar no estigma da flor, sendo um estágio crucial rumo à fertilização (Dafni, 1992). De acordo com Damasceno Júnior *et al.* (2009b), os grãos de pólen do mamoeiro estão viáveis antes da antese, apresentando alta viabilidade no dia da antese floral. De acordo com estes autores os grãos de pólen podem permanecer viáveis durante três meses quando conservados em *freezer*, e, dependendo do material genético, eles podem se manter com uma alta viabilidade durante seis meses. Gaburro (2007) avaliando linhagens e híbridos em Campos dos Goytacazes/RJ observou que os grãos de pólen de mamoeiro apresentam viabilidade polínica alta no verão (temperatura média de 28,2 °C) comparada com o inverno (temperatura média de 18,5 °C).

Além disso, considerando que 1.000 sementes ou mais podem ser produzidas em um único fruto, um número bem maior de grãos de pólen deve ser depositado no estigma, enquanto ele está receptivo. Frutos com menos de 300 sementes geralmente não são comerciáveis, e quanto mais sementes contêm, maiores são em tamanho (Allan, 1963). Segundo Allan (1969), dados de frutos maduros colhidos na primavera, verão e outono mostraram coeficientes de correlação altamente significativos de até 0,879 entre peso do fruto e peso ou número de sementes normais por fruto.

Segundo Galen *et al.* (1987), a receptividade do estigma é um estágio muito importante da maturação da flor, que pode influenciar grandemente a taxa de polinização. O tempo de receptividade do estigma pode variar de poucas horas a 10 dias. A idade da flor, o horário do dia e a presença ou a ausência de exsudato no estigma são fatores que podem influenciar a receptividade do estigma. A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, como por exemplo, presença de exsudatos e mudança de coloração

no estigma e por testes para verificação de enzimas ativas, como a peroxidase e a esterase (Dafni, 1992).

Da mesma forma, alguns fatores podem influenciar a receptividade do estigma e a germinação dos grãos de pólen. A baixa umidade relativa do ar constitui uma desvantagem porque promove a dessecação da superfície do estigma e, em consequência, sua baixa receptividade, acompanhada de colapso do estilete antes mesmo de o tubo polínico alcançar o ovário, impedindo, assim, o vigamento da semente (Layne, 1983). Parés *et al.* (2002) e Rodríguez *et al.* (1990) relataram que o estigma do mamoeiro está receptivo antes da abertura dos botões florais. Couto e Nacif (1999) relatam que, no caso do mamoeiro, o estigma da flor feminina, ou pistilada, e o estigma da flor hermafrodita, ou bissexual, são receptivos antes e depois da antese, porém, maior receptividade é verificada logo após a antese. Damasceno Júnior *et al.* (2009b) observaram que os estigmas de flores hermafroditas estão receptivos antes e depois da antese, permanecendo assim durante dois dias após a abertura floral. Damasceno Júnior *et al.*, (2009) relatam que o estigma do mamoeiro está receptivo antes da antese, podendo desta forma ocorrer a polinização com a flor fechada, antes da antese, sendo a espécie portanto cleistogâmica.

3.4 - Melhoramento do mamoeiro

O mamoeiro é uma espécie diploide com $2n=2x=18$ cromossomos, com um sistema reprodutivo predominantemente autógamo com cleistogamia, podendo apresentar uma taxa de até 10% de alogamia (Damasceno Júnior *et al.*, 2009b).

Os programas de melhoramento no Brasil objetivam desenvolver cultivares resistentes a doenças, com ausência ou ocorrência mínima de anomalias florais, como carpeloidia, pentandria e esterilidade de verão, frutificação precoce, abundante e com início de floração em altura inferior a 90 cm, peso médio de fruto do grupo Formosa de 800 a 1.300 g e do grupo Solo de 350 a 600 g, casca lisa e sem manchas, polpa vermelho-alaranjada, cavidade ovariana pequena e em formato estrela, polpa com espessura superior a 20 mm, sólidos solúveis acima de 14^o Brix e maior longevidade pós-colheita (Dantas *et al.*, 2002).

O melhoramento genético do mamoeiro é realizado dentro da espécie, utilizando a variabilidade entre genótipos de um mesmo Grupo (Solo e Formosa) ou entre Grupos, sendo que o número de cultivares utilizada no Brasil é bastante reduzido. As cultivares do Grupo Solo são linhagens puras (Ferregueti, 2003), isto é, são geneticamente uniformes, cuja fixação se deveu a sucessivas gerações de autofecundação. As cultivares desse grupo são as mais plantadas comercialmente. No Brasil o maior representante do grupo Solo é a cultivar 'Golden', que surgiu a partir de uma mutação encontrada na linhagem *Sunrise solo* (Pinto *et al.*, 2013).

Sunrise Solo é uma cultivar introduzida do Havaí, conhecida no Brasil como mamão Havaí ou Papaya. O fruto proveniente de planta feminina apresenta forma ovalada e o proveniente de planta hermafrodita, forma piriforme, com peso médio de 500g. Possui casca lisa e firme, polpa vermelho-alaranjada de boa qualidade e cavidade interna estrelada. O início da produção ocorre nove a dez meses após o plantio, produzindo $45 \text{ t/ha}^{-1}/\text{ano}^{-1}$ (Dantas *et al.*, 2002). *Improved Sunrise Solo Line 72/12* também foi introduzida no Havaí em 1982 e melhorada pelo Instituto Capixaba de Pesquisa Agropecuária (Incaper). Apresenta as mesmas características de formato e cor de fruto da cultivar 'Sunrise Solo', porém seu fruto pesa em média 405g. Apresenta boa resistência ao transporte e maior resistência ao armazenamento em relação ao *Sunrise Solo*. O início da produção ocorre a partir do oitavo mês após o plantio, com uma produtividade média de $40 \text{ t/ha}^{-1}/\text{ano}^{-1}$ (Dantas *et al.*, 2002).

O grupo Formosa está representado no Brasil pelo híbrido Tainung 01, que é um genótipo altamente produtivo introduzido no Brasil, de Taiwan e resultou do cruzamento de uma seleção de mamão da Costa Rica, de polpa vermelha, com o *Sunrise Solo* (Martins *et al.*, 2003). O fruto oriundo de planta feminina é redondo-alongado e o oriundo de planta hermafrodita é piriforme-alongado, com peso médio de 800 a 1.300g. Apresenta casca de coloração verde-clara e polpa laranja avermelhada de ótimo sabor e boa resistência ao transporte. O início da produção ocorre nove a dez meses após o plantio, produzindo em média $60 \text{ t/ha}^{-1}/\text{ano}^{-1}$ (Dantas *et al.*, 2002).

Apesar das variedades de mamoeiro mais cultivadas comercialmente pertencerem aos grupos Solo, o grupo Formosa possui híbridos comerciais que vêm conquistando espaço tanto no mercado interno quanto externo, com um forte

crescimento nas vendas principalmente para a Europa, Canadá e Estados Unidos (Dantas e Oliveira, 2009).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em 1996 iniciou um programa de melhoramento genético para o mamoeiro em colaboração com a Empresa CALIMAN Agrícola. Desse trabalho, foram registrados nove híbridos, tendo o UENF/CALIMAN 01 sido lançado em 2002, como o primeiro híbrido nacional. Esse híbrido foi obtido do cruzamento envolvendo linhagens do grupo Solo e do grupo Formosa. Seus frutos são de polpa avermelhada, com peso médio de aproximadamente 1.200 g por fruto, diâmetro do fruto de 9,9 cm, comprimento de 21,5 cm, diâmetro da cavidade ovariana de 5 cm, relação comprimento/diâmetro de 2,2 cm. As sementes são de brilho intermediário, formato ovoide com pouca mucilagem, 10g por 100 sementes frescas (Ferregueti, 2003; Pereira *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2015).

3.5 - Gametogênese

A formação de gametas, a gametogênese, ocorre em células especiais que, após sofrerem divisão celular, meiose e mitose, dão origem aos grãos de pólen (gameta masculino) e ao saco embrionário (gameta feminino). A formação de gametas obedece a uma sequência de eventos e qualquer anormalidade pode resultar em gametas estéreis (Horner e Palmer, 1995). A formação do gameta feminino segue o padrão comum nas Angiospermas, do tipo *Polygonum* (Maheswari, 1950; Gaburro, 2007). Neste tipo, o gametófito funcional é próximo à calaza, já que os três restantes degeneram. Após a degeneração dos três núcleos, o gametófito funcional passa por três divisões mitóticas sucessivas, gerando no final uma célula com oito núcleos ou sete células, o saco embrionário (Reiser e Fischer, 1993; Gaburro, 2007), composto pelo aparato do ovo, núcleos polares e antípodas. O aparato do ovo é formado pela oosfera e duas sinérgides, arranjadas uma configuração triangular. Sua diferenciação ocorre na região final próximo da micrópila. Em contato com o saco embrionário, fica a oosfera, que partilha as faces de sua parede com as sinérgides, considerando que as paredes das células que formam o aparato do ovo são mais espessas quando próximas à base, afinando quando em direção ao ápice (Kapil e Bhatnagar, 1981). As sinérgides são estruturas efêmeras, que degeneram logo após a fertilização, ou

até mesmo antes disso, ocasionando redução do período de viabilidade do saco embrionário. Sua aparência é triangular e exibem, na maioria das vezes, um aparato piriforme (Reiser e Fischer, 1993). Segundo Maheswari (1950), a degeneração das sinérgides acontece logo após a fertilização, ou até mesmo antes desse processo. Na maioria das plantas, uma das sinérgides se degenera antes mesmo da chegada do grão de pólen, ocasionando o colapso dos vacúolos e a liberação de cálcio (Kapil e Bhatnagar, 1981). A função das sinérgides está relacionada com absorção, síntese, entrada e efusão do tubo polínico, acarretando a disseminação das células espermáticas dentro da célula ovo e da célula central, além do transporte de nutrientes, pois com o aumento da área de superfície da membrana plasmática, aumenta-se assim a mobilidade de soluto por meio da membrana (Maheswari, 1950; Kapil e Bhatnagar, 1981; Cameron e Prakash, 1994). A fusão dos dois núcleos polares pode ocorrer antes, durante, ou, às vezes, depois da chegada do tubo polínico no saco embrionário (Cameron e Prakash, 1994). Após a fusão, forma-se o núcleo secundário, agora diploide, cuja localização pode variar, podendo localizar-se próximo da oosfera, ficando separado das células antipodais por um grande vacúolo, ou podendo localizar-se próximo ao centro da célula (Maheswari, 1950). As antípodas, geralmente em número de três, ficam do lado oposto à oosfera, podendo variar de tamanho e número (Reiser e Fischer, 1993). A formação do gameta masculino ocorre no saco polínico durante o desenvolvimento da antera e apresenta duas fases: a microesporogênese e a microgametogênese. Na microesporogênese, as células esporogênicas primárias se diferenciam até alcançarem o estágio de células mãe do micrósporo (CMM). Cada CMM sofre meiose gerando, assim, quatro núcleos haploides denominados micrósporos (Maheswari, 1950; Santos, 2004). Cada micrósporo apresenta citoplasma denso e um núcleo centralizado. Posteriormente, com a formação de um grande vacúolo, o núcleo é deslocado para a extremidade da célula, que aumenta de volume, e sofre uma mitose, originando dois núcleos: um vegetativo e outro reprodutivo ou generativo (Santos, 2004). O núcleo generativo passa por uma mitose e gera os dois núcleos espermáticos que irão participar da dupla fertilização por ocasião da polinização. Santos *et al.* (2008), trabalhando com a formação do gameta masculino em mamoeiro, descrevem dez estádios, indo desde a célula mãe de micrósporos até o grão de pólen maduro, tendo concluído que o grão de pólen é binucleado ou

bicelular, não observando nenhuma anormalidade durante o processo de formação do gameta masculino. Estudos mostram que a formação do grão de pólen em mamoeiro é normal (Santos *et al.*, 2008), e o resultado é sempre alta viabilidade polínica (Damasceno Júnior *et al.*, 2009b).

3.6 - Temperatura e reprodução sexual das plantas

De acordo com Hall (1992), os melhoristas de plantas têm que envidar esforços em desenvolver cultivares com tolerância a temperaturas elevadas. Para tal, devem estabelecer dentro da coleção quais são tolerantes e suscetíveis a altas temperaturas. Cultivares tolerantes a temperaturas elevadas são aqueles que apresentam altas produções, alta qualidade dos produtos, ou alta sobrevivência no campo comparada com os cultivares padrões. Com esse propósito, Kanani *et al.* (2002) estudaram o comportamento de 21 genótipos de amendoim, baseados na germinação dos grãos de pólen e no crescimento do tubo polínico, e conseguiram classificar quatro deles como genótipos tolerantes e três como suscetíveis a alta temperatura.

Altas temperaturas têm sido objeto de preocupação dos pesquisadores, pois a literatura reporta a influência de altas temperaturas sobre a quantidade e morfologia dos grãos de pólen, deiscência da antera e arquitetura da parede do grão de pólen bem como a composição química e o metabolismo do grão de pólen. Todos esses efeitos podem alterar a fertilização e consequente produção de frutos e sementes (Hedhly *et al.*, 2008).

A alta temperatura afeta tanto a fase de formação dos gametas, como na fase de polinização e de fertilização (Hedhly, 2011). Na fase de polinização afeta a receptividade do estigma, o comprimento do tubo polínico e do estilete, comprometendo assim a germinação do grão de pólen (Hedhly, 2011).

Reddy e Kakani (2007) observaram em espécies de *Capsicum* diferenças significativas quanto à germinação dos grãos de pólen *in vitro* e crescimento do tubo polínico com valores médios de 78% e 734 μm , respectivamente. As temperaturas cardinais médias (T_{mim} , T_{opt} , T_{max}) observadas foram 15,2 °C, 30,7 °C, e 41,8 °C para germinação dos grãos de pólen, e 12,2 °C, 31,2 °C, e 40,4 °C, para crescimento do tubo polínico. Os autores com base em um índice cumulativo de resposta a temperatura identificaram espécies tolerantes a altas

temperaturas. Assim, *C. annum* cv. Mex Serrano do México foi identificada como tolerante, *C. chacoense* cv. 1312 e *C. Spp* cv Cobanero da Argentina e Guatemala, respectivamente, como intermediárias, e *C. frutescens* cv Early Spring Giant da China, *C. annum* cv. Long Green da Coreia do Sul, *C. spp.* cv NM89C130 e *C. pubescens* cv. 90002 da Guatemala foram identificadas como sensíveis a altas temperaturas.

Prasad *et al.* (2010) estudando as condições de temperatura e concentração de dióxido de carbono (CO₂) em grãos de pólen de sorgo e amendoim observaram que a longevidade e germinação dos grãos de pólen decresceram de acordo com a elevação da temperatura, sendo que o grão de pólen desenvolvido em alta temperatura e/ou alta concentração de CO₂ não teve maior tolerância à temperatura. Regra geral, grãos de pólen são mais sensíveis a estresse ambiental do que o óvulo.

Entretanto, Hedhly *et al.* (2005) estudaram o efeito da temperatura no grão de pólen e no óvulo de pêssegos (*Prunus persica*) e observaram que esses órgãos respondem diferentemente a alterações da temperatura. Para o gameta masculino os autores observaram que um aumento da temperatura correspondeu a um aumento na germinação do grão de pólen e na cinética do crescimento do tubo polínio, enquanto que um aumento da temperatura decresceu enormemente a receptividade do estigma. Este efeito oposto da temperatura no órgão masculino e feminino da planta dá uma plasticidade para suportar os efeitos das mudanças ambientais assegurando um bom nível de fertilização.

As temperaturas cardinais são de grande importância para compreender o limite de temperatura média diária em que começa uma redução detectável na planta. A temperatura mínima é um valor em que abaixo dele não ocorre o desenvolvimento da planta. Temperatura máxima é aquela em que acima do valor indicado, o desenvolvimento e crescimento da planta são interrompidos. Vários trabalhos têm determinado essas temperaturas para espécies cultivadas (Kakani *et al.*, 2002; Bineli *et al.*, 2005; Hedly, 2011; Acar e Kakani, 2010; Kakani *et al.*, 2005; Omanga *et al.*, 1995) e o valor vai variar entre os genótipos da espécie e entre as condições ambientais da espécie.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Teste de viabilidade polínica

4.1.1 - Material Genético e condições experimentais

Neste experimento foi feita a análise da viabilidade polínica em 26 genótipos de mamoeiro, 12 do grupo Solo, 12 do grupo Formosa e nos híbridos 'UENF/Caliman01' e 'Tainung01' (Quadro 1) pertencentes ao Banco ativo de Germoplasma UENF/Caliman, localizado na área experimental da Empresa Caliman Agrícola S/A, no município de Linhares/ES. As coordenadas geográficas do local são 19°06' e 19°18' de latitude sul, 39°45' e 40°19' de longitude oeste e altitude de 30m. O clima da região é do tipo Awi de Koppen (tropical úmido), com chuvas no verão e seco no inverno, o relevo é plano formando os chamados platôs litorâneos (Rolim *et al.*, 1999). A precipitação anual média é de 1250 mm, a temperatura média de 23 °C e umidade relativa média do ar de 83,5% (Rolim *et al.*, 1999; SIAG, 2006). A área experimental possui solo classificado como Podzólico Vermelho Amarelo, distrófico, coeso, bem drenado e textura arenosa (Gomes Filho, 2005).

O experimento foi estabelecido empregando um espaçamento de 3,7 m entre linhas e de 1,5 m entre plantas, irrigado por gotejamento e utilizando plantas no segundo ano de produção, com o objetivo de identificar genótipos tolerantes

e/ou susceptíveis a altas temperaturas. Os tratos culturais foram os mesmos adotados nos plantios comerciais da empresa.

Quadro 1. Descrição dos Genótipos utilizados no teste de viabilidade polínica conservados no Banco ativo de Germoplasma UENF/CALIMAN

Item	Genótipo	Grupo heterótico
1	Caliman M5	Solo
2	Sunrise Solo 783	Solo
3	Triawan ET	Solo
4	Diva	Solo
5	Grampola	Solo
6	Sunrise Solo 7212	Solo
7	Golden	Solo
8	Kapoho Solo (polpa amarela)	Solo
9	Kapoho Solo (polpa vermelha)	Solo
10	Baixinho Santa Amália	Solo
11	São Mateus	Solo
12	Baixo Super	Solo
13	Costa Rica	Formosa
14	Tailândia	Formosa
15	Waimanalo	Formosa
16	Bené	Formosa
17	Maradol (México)	Formosa
18	Maradol (grande Limão)	Formosa
19	Sekati	Formosa
20	JS 12	Formosa
21	Cariflora	Formosa
22	FG (Formosa Golden)	Formosa
23	FB (Formosa Brilhoso)	Formosa
24	Sekati (Fruto longo Macuco)	Formosa
25	UENF/Caliman-01	Híbrido
26	Tainung01	Híbrido

A identificação dos genótipos resistentes e/ou suscetíveis à alta temperatura foi realizada via teste de coloração com solução tripla de Alexander (Alexander, 1969). Para tal, botões florais em antese foram coletados na época do verão de 2013, na 3ª semana do mês de janeiro onde a temperatura média no dia da coleta foi de 31,3°C e posteriormente colocados em solução de etanol a 70%. Anteras de cada genótipo foram *squashed* em gota do corante e após o preparo da lâmina a mesma foi observada sob microscópio ótico em objetiva de 20X. Foram preparadas cinco lâminas por genótipo e em cada lâmina foram contados 250 grãos de pólen sendo no total 1250 grãos de pólen contados por genótipo. Grãos de pólen corados de vermelho púrpuro foram considerados viáveis e grãos

de pólen corados de verde foram considerados inviáveis (Alexander, 1969). As imagens dos grãos de pólen viáveis e inviáveis foram capturadas com câmera CCD 12 bits acoplada ao microscópio óptico *Olympus BX 60*, utilizando o *Software Image-Pro Plus* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

A porcentagem de viabilidade polínica foi estimada empregando a seguinte expressão:

$$GPV (\%) = \frac{(GPV)}{(GPT_c)} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde= GPV = porcentagem de viabilidade polínica final; GPV_c = número de grãos de pólen viáveis por campo; GPT_c = total de grãos de pólen por campo.

Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 26 tratamentos (genótipos) e cinco repetições sendo cada lâmina considerada como uma repetição.

Os dados resultantes da variável GPV foram submetidos à análise de variância utilizando o programa GENES (Cruz, 2013). As médias dos genótipos foram comparadas empregando o teste de agrupamento de médias de Scott - Knott. Considerando o agrupamento realizado pelo teste e as médias da GPV, os genótipos foram classificados como: Suscetíveis, Intermediários e Tolerantes. Assim:

Suscetíveis= $GPV < 69,9\%$

Intermediários= $70\% \leq GPV \leq 89,90$

Tolerantes= $GPV \leq 90\%$

4.2.- Efeito da temperatura na viabilidade dos gametas

4.2.1 Material vegetal e condições experimentais

Conforme descrito anteriormente, a partir do teste de viabilidade polínica (experimento I), foram selecionados 14 genótipos para realizar a avaliação do efeito da temperatura nos gametas, sendo do grupo Formosa: Formosa brilhoso e JS12 (Tolerantes), Maradol e Waimanalo (intermediário), Sekati (Fruto longo macuco) e Costa Rica (suscetíveis). Do grupo Solo: SS72/12 e Golden

(Tolerantes), Baixo super e Kapoho Solo polpa vermelha (Intermediários), Triawant ET e Grampola (Suscetíveis), além dos híbridos Tainung01 e UENF/Caliman01.

Esses genótipos selecionados foram semeados em tubetes na casa de vegetação e com aproximadamente 40 dias após o semeio foram transplantados para a área experimental da PESAGRO-RJ, localizada no município de Campos dos Goytacazes/RJ. Com a finalidade de ter um controle local o experimento foi estabelecido plantando os genótipos com duas repetições e quatro plantas por parcela. O espaçamento foi de 3,2 m entre linhas e de 1,6 m entre plantas. A irrigação foi feita com microaspersão (Figura 1-A). Foram plantadas três mudas por cova (Figura 1-B) e na época do florescimento foi realizada a sexagem das plantas, mantendo apenas as plantas hermafroditas.

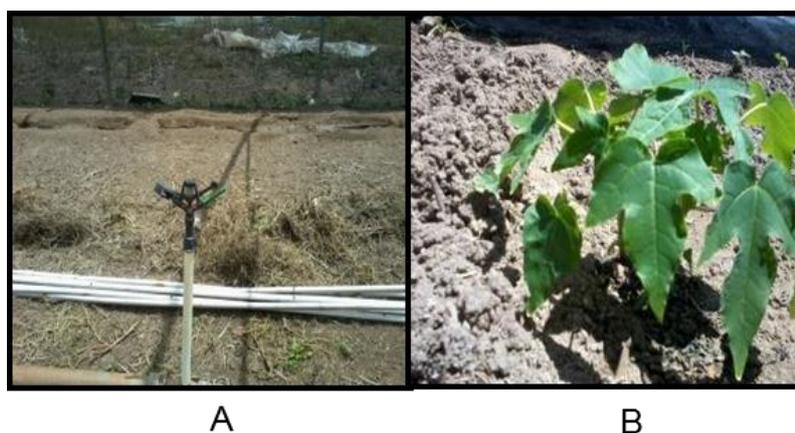


Figura 1: Plantio de mudas de mamão na área experimental da Pesagro/RJ. A- Microaspersor. B- Mudanças de mamão na cova.

4.2.2 - Teste de germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico *in vitro*.

Para realizar esta avaliação, botões florais dos 14 genótipos foram coletados e os grãos de pólen distribuídos em lâminas contendo gotas do meio de cultura preparado com uma solução de 5% de sacarose e 15 ppm de ácido bórico (Freitas *et al.*, 2012). As lâminas foram colocadas em BOD nas temperaturas controladas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C por um período de 6 horas. Foram considerados grãos de pólen viáveis, com comprimento do tubo polínico superior ao diâmetro do grão de pólen. A contagem dos grãos de pólen

germinados foi feita ao acaso em três campos diferentes usando uma objetiva de baixa magnitude (10x).

A porcentagem de germinação dos grãos de pólen final foi calculada empregando a seguinte expressão:

$$PG (\%) = \frac{(GPG_c)}{(TGP_c)} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: PG = porcentagem de germinação de grão de pólen; GPG_c = número de grãos de pólen viáveis por campo; TGP_c = número total de grãos de pólen por campo.

Para todas as medições do crescimento do tubo polínico, três áreas foram analisadas em cada lâmina, ao acaso e dez tubos polínicos foram observados e mensurados usando o *software Image-Pro Plus* (versão 5.1, *Media Cybernetics*) acoplado ao microscópio Olympus 60X.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com esquema em fatorial 14×6 (14 genótipos \times seis temperaturas), utilizando cinco repetições e considerando cada lâmina como uma repetição. As variáveis PG e crescimento do tubo polínico (CTP) foram submetidas à análise de variância utilizando o programa Genes (Cruz, 2013). As médias dos genótipos foram comparadas pelo teste de agrupamento de médias de Skot - Knott.

4.2.3 - Teste de germinação e crescimento do tubo polínico *in vivo*

Um dia antes da antese, botões florais de plantas hermafroditas dos 14 genótipos foram identificados e protegidos com saco de papel manteiga. No dia da abertura floral, os botões foram coletados em uma placa de petri com papel filtro umedecido e colocados em incubador com temperaturas controladas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C.

Após vinte e quatro horas os pistilos foram coletados e tratados de acordo com Damasceno Junior *et al.* (2009b), sendo a fixação em FAA, posteriormente amaciados em solução 0,5M de hidróxido de sódio. Após isto foram corados com anilina azul a 0,1% por 24 horas. Foram preparadas cinco lâminas/genótipo/temperatura. Posteriormente os grãos de pólen e seus tubos

polínicos foram visualizados em microscópio Olympus fluorescente com filtros de excitação de 370 nm e emissão 509 nm, com objetiva de 20x e 40x.

Foram considerados grãos de pólen germinados aqueles cujo tubo polínico apresentou comprimento superior ao diâmetro do grão de pólen. A porcentagem de germinação do grão de pólen (PG) foi estimada empregando a equação 1. A medição do tubo polínico foi realizada mensurando 10 tubos polínicos em três áreas de cada lâmina ao acaso. As mensurações do crescimento do tubo polínico (CTP) foram feitas com o auxílio do Programa *CellSens Standard 1.8* (Olympus).

O delineamento experimental e a análise estatística das variáveis PG e CTP foram os mesmos descritos no teste de germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico *in vitro*.

4.2.4- Determinação das temperaturas cardinais

As médias de germinação dos grãos de pólen *in vitro* e *in vivo* foram analisadas empregando o modelo de regressão quadrática para estimar as temperaturas cardinais conforme Kakani *et al.* (2002). Os parâmetros do modelo de regressão foram estimados pelo programa Genes (Cruz, 2013). As temperaturas ótima (Totm), mínima (Tmin) e máxima (Tmax), foram estimadas pelas equações 3, 4 e 5:

Germinação do grão de pólen = $a + bT + aT^2$

$$T_{otm} = \frac{-b}{2a} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$T_{min} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad \text{Eq. (4)}$$

$$T_{max} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde: T representa a temperatura real do genótipo; a, b e c, representam as constantes específicas de cada genótipo para o modelo de regressão.

4.2.5 - Receptividade do estigma

No dia da abertura floral, cinco botões florais dos 14 genótipos identificados no teste de viabilidade polínica foram coletados em plantas hermafroditas. Os botões florais foram depositados em placa de petri com papel filtro embebidos em água e colocados em incubadoras, por 24 horas, com temperaturas controladas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 °C). Posteriormente, a receptividade do estigma foi testada conforme Damasceno Junior *et al.* (2009). Assim, os estigmas foram imersos numa solução de alfa-naftil, sendo classificados como receptivos aqueles que apresentaram uma coloração escura.

4.3 - Análise da composição química dos grãos de pólen submetidos a diferentes temperaturas

Nesta análise os grãos de pólen dos genótipos SS72/12, JS12 e UENF/Caliman-01 foram testados para avaliar a consequência da temperatura na composição química do grão de pólen.

No dia da abertura floral, cinco botões de cada genótipo foram coletados em plantas hermafroditas. Os botões florais foram depositados em placa de petri com papel filtro embebidos em água e colocados em incubadoras, por 24 horas nas temperaturas controladas (15 e 45 °C). Após esse período as anteras foram removidas sob microscópio estereoscópico, em laboratório.

4.3.1 - Análise do conteúdo de amido

Após 24 horas em temperatura controlada na BOD, as anteras foram removidas sob microscópio estereoscópico e depois foram colocadas em etanol a 70% e guardados na geladeira. A análise do amido foi realizada através da solução de lugol que é um corante utilizado para detectar amido no grão de pólen. No caso de presença de amido o grão de pólen corado com essa solução apresenta cor preta azulado (Johansen, 1940).

4.3.2 - Análise de lipídeos

Após 24 horas em temperatura controlada na BOD, as anteras foram removidas sob microscópio estereoscópio e depois foram colocados em etanol a 70% e guardados na geladeira. A detecção de lipídeos foi realizada com o corante Sudan IV em que na presença de lipídeos os grãos de pólen apresentam coloração avermelhada (Damasceno *et al.*, 2009b).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Teste de Viabilidade Polínica

A solução tripla de Alexander foi eficiente em distinguir grãos de pólen viáveis e inviáveis (Figura 2). Esta solução é composta por três corantes: verde malachita que colore de verde a parede do grão de pólen, o Orange G que intensifica a coloração e a fucsina básica que cora o citoplasma de vermelho devido ser específico para DNA (Alexander, 1969). Esta solução reage com os grãos de pólen, distinguindo os viáveis, cuja coloração é vermelho/púrpura (Figura 2-A). Os grãos de pólen inviáveis não ficaram corados ou não estiveram totalmente corados (Figura 2-B e C).



Figura 2. Grãos de pólen de viáveis e inviáveis de mamoeiro após coloração com a solução Tripla de Alexander. A- Grão de pólen viável mostrando o núcleo totalmente corado. B- Grão de pólen inviável mostrando o citoplasma plasmolizado. C- Grãos de pólen viáveis e inviáveis.

As médias de viabilidade polínica dos genótipos do grupo Solo apresentaram diferenças significativas, sendo formados quatro grupos pelo agrupamento de médias do teste de Skott-Knott (Tabela 1). Os genótipos do grupo I apresentaram médias variando de 88,6 a 96%. Por sua vez, os genótipos do grupo II apresentaram médias variando de 80 a 87,6%. Já os grupos III e IV foram formados por um genótipo cada um, sendo o Grampola e Triawan ET com médias de 72,2 e 62,8%, respectivamente. Conforme explicado no tópico 4.1.1, o agrupamento e as médias de viabilidade polínica foram utilizados para classificar os genótipos em tolerantes, intermediários e suscetíveis a temperaturas elevadas. Desta forma, três genótipos foram considerados tolerantes, oito intermediários e um susceptível (Tabela 1). Para avaliar o efeito da temperatura na viabilidade dos gametas foram selecionados os genótipos: SS72/12 e Golden (Tolerantes), Baixo super e Kapoho Solo polpa vermelha (Intermediários), Triawant ET e Grampola (Suscetíveis).

Tabela 1. Porcentagem de viabilidade polínica de 12 genótipos de mamoeiro do Grupo Solo avaliados na época do verão/2013

Genótipos	Viabilidade polínica (%)	Grupo	Classificação
SS 72/12	96,0a	I	Tolerante
Golden	93,4a		Tolerante
Kapoho Solo (Polpa amarela)	91,8a		Tolerante
Baixo Super	88,6a		Intermediário
Kapoho Solo (Polpa vermelha)	87,6b		Intermediário
São Mateus	84b	II	Intermediário
Baixinho Santa Amália	83,2b		Intermediário
Diva	83b		Intermediário
Caliman M5	82,6b		Intermediário
Sunrise Solo 783	80 b		Intermediário
Grampola	73,2c	III	Intermediário
Triawan ET	62,8d	IV	Suscetível
Média	83,8		

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo, pelo critério de agrupamento de Skott - Knott ($p < 0,05$).

No grupo Formosa as médias de viabilidade polínica dos genótipos avaliados apresentaram diferenças significativas, sendo formados quatro grupos pelo teste de agrupamento (Tabela 2). Os genótipos do grupo I apresentaram médias variando de 90,04 a 97,2%. O segundo grupo foi formado por genótipos

apresentando médias variando de 75,4 a 86,6%. No terceiro grupo foi formado pelo genótipo Tailândia e o quarto grupo foi formado por genótipos com médias variando de 61,2 a 63,6%. De acordo com os critérios descritos no tópico 4.1.1, cinco genótipos foram classificados tolerantes, quatro intermediários e dois susceptíveis (Tabela 2). Para avaliar o efeito da temperatura na viabilidade dos gametas foram selecionados os genótipos: Formosa brilhoso e JS12 (Tolerantes), Maradol e Waimanalo (intermediários), Sekati (Fruto longo macuco) e Costa Rica (susceptíveis).

O Grupo Formosa teve maior número de genótipos com percentual de viabilidade polínica, acima de 90%, considerado tolerante, ao contrário do Grupo Solo que teve um maior número de genótipos classificados como intermediário. A maior porcentagem de viabilidade polínica de genótipos do grupo Formosa tem sido documentada. Por exemplo, Damasceno Junior *et al.* (2008) estudando a viabilidade do pólen em dois genótipos de mamoeiro, um do Grupo Solo e outro do Grupo Formosa, observaram que a média de viabilidade foi maior no representante do Grupo Formosa (Tainung01) com média de 93,7%, diferente do representante do Grupo Solo (Golden) que teve média de 81,9%.

Tabela 2. Porcentagem de viabilidade polínica de 12 genótipos de mamoeiro do Grupo Formosa avaliados na época do verão/2013

Genótipo	Viabilidade polínica (%)	Grupo	Classificação
FB (Formosa Brilhoso)	97,2a		Tolerante
JS 12	95,8a		Tolerante
FG (Formosa Golden)	91,8a	I	Tolerante
Maradol (México)	91,8a		Tolerante
Cariflora	90,4a		Tolerante
Maradol (Grande limão)	86,6b		Intermediário
Waimanalo	82,4b	II	Intermediário
Bené	81,2b		Intermediário
Tailândia	75,4c	III	Intermediário
Sekati	63,6d		Susceptível
Sekati (Fruto longo macuco)	63,0d	IV	Susceptível
Costa Rica	61,2d		Susceptível
Média geral	81,7		

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo, pelo critério de agrupamento de Skott - Knott ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os híbridos, ambos apresentaram viabilidade polínica acima de 90%, sendo assim considerados tolerantes (Tabela 3). O híbrido UENF/Caliman-01, que foi obtido a partir de um genitor do Grupo Solo (Sunrise Solo 72/12) e outro genitor do Grupo Formosa (JS12), apresentou alta viabilidade polínica assim como seus genitores.

Tabela 3. Porcentagem de viabilidade polínica dos híbridos de mamoeiro avaliados na época do verão/2013

Genótipo	Viabilidade polínica (%)	Classificação
UENF/Caliman-01	93,0a	Tolerante
Tainung01	90,2a	Tolerante
Média geral	91,6	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A viabilidade do grão de pólen é um fator chave no processo de polinização e é o primeiro fator a contribuir para as chances que tem de germinar no estigma da flor, sendo importante para o processo de fertilização (Dafni, 1992, Damasceno Junior *et al.*, 2009). De acordo com Silva *et al.* (2000), métodos que determinem a viabilidade do pólen são importantes em programas de melhoramento, pois permitem uma avaliação prévia sobre genótipos tolerantes a estresses causados pela temperatura. Da mesma forma, a viabilidade polínica é muito importante na produção de frutos nas lavouras comerciais de mamoeiro.

5.2 - Efeito da temperatura na viabilidade dos gametas

5.2.1 - Germinação e crescimento do tubo polínico *in vitro*

Com base na análise de variância, verificou-se que existem diferenças significativas a 1% de probabilidade entre os 14 genótipos avaliados para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Da mesma forma, para a temperatura e a interação genótipos x temperaturas foram observadas diferenças significativas a 1 de probabilidade (Tabela 4). Estes resultados indicam que existe expressiva variabilidade genética entre os genótipos avaliados quanto à germinação *in vitro*.

Além disso, as significâncias da temperatura e da interação indicam que existe uma influência da temperatura na viabilidade polínica e uma resposta diferenciada dos genótipos em pelo menos uma temperatura avaliada.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para germinação *in vitro* dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro submetidos a diferentes temperaturas. PESAGRO-RJ, Campos dos Goytacazes, 2016

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Genótipo	13	5384,64	93,37**
Temperatura	8	28875,71	500,72**
Genótipo × temperatura	104	493,69	8,56**
Resíduo	501	57,66	
Total	626		
Média geral		36,28	
CVe (%)		20,89	

**significativo, em nível de 1% de probabilidade.

Após verificar a significância dos efeitos avaliados (genótipos e temperaturas) foi feita uma comparação de médias desdobrando genótipos dentro de temperaturas (Tabela 5). Além disso, para avaliar o efeito da temperatura na germinação de cada genótipo foi realizada uma análise de regressão quadrática.

Pode-se observar que desdobrando o efeito de genótipo dentro de cada temperatura, foram verificadas diferenças significativas a 5% de probabilidade para as médias de germinação *in vitro*. Em temperatura baixa (5 °C) poucos grãos de pólen germinaram. Já com o aumento da temperatura, a germinação foi aumentando gradualmente até o valor máximo na temperatura de 25 °C, acima disso houve nova redução da porcentagem de germinação (Tabela 5). Além disso, verificou-se que o genótipo Maradol apresentou as maiores médias para germinação em todas as temperaturas. Assim, a maior germinação média foi de 90,03% em Maradol e a menor de 38,29% em Sekati a 25 °C. Por sua vez, a 5 °C a maior média foi de 20,9% (Maradol) e a menor de 2,94% (Tainung01).

Tabela 5. Porcentagem de germinação *in vitro* (%) média dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro avaliados em diferentes regimes de temperatura

Genótipo	Temperatura (°C)								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Maradol	20,9a	35,18a	58,40a	61,92a	90,03a	71,17a	79,16a	63,61a	55,12a
Formosa brilhoso	11,16b	28,23a	45,26a	61,87a	77,57b	76,51a	66,20b	27,85b	28,48b
UENF/Caliman01	9,59b	16,32a	35,26b	58,63b	78,04b	78,40a	47,09b	40,54a	2,13c
Costa Rica	9,40b	16,42a	25,25b	30,65b	55,83c	27,89c	27,53c	12,00c	3,72c
Waimanalo	9,03b	27,30a	42,44a	58,13b	68,12b	68,84b	32,51b	9,66c	10,37c
Grampola	8,66b	22,43a	40,64a	45,22b	57,68c	40,20b	9,38d	10,99c	3,25c
Golden	8,14b	10,32b	47,13a	58,14b	71,44b	67,75b	57,87b	44,98a	16,96b
JS12	7,14b	12,04b	39,16a	48,89b	80,18b	67,53b	50,91b	51,25a	48,17a
Triawan ET	7,11b	14,22b	28,51b	34,20b	51,76c	26,20c	29,91c	21,35b	13,20c
Kapoho solo	5,99b	19,43b	39,97a	69,99a	67,55b	50,08b	28,48b	22,61b	7,62c
Baixo Super	4,98b	12,37b	55,16a	75,58a	74,65b	69,33b	41,56c	37,94a	18,85b
SS72/12	4,23b	9,37b	41,13a	51,49a	68,26b	66,56b	38,13c	22,26a	14,07b
Sekati (Macuco)	2,96b	10,30b	17,89b	37,13a	38,29c	25,39c	16,10d	12,76b	6,99a
Tainung01	2,94b	9,32b	13,12c	57,03b	67,13b	55,00b	31,27c	19,63b	1,89a

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo, pelo critério de agrupamento de Skott - Knott ($p < 0,05$).

Em relação à classificação realizada com base no teste de viabilidade polínica foi observada certa concordância na resposta dos genótipos aos diferentes regimes de temperatura quanto à germinação *in vitro*. Por exemplo, as maiores médias foram observadas nos genótipos Maradol, UENF/Caliman01, Formosa Brilhoso e JS12, respectivamente, sendo o Maradol classificado inicialmente como intermediário e os genótipos restantes como tolerantes. Por sua vez, as menores médias foram observadas nos genótipos Sekati e Tainung01 sendo classificados inicialmente como suscetível e tolerante, respectivamente. Estes resultados podem ser devidos ao fato de ter realizado a classificação inicial com base na viabilidade polínica, a qual não garante completamente a germinação do grão de pólen porque eventos pós-meióticos podem afetar a germinação do gameta masculino. Segundo Cohen *et al.* (1989) analisando o efeito da temperatura na germinação de grãos de pólen de flores masculinas de mamoeiro, não verificaram germinação a 5 °C e uma redução a 40 °C; sendo a temperatura ideal entre 22-26 °C onde obtiveram de 64 a 68% de grãos de pólen germinados. Tamaki *et al.* (2011), estimando a germinação *in vitro* de grãos de pólen coletados em plantas hermafroditas de 'Sunrise Solo' observaram que na faixa entre 20-25 °C houve um maior percentual de germinação (72-80%) e em temperaturas abaixo de 15 °C e acima de 30 °C as taxas de germinação dos grãos de pólen diminuíram consideravelmente.

Kakani *et al.* (2005), avaliando diferentes temperaturas na germinação dos grãos de pólen de algodão, observaram que houve diferenças significativas entre as cultivares testadas, sendo que a temperatura que mostrou maior percentual de germinação foi a 33 °C.

O meio de cultura composto por 5% de sacarose e 15ppm de ácido bórico foi ideal para a germinação e crescimento do tubo polínico (Figura 3). Em temperaturas baixas (5 e 10 °C) ou altas (45 °C) o tubo polínico teve comprimento menor. Já em 25 °C, o tamanho do tubo polínico foi maior.

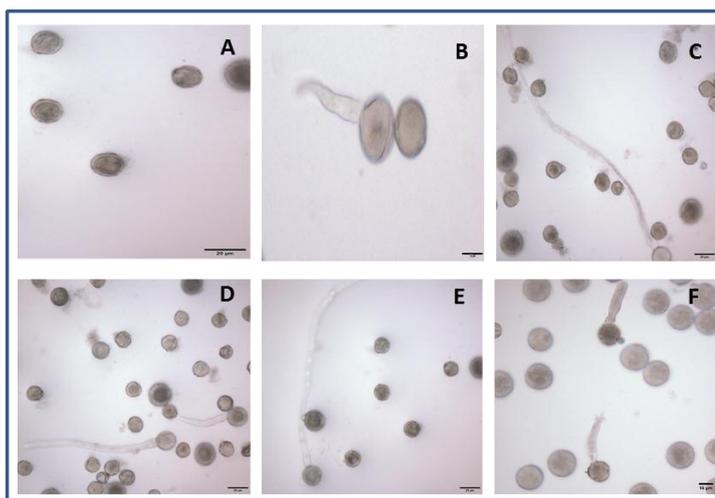


Figura 3: Grãos de pólen de genótipos de mamoeiro germinando *in vitro* em diferentes regimes de temperatura. A – Maradol a 5 °C; B – Grampola a 5 °C; C – SS72/12 a 5 °C; D – Tainung01 a 25 °C; E – UENF/Caliman01 a 35 °C; F- Baixo super a 45 °C.

Em relação ao crescimento do tubo polínico *in vitro* dos grãos de pólen, a análise de variância mostrou diferenças significativas a 1% de probabilidade entre os 14 genótipos avaliados. Da mesma forma, para a temperatura e a interação genótipos x temperaturas foram observadas diferenças significativas a 1 de probabilidade (Tabela 6). Estes resultados indicam que existe expressiva variabilidade genética entre os genótipos avaliados quanto ao crescimento do tubo polínico *in vitro*. Além disso, as significâncias da temperatura e da interação indicam que existe uma influência da temperatura na viabilidade polínica e uma resposta diferenciada dos genótipos avaliados em pelo menos uma temperatura avaliada.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para crescimento do tubo polínico *in vitro* dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro submetidos a diferentes temperaturas. PESAGRO-RJ, Campos dos Goytacazes, 2016

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Genótipo	13	14373,31	6,14**
Temperatura	8	50497,15	21,58**
Genótipo × temperatura	104	5667,59	2,42**
Resíduo	504	2339,93	
Total	629		
Média geral		172,24	
CVe (%)		28,08	

**significativo, em nível de 1% de probabilidade.

O desdobramento do efeito de genótipo dentro de temperatura mostrou diferenças significativas a 5% de probabilidade entre as médias do tubo polínico dos genótipos avaliados (Tabela 7). De maneira geral, as maiores médias do tubo polínico foram obtidas na temperatura de 25 °C. Já o menor comprimento médio de tubo polínico foi encontrado em temperaturas baixas, 5 e 10°C. Em temperatura alta, 45 °C, houve uma redução no tamanho do tubo polínico em comparação com a temperatura de 25 °C. Porém essa redução não foi tão drástica como em 5°C. Somente nos genótipos Grampola, Costa Rica, Waimanalo, JS12, Maradol e Kapoho Solo a temperatura baixa (5 °C), foram observadas as reduções mais expressivas no desenvolvimento do tubo polínico, pois nesta temperatura o tamanho do tubo polínico foi menor e a forma alterada, sendo largo no início de crescimento e rapidamente afunilando-se ocasionando a arrebenção do tubo (Figura 3 - B).

Assim, pode-se observar que entre os genótipos existem diferenças significativas nas médias do tubo quando comparados dentro de cada temperatura avaliada. No entanto, as médias do tubo polínico de cada genótipo não mostraram um efeito relevante no desenvolvimento do tubo polínico, em outras palavras, as temperaturas não mostram uma relação consistente entre a temperatura e o crescimento do tubo polínico.

Tabela 7. Média de crescimento do tubo polínico (μm) *in vitro* dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro avaliados em diferentes regimes de temperatura

Genótipo	Temperatura (°C)								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
UENF/Caliman01	159,6b	195,2a	270,1a	186,0b	240,6a	174,7b	255,0a	164,9b	166,2a
Tainung01	205,8a	128,7b	194,9b	162,0b	179,5b	173,4b	102,4b	190,9a	113,1a
Maradol	85,8c	98,3c	276,3a	171,8b	295,5a	180,9b	179,1b	185,6b	139,2a
Formosa brilhoso	134,9b	154,1b	214,3a	156,3b	252,0a	169,5b	144,0b	161,5b	106,6a
JS12	96,4c	147,0b	166,2b	214,8a	196,7a	161,0b	139,9b	148,8b	117,7a
SS72/12	160,3b	154,4b	153,6b	166,3b	240,5a	185,0b	226,4a	158,3b	188,5a
Golden	131,4b	131,3b	204,7a	179,3b	233,1a	162,5b	114,9b	115,6b	113,2a
Baixo Super	184,7b	190,3a	162,3b	158,8b	191,9b	184,5b	156,1b	171,5b	125,2a
Sekati	119,3b	151,3b	248,1a	184,8b	202,8a	164,0b	181,3b	182,6b	133,7a
Grampola	93,3c	132,4b	128,7b	148,1b	162,7b	114,5b	155,8b	164,6b	125,0a
Triawan ET	117,6b	171,1b	148,2b	193,9a	220,8a	151,6b	169,8b	147,4b	160,2a
Costa Rica	81,4c	158,1b	168,5b	134,0b	134,4b	130,8b	210,0a	170,3b	176,3a
Waimanalo	78,8c	188,0b	163,1b	166,4b	195,0a	119,2b	156,7b	251,9a	125,6a
Kapoho solo	80,8b	81,5c	140,0b	197,1a	240,7a	121,9b	159,3b	164,0b	81,8b

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo, pelo critério de agrupamento de Skott - Knott ($p < 0,05$).

O efeito da temperatura no crescimento do tubo polínico em mamoeiro, foi avaliado por Tamaki *et al.*, (2011). Estes autores registraram diferenças significativas no crescimento dos tubos polínicos submetidos a sete temperaturas, sendo que os maiores crescimentos foram encontrados a 25 °C, seguidos por 20, 30, 15 e 35 °C, enquanto a 40 °C foram observados os menores comprimentos, a temperaturas entre 20 °C e 25 °C favorecem a formação de tubos polínicos bem desenvolvidos. Nas temperaturas abaixo de 15 °C o crescimento dos tubos polínicos foi lento e com redução no comprimento dos mesmos. Além disso, os autores destacaram que alguns tubos polínicos estavam inchados e com a sua forma alterada. Em contrapartida, temperaturas mais quentes (30 °C) apresentavam-se mais compridos e os grãos de pólen menos hidratados.

5.2.2 - Germinação e Crescimento do tubo polínico *in vivo*

Com base na análise de variância, verificou-se que existem diferenças significativas a 1% de probabilidade entre os genótipos avaliados para a germinação *in vivo* dos grãos de pólen (Tabela 8). Da mesma forma, para os efeitos de temperatura e da interação genótipos x temperaturas foram observadas diferenças significativas a 1% de probabilidade.

Tabela 8. Resumo da análise de variância para germinação *in vivo* dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro submetidos a diferentes temperaturas. PESAGRO-RJ, Campos dos Goytacazes, 2016

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Genótipo	13	430,48	14,93**
Temperatura	8	23791,59	825,16**
Genótipo × temperatura	104	204,45	7,09**
Resíduo	504	14531,71	
Total	629		
Média geral		21,37	
CVe (%)		25,13	

**significativo, em nível de 1% de probabilidade.

Estes resultados relevam a existência de expressiva variabilidade genética entre os genótipos avaliados quanto à germinação *in vitro*. Além disso, os efeitos significativos de temperatura e da interação indicam que existe uma influência da temperatura na viabilidade polínica e uma resposta diferenciada dos genótipos em pelo menos uma temperatura avaliada.

Tabela 9. Médias de germinação *in vivo* (%) dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro avaliados em diferentes regimes de temperatura

Genótipo	Temperatura (°C)								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Maradol	4,59a	15,32a	30,03c	63,92a	68,54e	61,17d	14,59d	13,61c	4,52c
SS72/12	3,82a	8,47a	24,81c	41,49c	66,96d	56,56c	36,97b	12,26c	2,36a
Waimanalo	3,73a	8,59a	14,61a	35,13b	40,81c	38,84c	18,48c	9,66a	0,91a
Tainung01	3,56a	5,36a	15,27a	47,03c	49,11d	45,00c	26,92b	19,63b	4,01a
UENF/Caliman01	3,19a	9,59a	33,00b	58,63a	62,62d	58,40c	29,75b	20,54c	10,76a
Costa Rica	2,63a	5,12a	13,70b	28,65c	39,71c	27,89b	3,19b	1,98a	0,58a
Kapoho solo	2,52a	5,63a	12,75a	20,99b	29,36b	20,08c	7,41a	22,61a	1,03a
Sekati	1,78a	5,52a	14,67b	27,13c	28,08c	25,39b	18,79b	12,76b	2,14a
Triawan ET	1,60a	5,42a	28,18b	26,20c	47,58c	26,20b	5,22b	1,35b	1,04a
JS12	1,59a	8,04a	29,19c	58,89c	68,18d	57,53c	9,58c	11,25c	1,48c
Formosa brilhoso	1,47a	9,34a	16,45b	41,87c	58,89d	46,51c	13,16a	7,85a	2,84a
Golden	1,12a	6,21a	13,06c	38,14c	64,19d	60,75c	22,43c	4,98c	1b
Baixo Super	0,82a	4,55a	15,40c	25,58d	35,59d	69,33c	36,77c	17,94c	4,72b
Grampola	0,50a	6,01a	8,64c	20,22c	32,27c	2,00c	5,88a	1,99a	0,92a

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo, pelo critério de agrupamento de Skott - Knott ($p < 0,05$).

Pode-se observar que desdobrando o efeito de genótipo dentro de cada temperatura revelou diferenças significativas a 5% de probabilidade para as médias de germinação *in vivo* (Tabela 9). As maiores médias de germinação foram observadas a 25 °C em todos os genótipos. Em temperatura baixa (5 °C) houve baixa germinação, sendo observado um aumento gradativo até 25 °C, acima desta temperatura houve nova redução da porcentagem de germinação (Tabela 9). Em geral foi observada uma resposta similar à encontrada para a germinação *in vitro*. Conforme a classificação realizada com base na viabilidade polínica verificou-se certa concordância na resposta dos genótipos às temperaturas avaliadas. Assim, o genótipo Maradol apresentou as maiores médias para germinação em todas as temperaturas, seguido dos genótipos JS12 e 72/12. Já, as menores médias foram observadas nos genótipos Sekati Macuco e Kapoho Solo. Sendo o genótipo Maradol classificado como intermediário e os genótipos restantes como tolerantes. Por sua vez, os genótipos Sekati e Kapoho Solo foram classificados, inicialmente, como suscetível e intermediário, respectivamente. Conforme comentado anteriormente, estas diferenças da resposta dos genótipos são devido a eventos pós-meióticos que podem afetar a germinação do gameta masculino mesmo apresentando elevada viabilidade.

Efeitos de fatores abióticos na viabilidade dos gametas têm sido reportados em diferentes culturas de importância agrônômica. Por exemplo, em espécies de *Capsicum*, Reddy e Kakani (2007) observaram em diferenças significativas quanto à germinação dos grãos de pólen *in vivo* com médias de 78%. Por sua vez, Prasad *et al.* (2010) estudando as condições de temperatura e concentração de dióxido de carbono (CO₂) em grãos de pólen de sorgo e amendoim observaram que a longevidade dos grãos de pólen e a germinação dos grãos de pólen decresceram de acordo com a elevação da temperatura e o grão de pólen desenvolvido em alta temperatura e/ou alta concentração de CO₂ não teve maior tolerância a temperatura.

Na Figura 4, é apresentado o processo de germinação do grão de pólen e do desenvolvimento do tubo polínico *in vivo* nas temperaturas avaliadas. Assim, podem ser observados grãos de pólen com tubos polínicos longos indicando bom desenvolvimento e grãos com tubos polínicos curtos mostrando desenvolvimento afetado pelos efeitos da temperatura. Verifica-se maior crescimento do tubo polínico dos grãos de pólen desenvolvido a 25 °C.

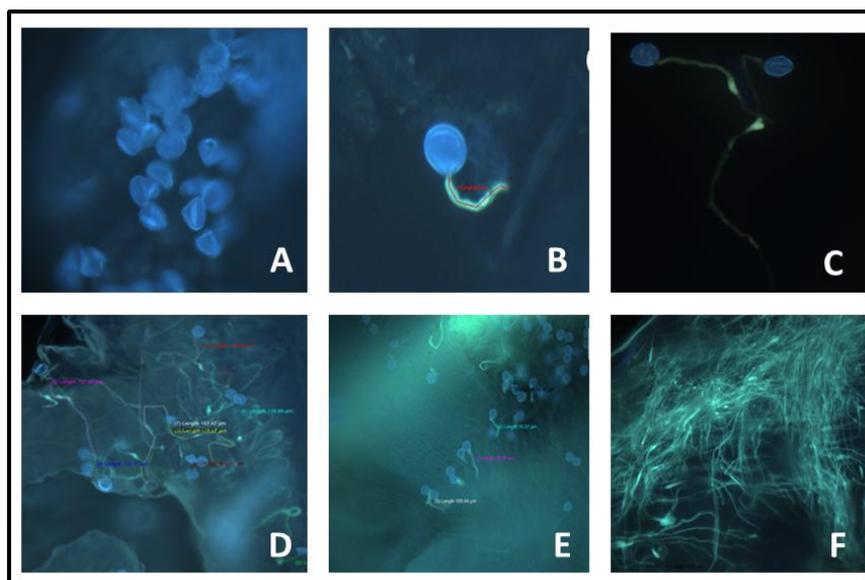


Figura 4: Germinação *in vivo* dos grãos de pólen de mamoeiro em diferentes temperaturas corados com anilina azul visualizados em microscopia de fluorescência. A: Grão de pólen não emitindo tubo polínico (5 °C); B: Grão de pólen emitindo tubo polínico curto (10 °C); C: Grão de pólen emitindo tubo polínico (20 °C); D: Grãos de pólen e tubo polínico germinando (25°C). E: Grãos de pólen emitindo tubos polínicos curtos (35 °C). F: Vários tubos polínicos emitidos (25 °C).

A análise de variância revelou diferenças significativas a 1 % de probabilidade entre os genótipos para o crescimento do tubo polínico *in vivo*. (Tabela 10). Da mesma forma, para os efeitos de temperatura e da interação genótipos x temperaturas foram observadas diferenças significativas a 1% de probabilidade. Os efeitos significativos relevam a existência de expressiva variabilidade genética entre os genótipos avaliados, bem como uma influência da temperatura na viabilidade polínica e uma resposta diferenciada dos genótipos em pelo menos uma temperatura avaliada.

Tabela 10. Resumo da análise de variância para crescimento do tubo polínico *in vivo* dos grãos de pólen de 14 genótipos de mamoeiro submetidos a diferentes temperaturas. PESAGRO-RJ, Campos dos Goytacazes, 2016

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Genótipo	13	47456,89	6,82**
Temperatura	8	265359,38	38,16**
Genótipo × Temperatura	104	20704,34	2,98**
Resíduo	504	6953,44	
Total	629		
Média geral		220,48	
CVe (%)		37,82	

**significativo, em nível de 1% de probabilidade.

Tabela 11. Média de crescimento do tubo polínico (μm) *in vivo* dos grãos de pólen de 12 genótipos de mamoeiro avaliados em diferentes regimes de temperatura

Genótipo	Temperaturas (°C)								
	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Formosa brilhoso	124,9b	154,0b	114,2b	256,4c	352,1d	269,5c	244,0c	161,7b	106,6b
Golden	109,4b	131,3b	204,8c	279,4c	433,1e	262,5c	114,9b	115,3b	123,2b
SS72/12	108,4b	154,9b	153,6b	286,3c	440,5e	285,1c	126,4b	158,5b	108,4b
Tainung01	105,8b	128,6b	194,9b	162,0b	379,5d	303,4d	102,3b	190,3b	113,1b
Sekati	99,3a	151,2b	148,1b	284,7c	302,8d	164,0b	181,3b	183,0b	133,7b
JS12	96,4a	147,1b	166,2b	214,8c	496,7e	261,0c	139,9b	148,9b	107,7b
Baixo Super	94,7a	120,4b	162,3b	258,7c	391,8d	284,5c	156,1b	171,5b	95,2a
Grampola	93,4a	132,9b	128,7b	148,2b	262,6e	114,5b	155,8b	94,6a	95,0a
UENF/Caliman01	92,1a	101,5b	170,1b	185,9c	500,6e	374,7d	155,1b	164,8b	86,3a
Maradol	85,8a	108,3b	176,3b	171,9b	590,5e	380,9d	279,2c	185,6b	139,3b
Costa Rica	83,4a	128,4b	138,6b	234,0c	434,4e	230,8c	110,0b	170,6b	96,3a
Triawan ET	77,3a	91,2a	148,1b	194,0b	220,9c	151,6b	169,8b	137,0b	70,2a
Kapoho solo	75,9a	99,6a	140,0b	197,2b	340,7e	171,9b	129,3b	104,0b	87,8a
Waimanalo	64,8a	187,9	163,1b	166,3b	395,0e	219,3c	156,7b	132,0b	105,6b

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo, pelo critério de agrupamento de Skott - Knott ($p < 0,05$).

O desdobramento do efeito de genótipo dentro de cada temperatura mostrou diferenças significativas a 5% de probabilidade para as médias de germinação *in vivo* (Tabela 11). As maiores médias de crescimento do tubo polínico foram observadas a 25 °C em todos os genótipos. A diferença do observado no crescimento do tubo polínico *in vitro*, o efeito da temperatura *in vivo* foi mais evidente, isto em temperatura baixa (5 °C) houve baixo desenvolvimento do tubo, e um aumento gradativo até 25 °C, acima desta temperatura houve nova redução no crescimento do tubo polínico (Tabela 11). Conforme a classificação realizada com base na viabilidade polínica verificou-se certa concordância na resposta dos genótipos às temperaturas avaliadas.

A maior média do crescimento do tubo polínico foi de 590,48 µm, no genótipo Maradol a 25 °C. Em temperatura baixa, 5 °C, o comprimento do tubo polínico foi menor nos genótipos UENF/Caliman01, Tainung01, JS12, Baixo super, Sekati, Triawan ET, Costa rica, Waimanalo e Kapoho solo, mostrando que em temperaturas baixas o tubo polínico é afetado nesses genótipos.

Kakani *et al.* (2002) observaram médias de comprimento do tubo polínico de 903 µm em genótipos de algodão. A média do crescimento do tubo polínico é variável e dependente da cultivar, sendo reportadas média de 1000-1800 em milho (Binelli *et al.*, 1995), 400 a 1400 µm em amendoim (Kakani *et al.*, 2001) e 20 a 60 µm em melão (Maestro e Alvarez, 1998).

Conforme comentado anteriormente, as médias de comprimento do tubo mostraram diferenças entre os comprimentos do tubo polínico *in vitro* e *in vivo*. Na análise *in vivo* foi possível observar tubos polínicos maiores, 590,48 µm, e na análise *in vitro* o maior comprimento foi de 295 µm. Essas diferenças são porque na germinação *in vivo* tem-se uma situação mais próxima do que ocorre no campo, pois se analisa o grão de pólen germinando e crescendo até atingir o ovário.

5.2.3 - Temperaturas cardinais

Para a germinação do grão de pólen *in vitro*, as temperaturas ótimas variaram de 1,66 a 6,52 °C. As temperaturas ótimas variaram de 23,04 a 30,09 °C. Já as temperaturas máximas variaram de 43,54 a 57,27 °C (Tabela 12). Os valores de temperaturas cardinais variam de acordo com os genótipos das

espécies e as condições ambientais. As temperaturas mínimas e máximas encontradas permitem inferir a faixa de tolerância em que o grão de pólen de mamoeiro mantém sua capacidade de germinação.

O mamoeiro é uma espécie tropical, logo é compreensível valores com médias de temperatura ótima próximas de 25 °C., visto que resultados semelhantes com temperaturas ótimas foram relatados para outras espécies subtropicais e tropicais. A cultura do mamoeiro desenvolveu-se bem em países tropicais como a Índia, Brasil, Indonésia e México.

O genótipo JS12 teve maior média de *Totm*, 30,9, e Grampola menor média de temperatura ótima, 23,1. Maradol também apresentou temperatura ótima próxima ao genótipo 29,47 (Tabela 12). O genótipo JS 12 é um genótipo do grupo Formosa. Maradol é um genótipo introduzido do México e também pertence ao grupo Formosa. Dos genótipos cultivados UENF/Caliman01, Tainung01 e Golden, as temperaturas ótimas foram próximas, 25,87; 25,75 e 26,97, respectivamente. Freitas (2012) avaliando genótipos de mamoeiro observou que a 30 °C os genótipos apresentaram maior porcentagem de germinação do pólen, sendo que as temperaturas cardinais encontradas estiveram entre 15,9 °C mínima e 40,3 °C máximas. Estes resultados são aproximados ao encontrado neste trabalho.

Tabela 12. Germinação máxima e temperaturas cardinais para germinação de grão de pólen *in vitro* em 14 genótipos de mamoeiro

Genótipo	a	b	c	Germinação máxima	Tmin	Totm	Tmax	R ²
Maradol	-0,12	6,03	-30,60	78,30	1,66	29,47	57,27	0,90
Formosa brilhoso	-0,14	7,26	-41,35	71,05	4,13	26,45	48,77	0,88
Baixo Super	-0,10	5,97	-9,66	70,36	5,10	26,03	46,96	0,87
UENF/Caliman01	-0,14	7,54	-28,71	68,38	5,54	25,87	46,20	0,86
Golden	-0,10	6,08	-27,83	67,03	5,38	26,97	48,57	0,92
JS12	-0,14	7,37	-37,12	64,60	4,98	30,39	55,79	0,84
Waimanalo	-0,14	7,75	-37,52	61,02	3,89	24,79	45,69	0,88
SS72/12	-0,16	8,36	-38,48	58,79	5,65	26,02	46,39	0,86
Kapoho solo	-0,07	3,63	-15,03	56,97	4,32	23,93	43,54	0,79
Tainung01	-0,11	4,87	-11,59	52,12	6,52	25,75	44,97	0,77
Grampola	-0,07	3,84	-12,17	44,47	2,52	23,04	43,56	0,77
Triawan ET	-0,09	4,14	-12,88	37,58	3,39	25,91	48,43	0,76
Costa Rica	-0,14	6,93	-24,85	37,28	3,34	24,24	45,13	0,73
Sekati	-0,15	7,09	-27,90	30,67	4,56	25,21	45,86	0,79

Tmin: Temperatura mínima; Totm: Temperatura ótima; Temperatura máxima; a, b, c são as constantes do modelo de regressão; R²: coeficiente de determinação.

A germinação máxima de grão de pólen *in vitro* variou de 30,67% a 57,27%. Sendo que o genótipo Maradol apresentou a maior germinação e o Sekati apresentou a menor germinação. Estes resultados são consistentes com as médias de germinação *in vitro*, observadas com destaque para o genótipo Maradol, o que sugere que este genótipo tolera uma maior amplitude de temperatura com germinação e crescimento do tubo polínico em valores aceitáveis.

Para a germinação do grão de pólen *in vivo*, as temperaturas ótimas variaram de 5,02 a 6,89 °C. As temperaturas ótimas variaram de 24,50 a 25,88 °C. Já as temperaturas máximas variaram de 43,37 a 46,06 °C (Tabela 13).

O genótipo UENF/Caliman teve maior média de Totm, 25,88 °C, e JS12 a menor média de temperatura ótima, 24,62 °C. Os outros dois genótipos cultivados, avaliados neste trabalho (Tainung01 e Golden), apresentaram temperaturas ótimas próximas, 25,85 e 25,58, respectivamente.

Em relação às temperaturas cardinais para germinação *in vivo* verificaram-se médias mais coerentes. Isto pode ser devido ao que na avaliação *in vivo* as condições são mais próximas das encontradas em condições de campo onde os genótipos são plantados.

Tabela 13. Germinação máxima e temperaturas cardinais para germinação de grão de pólen *in vivo* em 14 genótipos de mamoeiro

Genótipo	a	b	c	Germinação Máxima	Tmin	Totm	Tmax	R ²
UENF/Caliman01	-0,12	6,03	-30,60	47,38	5,71	25,88	46,06	0,77
JS12	-0,13	6,44	-33,26	45,99	5,86	24,62	43,37	0,72
Maradol	-0,12	5,91	-26,61	45,78	5,02	24,50	43,98	0,68
SS72/12	-0,10	5,33	-27,26	40,58	5,77	25,48	45,19	0,90
Golden	-0,11	5,71	-33,08	39,93	6,66	25,58	44,49	0,79
Formosa brilhoso	-0,11	5,56	-29,98	39,76	6,14	25,07	43,99	0,73
Tainung01	-0,11	5,43	-30,59	39,56	6,44	25,85	45,26	0,78
Triawan ET	-0,11	5,31	-26,95	38,67	5,74	24,73	43,71	0,71
Baixo Super	-0,10	5,26	-31,52	37,83	6,89	26,36	45,83	0,79
Waimanalo	-0,10	5,05	-26,50	37,12	5,94	25,17	44,40	0,75
Sekati	-0,09	4,72	-26,51	34,52	6,41	25,85	45,30	0,70
Costa Rica	-0,10	4,83	-25,95	34,12	6,13	24,87	43,62	0,62
Grampola	-0,09	4,73	-26,86	33,01	6,52	25,30	44,09	0,60
Kapoho solo	-0,09	4,33	-22,48	31,50	5,88	24,91	43,94	0,64

Tmin: Temperatura mínima; Totm: Temperatura ótima; Temperatura máxima; a, b, c são as constantes do modelo de regressão; R²: coeficiente de determinação.

A germinação máxima de grão de pólen *in vivo* variou de 31,50% a 47,38%. Sendo que o genótipo UENF/Caliman apresentou a maior germinação e o Kapoho Solo apresentou a menor germinação.

5.2.4 - Receptividade do estigma

A viabilidade do órgão feminino a variações de temperatura neste trabalho foi somente estudada através da receptividade do estigma. Conforme os resultados obtidos os botões florais foram receptivos somente nas temperaturas de 05, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Na temperatura de 45 °C nenhum dos estigmas dos genótipos estudados, tanto no grupo Solo (SS72/12, Golden, Baixo super, Kapoho Solo, Grampola e Triawan ET), quando no grupo Formosa (Formosa Brilhoso, JS12, Maradol, Waimanalo, Sekati e Costa Rica) e híbridos (UENF/Caliman01 e Tainung01), foram receptivos (Figura 5).

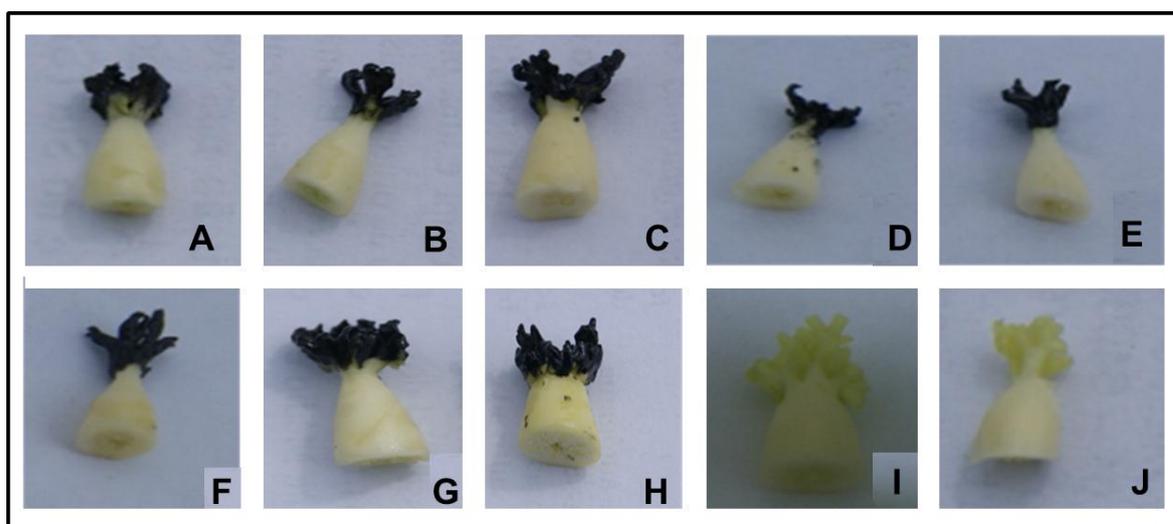


Figura 5: Resumo da receptividade do estigma em três genótipos de mamoeiro: JS12, SS72/12 e UENF/Caliman01 após imersão por 5 minutos em solução alfa-naftil depois de submetidos a diferentes temperaturas: A - 5 °C, B - 10 °C, C - 15 °C, D - 20 °C, E - 25 °C, F - 30 °C, G - 35 °C, H - 40 °C, I - 45 °C, J - 45 °C.

A receptividade do estigma é resultado da maturação do gameta feminino e pode influenciar na taxa de fecundação e no sucesso da polinização (Silva *et al.*, 2010). Ainda de acordo com os autores que utilizaram a atividade enzimática da peroxidase, a receptividade em flores antes da antese é um dado importante, permitindo ao melhorista fazer cruzamentos controlados nesta fase quando as

flores ainda não foram polinizadas, evitando assim a autofecundação e possibilitando um controle maior da hibridação.

Zanadrea *et al.* (2011) analisando estigmas de pêssego submetidos a diferentes temperaturas observou que não houve influência negativa quando o estigma foi submetido a uma temperatura de 29 °C. É importante ressaltar que no caso deste trabalho 29 °C já pode ser considerada uma temperatura alta para a espécie, pois o pessegueiro é desenvolvido e cultivado em regiões de baixas temperaturas.

Quando os estigmas foram submetidos à temperatura de 45 °C, nenhum dos genótipos apresentou receptivo. Isto pode ter ocorrido devido à dessecação do estigma devido à baixa umidade do ar. A baixa umidade relativa do ar constitui uma desvantagem porque promove a dessecação da superfície do estigma e, em consequência, sua baixa receptividade, acompanhada de colapso do estilete antes mesmo de o tubo polínico alcançar o ovário, impedindo, assim, o vingamento da semente (Layne, 1983).

5.3 - Análise da composição química dos grãos de pólen submetidos a diferentes temperaturas

A análise histoquímica do grão de pólen é ideal para identificar a composição química do grão de pólen e inferir sobre o modo de reprodução. O grão de pólen pode ser amiláceo ou lipídico. Damasceno *et al.*, (2009) analisando a composição química de genótipos de mamoeiro concluíram que o grão de pólen do mamão é lipídico. Com isso chegaram à conclusão que o modo de reprodução do mamão é autógama facultativa.

A análise histoquímica neste trabalho teve como objetivo observar se a composição química do mamão seria alterada quando os grãos de pólen foram submetidos a baixas e altas temperaturas. Portanto foi utilizado o corante Lugol para análise do conteúdo de amido e o corante Sudan IV para a análise de lipídeos.

O resultado mostrou que a composição química do grão de pólen não foi alterada quando os botões florais dos genótipos SS72/12, JS12 e UENF/Caliman01 foram submetidos a temperaturas baixas e altas (Figura 6).

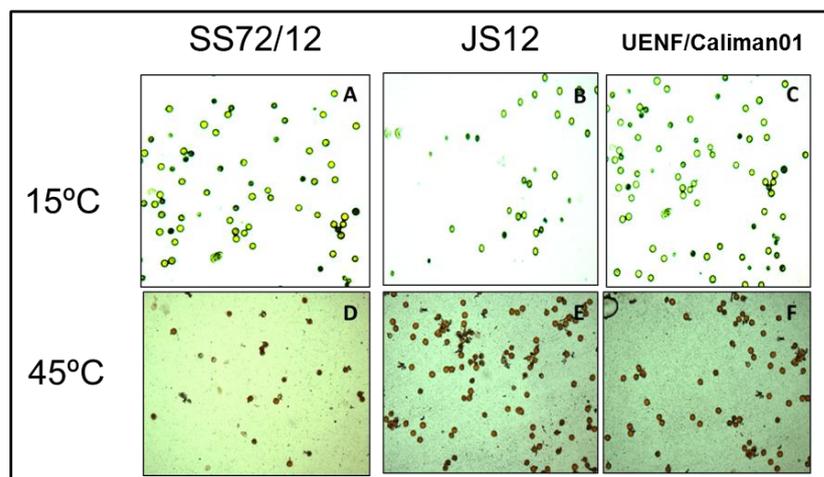


Figura 6: Análise da composição química do grão de pólen dos genótipos SS72/12, JS12 e UENF/Caliman01 submetidos a temperaturas altas e baixas. A- grãos de pólen do genótipo SS72/12 corados com Lugol após serem submetidos à temperatura de 15 °C; B- grãos de pólen do genótipo JS12 corados com Lugol após serem submetidos à temperatura de 15 °C; C- Grãos de pólen do genótipo UENF/Caliman01 corados com Lugol após serem submetidos à temperatura de 15 °C; D- grãos de pólen do genótipo SS72/12 corados com Lugol após serem submetidos à temperatura de 45 °C; E- grãos de pólen do genótipo JS12 corados com Lugol após serem submetidos à temperatura de 45 °C; F- grãos de pólen do genótipo UENF/Caliman01 corados com Lugol após serem submetidos a temperatura de 45 °C

Quando o grão de pólen é amiláceo, o corante Lugol reage com a presença de amido, corando os grãos de pólen de preto azulado, o que não ocorreu nas duas situações, tanto a 15 °C quanto a 45 °C.

Quando o grão de pólen é lipídico, o corante Sudan IV reage com a presença de lipídeos, corando os grãos de pólen com uma cor avermelhada, como é possível observar na Figura 6 -D, E, F.

Foram escolhidas somente duas temperaturas, 15 e 45 °C, pois a composição química do grão de pólen é sempre amilácea ou lipídica sendo improvável ter variação nesta composição. Porém, este estudo procurou investigar se a temperatura ocasionaria variação na composição química.

Na análise também foi possível observar a presença de pollenkitt nos grãos de pólen corados com Sudan IV. A presença do pollenkitt está relacionada com o tipo de dispersão do grão de pólen e é encontrado principalmente em espécie com polinização zoofílica. Segundo Pacini e Ressi (2005) o pollenkitt pode atuar na seleção de um polinizador específico, desempenhar sua função na dispersão ou quando o pólen disperso entrar em contato com estigma.

6. CONCLUSÕES

Com base na viabilidade polínica e na germinação e crescimento do tubo polínico foram identificados genótipos que apresentaram uma maior amplitude térmica mantendo em níveis aceitáveis a viabilidade e fertilidade do grão de pólen, sendo Maradol, Formosa brilhoso e JS12 (Grupo Formosa). Os genótipos com estreita amplitude térmica foram Sekati (Fruto longo macuco) Kapoho Solo e Grampola.

Os genótipos cultivados Golden, UENF/Caliman01 e Tainung01 apresentaram viabilidades aceitáveis dos gametas mostrando uma adequada amplitude térmica, estando em concordância o desenvolvimento deste com os regimes de temperaturas apresentados nas regiões produtoras.

A viabilidade do gameta masculino avaliado pela germinação do grão do pólen e crescimento do tubo polínico foi afetada pela temperatura, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo reduzida em temperatura baixa (5 °C) e aumentando gradativamente atingindo o maior valor a 25 °C, e acima desta temperatura a germinação foi reduzida.

Para todos os genótipos a temperatura de 25 °C foi a que proporcionou um percentual alto de germinação de grãos de pólen e no crescimento do tubo polínico.

Para germinação do grão de pólen, a temperatura mínima variou de 1,66 a 5,89 °C, a temperatura ótima variou de 23,0 °C a 30,9 °C e a temperatura máxima de 43,54 °C a 57,27 °C. Sendo mais coerentes as temperaturas cardinais

obtidas *in vitro* devido a ser uma avaliação mais próxima das condições de campo.

Os estigmas estão receptivos nas temperaturas de 5,10,15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. Quando submetidos à temperatura de 45 °C, nenhum dos estigmas foi receptivo.

A análise histoquímica mostrou que as temperaturas (altas ou baixas) não alteram a composição química do grão de pólen, permanecendo o grão de pólen do mamoeiro com composição lipídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, I.; Kakani, V.G. (2010).The effects of temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia* spp. *Scientia Horticulturae* 125(4):569-572.
- Alexander, M.P. (1969). Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technology*. v.44: 117-122.
- Allan, P. (1969). Effect of seeds on fruit weight in *Carica papaya*. *Agroplantae*, 1:163-170.
- Allan, P. (1963) Pollination of papaws. *Farming in South Africa*,38(11): 13-15.
- Aradhya, M. K.; Manshardt, R. M.; Zee, F.;Morden, C. W. (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cp DNA intergenic spacer region. *Genetic resources and Crop Evolution*. 46: 579-586p.
- Arkle Junior, T.D.; Nakasone, H.Y. (1984) Floral differentiation in the hermaphroditic papaya. *Hort Science* 19: 832 – 834.
- Awada, M.; Ikeda, W.S. (1975) Effects of water and nitrogen application on composition, growth, sugars in fruits, yeld and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya*).Honolulu.Hawaí: University of Hawaí, 16p. (Technical Bulletin, 33).

- Badillo V. M (2001) Nota correctiva Vasconcellea St. Hil. Y no Vasconcella (Caricaceae). *Ernstia* 11 (1):75-76. 51
- Badillo V. M. (2000) Carica L. vs Vasconcella St. Hil. (Caricaceae): con la rehabilitación de este último. *Ernstia* 10:74-79.
- Badillo, V. M.(1993) Caricaceae – Segundo esquema. Revista de La facultad de agronomía de La Universidad Central de Venezuela. Macaray, p.64.
- Badillo, V. M. (1971) Monografía de la familia Caricaceae. Editorial Nuestra América C. A. Maracay Venezuela, 221p.
- Binelli, G.; De Manincor, E.V.; Ottaviano, E. (1985) Temperature effects on pollen germination and pollen tube growth in maize. *Genética Agraria* 39: 269–281.
- Camargo, M. B. P. de.(2010) The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. *Bragantia*. v.69: 239-247.
- Cameron, B.G.; Prakash, N. (1994) Variations of the megagametophyte in the Papilionoideae. Advances in legume systematics: *Structural Botany*, 97-115
- Cohen, E.; Lavi, U.; Spiegel-Roy, P. (1989) Papaya pollen viability and storage. *Scientia Horticulturae* .v.40: 317-324.
- Costa, A. F. S.; Pacova, B. E. V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In: MARTINS, D. Dos S.; COSTA, A. De F. S. Da. *A cultura do mamoeiro – Tecnologia de Produção*, INCAPER, Vitória, ES, p. 59-102, 2003.
- Couto, F.A.D.; Nacif, S.R. (1999) Hibridação em mamão. In: BORÉM, A. *Hibridação artificial em plantas*. Viçosa, MG: UFV, p. 307-329.
- Cruz, C.D (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25 :(3):271-276.
- Dafni, A. (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. New York: Oxford University Press.

- Damasceno Junior, P.C., Costa, F.R.; Pereira, T.N.S., Freitas Neto, M.; Pereira, M.G.,. (2009a) Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L.). *Caryologia*. v.62: 10-15.
- Damasceno Junior,P.C. , Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Silva, F.F, Souza, M.de M., Nicoli, R.G. (2009b) Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L; *Caricaceae*). *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 31: 182-189.
- Damasceno Junior, P. C.; Pereira, T. N. S.; Silva, F. F.; Viana, A. P.;PEREIRA, M. G. Comportamento floral de híbridos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) avaliados no verão e na primavera. *Revista Ceres*, v. 55, p. 310-316, 2008.
- Dantas, J. L. L.; Oliveira, E. J. (2009) O melhoramento genético do mamoeiro: avanços, desafios e perspectivas, In: *I Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas*, Fortaleza - CE, O melhoramento genético no contexto atual, Fortaleza - CE: Embrapa Agroindústria Tropical, v. 1, p. 151-180.
- Dantas, J. L. L.; Dantas, A.C.V.L.; Lima, J.F. (2002) *Melhoramento de fruteiras tropicais*. Viçosa, UFV. p. 422.
- FAO. *Food and agriculture organization of the United Nations. Statistical Databases*. Disponível em: http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp. Acesso em: 25 de fevereiro de 2016.
- Ferregueti, G. A.; (2003) Caliman 01 – o primeiro híbrido de mamão Formosa brasileiro. *Simpósio Papaya Brasil*.
- Freitas, L.L.; Neto, M.F.; Pereira, T.N.S.; Pereira, M.G. (2012) Germinação e crescimento de grãos de pólen de mamoeiro *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico. Anais I Encontro de Genética e Melhoramento de Plantas do Estado do Rio de Janeiro. *Resumos...* Campos dos Goytacazes/RJ.
- Gaburro, N. de O.P. (2007) *Estudo da letalidade gamética e zigótica associada a letalidade observada no mamoeiro (Carica papaya L.)*. Campos dos

- Goytacazes (RJ), 47 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).
- Galen, C.; Zimmer, K. A.; Newport, M. E. A. (1987) Pollination in floral scent morphs of *Polemonium viscosum*: a mechanism for disruptive selection on flower size. *Evolution*, 41: 599-606
- Gomes Filho, A. (2005) Ocorrência da mancha fisiológica do mamão (*Carica papaya* L.) sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas de solo. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 90p.
- Hall, A. E. (1992) Breeding for heat tolerance. *Plant Breeding Reviews*. v.10: 129-167.
- Hedhly, A.(2011) Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany, Elmsford*, v.74, p.9-16.
- Hedhly, A.; Hormaza, J.I.; Herrero, M. (2008). Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science*. v.14: 30-36.
- Horner, H. T.; Palmer, R. G. (1995). Mechanisms of genic male sterility. *Crop Science*, 35(6): 1527-1535p.
- Horovitz, S.; Zerpa, D. M.; Arnal, H. (1953) Frecuencias de equilibrio de las formas sexuales en poblaciones de *Carica papaya* L. *Agronomia Tropical* 3: 149-174.
- IPCC (2013) Summary for policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds T.F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner) pp. 3–29. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY.
- IPCC (2007) Summary for policymakers. In: *Climate Change 2007: The physical science basis*. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press.

- Kapil, R. N e Bhatnagar, A. K. (1981) Ultrastructure and Biology of female gametophyte in flowering plants. *International review of cytology*, 70: 291-337.
- Kakani, V. G., Reddy, K.R; Koti, S.; Wallace, T.P.; Prasad, P.V.V.; Reddy, V.R.; Zhao, D. (2005). Differences in in vitro pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. *Annals of Botany* 96 (1): 59 – 67.
- Kakani, V. G., Prasad, P.V.V., Craufurd, P. Q., and Wheeler, T. R. (2002). Response in vitro pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaeae* L.) genotypes to temperature. *Plant Cell and Environment* v.25:1651-1661.
- Layne, R.E.C. (1983) Hibridization. In Moore, J. and Janick, J. (eds) *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press: ed. Darle Griffith.48-65p.
- Lobell D. B.; Asner, G. P. (2003) Climate and management contributions to recent trends in U.S. agricultural yields. *Science*. v.299: 1032.
- Maestro MC, Alvarez J. 1988.The effects of temperature on pollination and pollen tube growth in muskmelon *Cucumis melo* L. *Scientia Horticulturae* 36: 173–181.
- Maheswari, P. (1950) *An introduction to the embryology of angiosperms*. New York: McGraw-Hill, 453p.
- Marin, S. L. D.; Gomes, J. A.; Salgado, J. S.; Martins, D. Dos S. e Fullin, E. A. (1995) *Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no Estado do Espírito Santo*. 4º ed. Vitória, ES: EMCAPA,.57 p. (EMCAPA-Circular Técnica, 3).
- Ming, R., Yu, Q., Moore, P.H.(2007) Sex determination in papaya. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 401–408.
- Nakasone, H.Y.; Paull, R. E. (1998) *Tropical Fruits*. CAB.International, Oxon, UK, 443 pp.

- Omanga, P.A.; Summerfield, R.J; Qi, A. (1995) Flowering of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) in Kenya: responses of early maturing genotypes to location and date of sowing. *Field Crops Research* 41: 25–34.
- Parés, J., Basso, C., Jáuregui, D. (2002) Momento de antesis, dehiscencia de anteras y receptividad estigmática en flores de lechosa (*Carica papaya* L.) cv. Cartagena Amarilla. *Bioagro*.v.14: 17-24p.
- Prasad, P.V.V.; Boote, K.J.; Allen Jr., L.H.; Sheehy, J.E.; Thomas, J.M.G. (2006) Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in response to high temperature stress. *Field Crops Research*. v.95: 398–411.
- Peng, S. (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*. v. 101: 9971-9975.
- Pereira, M. G. (2003) Melhoramento genético do mamoeiro (*Carica papaya* L.): desenvolvimento e recomendação de híbridos. Reunião Técnica Frutimamão, Campos dos goytacazes, *Resumos...* v.1, n.1, p. 73 - 77, 2003.
- Pereira, M. G., Ferregueti, G. A., Pereira, T. N. S., Ramos, H. C. C., Cortes, D. F. M., Santa-Catarina, R., Luz, L. N., Barros, G. B. A., Arêdes, F. A. S., Boechat, M. S. B., Silveira, S. F., & Oliveira, J. G. Melhoramento Genético do Mamoeiro: Programa UENF/CALIMAN. In: David dos Santos Martins. (Org.). VI Simpósio do Papaya Brasileiro. 1ed.Vitória, ES: DCM/Incaper, 2015, v. 6, p. 01-41.
- Reddy, K. R.; Kakani, V. G. (2007). Screening Capsicum species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. *Scientia Horticulturae*. v. 112: 130-135.
- Reiser, L.; Fisher, R. L. (1993) The ovule embryo sac. *Plant Cell*. 5: 1291-1301.
- Rodríguez, P., Galan, S., Herrero, M. (1990) Evaluation of papaya autogamy. *Fruits*, 45(4): 387-391p.

- Rolim, S. G., Couto, H. T. Z., Jesus, R. M. (1999) Mortalidade e recrutamento de árvores na Floresta Atlântica de Linhares (ES). *Scientia Forestalis* 55:49-69.
- 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, L.M.S; Pereira, T.N.S; Souza, M.M; Damasceno Júnior, P. C; Costa, F. R; Ribeiro, B. F; Freitas N. G; Pereira, M.G. (2008) Optical and ultrastructural study of the pollen grain development in hermaphrodite papaya tree (*Carica papaya* L.). *Braz. arch. biol.technol.* vol.51, n.3, pp. 539-545.
- Santos, L.M. Da S. (2004) *Formação do gameta masculino em plantas hermafroditas de mamoeiro Carica papaya L.* Dissertação (Mestrado em produção vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Campos dos Goytacazes.
- Sivakumar, M.V.K.; Stefanski, R. (2008) Climate change mitigation, adaptation and sustainability in agriculture. In: SYMPOSIUM ON CLIMATE CHANGE AND VARIABILITY: Agro-meteorological monitoring and coping strategies for agriculture. *Abstracts Oscarsborg: WMO*, p.44.
- Storey, W. B. (1938) Segregation sex types in solo papaya and their application. To the selection of seed. *American Society Horticultural Science*. v. 35: 83-85.
- Tamaki, M., Urasaki, N., Sunaka, Y., Motomura, K., Adaniya, S. (2011) Seasonal variations in pollen germination ability, reproductive function of pistils, and seeds and fruit yield in papaya (*Carica papaya* L.) in Okinara. *Journal of Japanese Society of Horticulture Science*, 80:156-163.
- USDA (2009) *U.S. Department of Agriculture*. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/>. Acessado em 18 de março de 2016.
- Yu, Q.; Hou, S.; Feltus, F. A.; Jones, M. R.; Murray, J. E.; Veatch, O.; Lemke, C.; Saw, J. H.; Moore, R. C.; Thimmapuram, J.; Liu, L.; Moore, P. H.; Alam, M.; Jiang, J.; Paterson, A. H.; Ming, R. (2008) Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. *The Plant Journal* 53:124-132.