

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE
GRÃOS DE PÓLEN EM DOIS GENÓTIPOS DE MAMOEIRO
(*Carica papaya* L.)

LYZIA LEMOS FREITAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2013

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE
GRÃOS DE PÓLEN EM DOIS GENÓTIPOS DE MAMOEIRO
(*Carica papaya* L.)

LYZIA LEMOS FREITAS

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientadora: Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2013

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE
GRÃOS DE PÓLEN EM DOIS GENÓTIPOS DE MAMOEIRO
(*Carica papaya* L.)

LYZIA LEMOS FREITAS

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 22 de março de 2013

Comissão Examinadora:

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof. Pedro Correa Damasceno Junior (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) - UFRRJ

Profa. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF
(Orientadora)

Dedico esta conquista aos meus pais, Marília e Augusto César, por serem meu porto seguro e meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por estar sempre presente em sua infinita bondade amparando-me nos momentos mais difíceis e guiando meus passos;

Aos meus pais, por todo amor, educação, confiança, dedicação e apoio.

À CAPES, pela concessão da bolsa;

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

À professora Telma, pela orientação, ensinamentos e paciência em todos estes anos;

À toda minha família, tios, avós e primos, por estarem sempre me esperando de braços abertos e dispostos a me ajudar;

A todos os meus amigos, sejam eles de infância ou os que a universidade colocou em minha vida, obrigada por se fazerem presentes quando estão distantes fisicamente, por compartilharem comigo minhas alegrias e minhas dores, meus problemas e minhas conquistas. Cada um em sua diferença se faz essencial em minha vida;

Aos colegas de laboratório, pelo convívio, conversas e aprendizados nestes últimos anos;

Ao Raimundo Nonato, pelo auxílio essencial na finalização deste trabalho e pela imensa paciência e disposição em sanar minhas dúvidas;

Ao Daniel, secretário da pós-graduação, por toda ajuda durante o mestrado;

Aos colegas da pós-graduação, que propiciaram bons momentos ao longo do mestrado;

Aos doutores Messias Gonzaga Pereira, Alexandre Pio Viana e Pedro Côrrea Damasceno Junior, por aceitarem o convite em participar da comissão examinadora.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. CAPÍTULOS.....	6
3.1. GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GRÃOS DE PÓLEN DE DOIS GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (<i>Carica papaya</i> L.).....	6
3.1.1. INTRODUÇÃO	6
3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
Aspectos gerais da cultura.....	8
Formação dos gametas	10
Anatomia dos grãos de pólen	10
Viabilidade polínica.....	11
Germinação in vitro.....	13
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Material Vegetal.....	15
Metodologia	15
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1.5. CONCLUSÕES	26
3.2. EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE A GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMOEIRO	27
3.2.1. INTRODUÇÃO	27

3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	30
A cultura do mamoeiro e a temperatura.....	30
Temperatura e a reprodução sexual.....	32
Efeito da temperatura no grão de pólen.....	34
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Material Vegetal.....	36
Metodologia.....	36
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.2.5. CONCLUSÕES.....	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

FREITAS, Lyzia Lemos; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março 2013; Efeito da temperatura sobre a germinação *in vitro* de grãos de pólen em dois genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.); Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

Considerando que a temperatura, alta ou baixa, tem um efeito maléfico no desenvolvimento das plantas e em especial na fase reprodutiva das espécies, este trabalho foi estabelecido visando definir a temperatura ideal para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de mamoeiro. Primeiramente, foi realizado um experimento para definir o melhor meio de cultura para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen e posteriormente, foi realizado outro experimento com o cultivo *in vitro* dos grãos de pólen em diferentes regimes de temperatura. Assim, no primeiro experimento grãos de pólen de dois genótipos de mamoeiro, JS12 e UENF/CALIMAN01, foram incubados em meio de cultura constituídos por diferentes combinações de sacarose (0, 5, 10, 15%) e ácido bórico (0; 7,5 e 15ppm), à temperatura ambiente por seis horas. Houve diferenças significativas a 1% de probabilidade para todas as fontes de variação, com exceção da interação genótipo x ácido bórico. A combinação específica sacarose x ácido bórico promoveu os melhores percentuais de germinação *in vitro* dos grãos de pólen nos dois genótipos, sendo, entretanto esta resposta dependente da concentração dos constituintes do meio de cultivo. Embora tenha ocorrido diferença na resposta dos genótipos quanto aos tratamentos testados, o meio constituído por 5% de

sacarose e 15ppm de ácido bórico forneceu os melhores índices de germinação, 75,33% para JS12 e 82,33% para UENF/CALIMAN01, e crescimento do tubo polínico para os dois genótipos, e por isso foi definido como o meio ótimo de germinação *in vitro* dos grãos de pólen do UENF/CALIMAN01 e JS12. Após a determinação do meio ótimo para germinação, este foi utilizado no segundo experimento, com objetivo de avaliar o efeito da temperatura na germinação bem como definir as temperaturas cardinais (T_{min} , T_{otm} , T_{max}). Para tal, os grãos de pólen foram distribuídos no meio de germinação (5% sacarose/15ppm de ácido bórico) e incubados, por quatro horas, em seis temperaturas constantes (15 a 40°C, em intervalos de 5°C). Diferenças significativas a 1% foram observadas nos percentuais de germinação para todas as fontes de variação, genótipo, temperatura e genótipo x temperatura. Em temperatura baixa (15°C) poucos foram os grãos de pólen germinados, e observou-se aumento gradual da germinação até um valor máximo a 30°C, com percentuais de germinação de 81,72% e 78,04% para JS12 e UENF/CALIMAN, respectivamente; acima desta temperatura, os índices de germinação decresceram. As temperaturas cardinais (T_{min} , T_{otm} , T_{max}) estimadas foram 15,9°C, 27,9°C e 39,9°C para o JS12 e 16,5°C, 28,5°C e 40,3°C para UENF/CALIMAN01. Estas temperaturas cardinais permitem inferir a temperatura mínima, abaixo da qual não haverá germinação, a ótima que propicia máximo de germinação e a máxima, acima da qual não haverá germinação dos grãos de pólen desses genótipos.

ABSTRACT

FREITAS, Lyzia Lemos; M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2013; Effect of temperature on the *in vitro* germination of pollen grains in two papaya genotypes (*Carica papaya* L.) genotypes; Adviser: Telma Nair Santana Pereira; Comitee Members: Messias Gonzaga Pereira and Alexandre Pio Viana.

Considering that the temperature, high or low, has negative effects in the plant development and specifically in the reproductive phases, this work was established in order to define the optimal temperature for *in vitro* pollen grains germination in two papaya genotypes. First, an experiment was conducted to define the best culture medium for *in vitro* pollen germination and subsequently, another experiment was realized with *in vitro* culture of pollen grains in different temperature regimes. Thus, the first experiment pollen grains of two papaya genotypes, JS12 and UENF/CALIMAN01, were incubated in culture medium consisting of different combinations of sucrose (0, 5, 10, 15%) and boric acid (0; 7,5 e 15ppm), at room temperature for six hours. Significant differences were observed at 1% of probability for all sources of variation, except the interaction genotype x boric acid. The combination sucrose x boric acid provided the better germination rates in both genotypes, however this response dependent on the concentration of constituents of the culture medium. Although there was a difference in the genotypes behavior among treatments tested, the medium with the maximum percentage of pollen grain germination, 75,33% for JS12 and 82,33% for UENF/CALIMAN01, and pollen tube growth for both genotypes was

obtained when sucrose concentration was 5% and boric acid was 15ppm, and therefore was defined as the optimal pollen germination medium for JS12 and UENF/CALIMAN01. After determination the optimal germination medium, these were used in the second experiment, with objective to study the effect of temperature on germination and to determine the cardinal temperatures (T_{min} , T_{opt} , T_{max}). To do that, the pollen grains was distributed in the medium germination (5% sucrose/15ppm boric acid) and incubated, for four hours, in six constant temperatures (15 to 40°C, at 5°C intervals). Significant differences on the percentage of pollen germination were observed at 1% probability for all sources of variation, genotype, temperature and genotype x temperature. At low temperature (15°C) were few pollen grains germinated, and observed gradual increase to a maximum germination at 30°C, with germination percentage of 81,72% and 78,04% for JS12 and UENF/CALIMAN01, respectively; above this temperature, the germination rates decreased. The cardinal temperatures (T_{min} , T_{opt} , T_{max}) were 15,9°C, 27,9°C and 39,9°C for JS12 and 16,5°C, 28,5°C and 40,3°C for UENF/CALIMAN01. These cardinal temperatures allow us to infer the minimum temperature, below which no germination, the optimal that provides maximum germination and the maximum, above which no germination.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é cultivado em regiões tropicais e subtropicais e consumido em diversas regiões do mundo; é uma cultura de grande importância para a balança comercial do Brasil, já que o país é o segundo maior produtor de mamão do mundo estando atrás apenas da Índia (FAOSTAT, 2012). É sabido que a cultura é muito influenciada por fatores ambientais, sendo a temperatura e umidade os mais citados na literatura. As altas temperaturas no verão causam ao mamoeiro a esterilidade feminina de suas flores hermafroditas, fenômeno este conhecido como esterilidade de verão ou reversão sexual; as temperaturas de inverno causam a pentandria e carpeloidia (Arkle Jr. & Nakasome, 1984; Almeida *et al.*, 2003; Damasceno Junior *et al.*, 2008b). Essas anomalias florais são tão importantes na cultura que os melhoristas de mamoeiro procuram selecionar genótipos que apresentem uma frequência mínima (até 10%) dessas anomalias (Costa & Pacova, 2003).

Considerando que há uma grande preocupação do mundo científico quanto às alterações climáticas que estão acontecendo no nosso planeta, é importante se conhecer as influências das oscilações de temperatura nas culturas, especialmente, nas que produzem alimentos. É sabido que temperaturas altas ou baixas podem causar danos em todas as fases de desenvolvimento da planta (Zinn *et al.*, 2010) com especial referência a fase reprodutiva. O estresse devido a temperatura, alta e baixa, tem vários efeitos na fase reprodutiva das plantas o que pode contribuir para a redução da produção de sementes. Dentre

esses efeitos temos a falta de sincronismo no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (Herrero, 2003, Hedhly *et al.*, 2008) defeitos na estrutura e função dos tecidos da corola, dos carpelos, e estames (Morrison & Stewart, 2002) e também na formação dos gametas (Hedhly, 2011). Altas temperaturas afetam na quantidade e morfologia do pólen, deiscência da anteras, arquitetura da parede do grão de pólen, bem como a composição química, o metabolismo do grão de pólen, a viabilidade polínica a capacidade de germinação e o crescimento do tubo polínico (Hedhly *et al.*, 2008).

Altas temperaturas também aceleram o desenvolvimento do órgão feminino, estigma e óvulo, reduzindo o tempo de receptividade ao grão de pólen; por outro lado as baixas temperaturas desaceleram o desenvolvimento do órgão feminino prolongando a receptividade do estigma e a longevidade dos óvulos (Hedhly *et al.*, 2003, Cerovic *et al.*, 2000). De acordo com Zinn *et al.*, (2010) um único dia quente ou noite fria, próximo da fertilização pode ser fatal para o sucesso reprodutivo de muitas plantas.

Considerando estes fatos, o desenvolvimento de genótipos que apresentem tolerância à altas temperaturas é de grande importância. Entende-se por tolerância ao aquecimento ou à altas temperaturas a habilidade da planta se desenvolver e reproduzir sob estresse (aquecimento). E entende-se por estresse ao aquecimento quando a temperatura se eleva acima de um limite por um período de tempo suficiente para causar danos ao desenvolvimento e reprodução da planta (Wahid *et al.*, 2007). Alguns autores acreditam que as temperaturas noturnas são os fatores mais limitantes, outros argumentam que as temperaturas diurnas ou noturnas não afetam a planta independentemente e que a temperatura média diurna é mais importante na resposta da planta à alta temperatura, tendo a temperatura do dia um efeito secundário (Peet & Willits, 1998).

Tradicionalmente, os programas de melhoramento de plantas têm concentrado esforços no desenvolvimento de cultivares com alta produção em ambientes favoráveis (sem estresse); tais esforços têm sido bem sucedidos em aumentar a eficiência da produção por unidade de área e tem resultado em aumentos significativos na produção total (Warren, 1998). De acordo com Blum (1988) o melhoramento genético de plantas para tolerância ao estresse pode auxiliar o processo de produção em ambientes desfavoráveis (aquecimento).

Um método comum de seleção de plantas tolerantes ao aquecimento tem sido cultivar genótipos em ambientes com estresse (alta temperatura) e identificar indivíduos com grande potencial produtivo (Ehlers & Hall, 1998); entretanto, sob essas condições a presença de outros fatores causadores de estresse tais como insetos-pragas tem tornado a seleção muito difícil especialmente durante o período reprodutivo.

O grande desafio dos melhoristas de plantas é a identificação de um método de *screening* e de critérios de seleção efetivos para facilitar a detecção de genótipos tolerantes ao aquecimento. O Índice de Tolerância ao Aquecimento (HTI) para a recuperação do crescimento após a exposição a altas temperaturas foi proposto para sorgo (Young *et al.*, 2001) porém não foi testado em outras culturas. A germinação de grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico são considerados bons critérios na identificação de genótipos tolerantes, apesar de serem considerados como um critério adicional de seleção indireta de genótipos tolerantes (Berry & Rafique-Uddin, 1988).

Vários autores têm utilizado a germinação *in vitro* dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico como uma metodologia para a identificação da resposta dos genótipos quanto à sua tolerância a altas temperaturas. Em *Capsicum* a germinação *in vitro* e o crescimento do tubo polínico, sob condições de temperatura controlada, foram utilizados para estimar o Índice de Resposta Cumulativa de Temperatura (IRCT) e foram identificados acessos tolerantes (*C. annuum* cv. Mex Serrano – México), intermediários (*C. chacoense* - acesso 1312 - Argentina e o acesso Cobanero – Guatemala) e sensíveis (*C. frutescens* - Early Spring Giant – China, *C. annuum* - Long Green – Coreia do Sul, e *C. pubescens* da Guatemala). Os acessos tolerantes irão fazer parte do programa de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivar tolerante a altas temperaturas (Reddy & Kakani, 2007).

Em soja foi realizado um estudo semelhante com 44 genótipos e foram identificados 13 tolerantes, 22 intermediários e 9 sensíveis à altas temperaturas; os autores concluíram que a germinação *in vitro* e o crescimento do tubo polínico devem ser usados em *screening* de genótipos para tolerância ao aquecimento (Salem *et al.*, 2007). Kakani *et al.* (2002) também utilizaram a germinação *in vitro* e o crescimento do tubo polínico para identificar genótipos tolerantes a altas temperaturas avaliando 21 genótipos de amendoim e identificaram sete como

tolerantes, nove como intermediários, e cinco como sensíveis; os autores através da análise de componentes principais concluíram que a percentagem máxima de grãos de pólen germinados e o crescimento do tubo polínico são as características mais importantes do grão de pólen na determinação de tolerância genotípica para altas temperaturas.

Em mamoeiro apesar da grande influência da temperatura na ocorrência de problemas na expressão sexual de suas flores e a esterilidade de verão, pouco se tem feito quanto a questão da viabilidade polínica via germinação *in vitro* e crescimento do tubo polínico, porém alguns estudos indicam que o grão de pólen do mamoeiro é sensível às oscilações da temperatura (Cohen *et al.*, 1989, Tamaki *et al.*, 2011) tendo sido observado altas taxas de germinação de grão de pólen em temperaturas entre 20 e 25°C e baixas em temperaturas abaixo de 15°C e acima de 30°C.

Devido à importância econômica do mamoeiro e devido à importância do tema, essa dissertação foi conduzida durante o verão 2012/2013 em Campos dos Goytacazes. Para tal, primeiramente foi necessário determinar o meio de cultura adequado para o cultivo *in vitro* dos grãos de pólen de dois genótipos de mamoeiro, JS12 e UENF/CALIMAN01 (Capítulo 1); posteriormente, foi avaliado o efeito da temperatura sobre a germinação dos grãos de pólen e com base nos dados estimou-se as temperaturas cardinais de germinação *in vitro* dos grãos de pólen do mamoeiro (Capítulo 2).

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve por objetivo geral estimar as temperaturas cardinais para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen em dois genótipos de mamoeiro, JS12 e UENF/CALIMAN01.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar um meio de cultura constituído com sacarose e ácido bórico adequado para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico;
- b) Analisar o efeito de diferentes temperaturas na germinação *in vitro* dos grãos de pólen.

3. CAPÍTULOS

3.1. GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE DOIS GENÓTIPOS DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

3.1.1. INTRODUÇÃO

A dupla fertilização, uma característica única das angiospermas, é um processo acurado e sutil. Considerando que os gametas femininos (oosfera e núcleos polares) estão localizados em tecido materno do ovário e do óvulo, respectivamente, os mesmos não estão acessíveis aos gametas masculinos (núcleos espermáticos) que não tem mobilidade. Assim, as angiospermas apresentam uma forma especial de promover a fertilização dos gametas masculinos e femininos (Márton & Dresselhaus, 2010). Após a queda dos grãos de pólen sobre o estigma, ocorre a hidratação, germinação dos pólenes na superfície do estigma, a formação dos tubos polínicos que vão penetrar nos espaços intercelulares entre as papilas do estigma, e o crescimento dos tubos através do tecido de transmissão em direção ao estilo, ovário e óvulos (Márton & Dresselhaus, 2010). Qualquer falha nesse processo pode causar a não fertilização e conseqüentemente a não formação de sementes, importante para a reprodução das espécies propagadas sexualmente.

Como um primeiro passo para o sucesso da fertilização, têm-se o grão de pólen que no momento da polinização deve estar na sua viabilidade plena para poder percorrer o caminho em direção aos óvulos. Assim, estudos sobre a viabilidade polínica são importantes para se entender as chances que o grão de pólen tem de germinar no estigma da flor, crescer o tubo polínico e liberar os núcleos espermáticos que irão fertilizar a oosfera e os núcleos polares (Dafni, 1992). Além disso, através da estimativa da viabilidade se pode monitorar o vigor do pólen durante a conservação, estudar a interação pólen-pistilo, dentre outros (Dafni & Firmage, 2000).

Há pelo menos cinco metodologias para se estimar a viabilidade polínica: a) medidas de respiração ou condutividade química do pólen (raramente usado); b) técnicas de coloração; c) germinação *in vivo* e *in vitro*; d) conteúdo de prolina; e) capacidade de frutificação (Stanley & Linskens, 1974). A germinação *in vitro* mede a capacidade germinativa do grão de pólen sob condições específicas e revela o estado de reserva, as condições da membrana e a taxa de conversão. É um método rápido, simples, e em muitas espécies está correlacionado com o pegamento do fruto e da semente (Dafni & Firmage, 2000).

O sucesso da germinação do grão de pólen *in vitro* é influenciado por alguns fatores como os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação (Taylor & Hepler, 1997). O meio básico é constituído de sacarose, que fornece energia para o desenvolvimento do tubo polínico, e de ácido bórico que estimula o crescimento do tubo polínico, podendo variar a presença e concentração de outros nutrientes (Miranda & Clement, 1990). Embora, a literatura reporte que uma fonte de carbono e de boro é suficiente para a germinação do pólen, não sendo obrigatoriamente necessária a presença de outros nutrientes (Galletta, 1983).

Vários autores têm estudado o efeito das oscilações da temperatura na reprodução das plantas propagadas sexualmente utilizando como características o percentual de germinação de grãos de pólen *in vitro* (Hedhly, 2011; Prasad *et al.*, 2011; Zinn *et al.*, 2010; Wahid *et al.*, 2007; Reddy & Kakani, 2007; Hedhly *et al.*, 2005). Em mamoeiro poucos são os trabalhos que reportam a influência das oscilações de temperatura na reprodução da espécie; entretanto, Tamaki *et al.*, (2011) estudando o efeito da variação sazonal na reprodução de 'Sunrise Solo', cultivado no Japão, observaram que a percentagem de

germinação de grãos de pólen foi alta (52% - 78%) quando a temperatura estava em torno de 22,2 – 27,2°C e baixa (5-32%) quando a temperatura estava em torno de 14,6 – 18,1°C e que não houve germinação de pólen com a temperatura variando de 28,2 a 30,5°C.

A viabilidade do grão de pólen em mamoeiro tem sido estimada, principalmente, via coloração. Damasceno Junior *et al.* (2008a) estimaram a viabilidade polínica utilizando a solução tripla de Alexander e o diacetato de fluoresceína, e observaram que ‘Tainung01’ apresentou as maiores médias de viabilidade polínica, 94,30%, enquanto ‘Golden’ teve média de 82,28%. Em outro estudo, Damasceno Junior *et al.* (2010) observaram que a viabilidade polínica de ‘Sunrise Solo’ foi de 96%. Bajpai & Singh (2006), estimaram para cultivares de mamoeiro na Índia, uma viabilidade polínica de 50% observando que fatores abióticos como temperatura podem ter contribuído para um valor baixo de viabilidade polínica no material estudado. Como se pode observar a viabilidade polínica do mamoeiro pode variar de acordo com as variedades e climas corroborado por Magdalita *et al.* (1998).

Considerando a importância do tema, decidiu-se determinar qual o meio de cultura ideal para o mamoeiro, já que este é o primeiro passo para que se possa definir as melhores condições para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Assim, neste trabalho objetivou-se definir o melhor meio de cultura para a germinação *in vitro* de grãos de pólen de mamoeiro utilizando diferentes combinações de sacarose e ácido bórico.

3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA

Aspectos gerais da cultura

O mamoeiro pertence ao gênero *Carica*, família Caricaceae, ordem Violales, subclasse Archichlamydeae e classe Eudicotyledoneae (Badillo, 1971). O principal centro de origem da família é o continente americano, com maior ocorrência na América do Sul. O mamoeiro, especificamente, tem como centro de

origem o noroeste da América do Sul, vertente Oriental do Andes, precisamente na Bacia Amazônica Superior, local de maior diversidade genética da espécie (Badillo, 1971).

A cultura é cultivada e consumidas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo os principais produtores a Índia, Brasil, Indonésia, Nigéria e México. No período de 2008-2010, a América do Sul foi responsável por 23,09% da produção mundial de mamão (FAOSTAT, 2012), tendo o Brasil como principal produtor. Dentro da produção brasileira, destacam-se os estados do Espírito Santo e a Bahia que concentram cerca de 86% da produção nacional (Agrianual, 2011).

O mamoeiro é uma espécie diplóide com $2n=2x=18$ cromossomos, sendo a maioria metacêntricos com tamanho variando de $2,28\mu\text{m}$ a $1,52\mu\text{m}$ (Damasceno Junior *et al.*, 2009a); a constrição secundária se encontra no cromossomo 1 próxima do centrômero (Araujo *et al.*, 2010). É uma espécie preferencialmente autógama com cleistogamia (Damasceno Junior *et al.*, 2009b), apresenta meiose normal com nove pares de bivalentes (Damasceno Junior *et al.*, 2010) e um genoma relativamente pequeno ($2C=0,65$ pg) sendo as bandas do tipo AT (63,49%) predominantes (Araujo *et al.*, 2010). Em termos cromossômicos a espécie se diferencia das outras espécies Caricáceas (*V. cundinamarcensis* e *V. goudotiana*) por apresentar três pares de sítios 5S e um par de sítio 18S (Costa *et al.*, 2008).

Três tipos florais são encontrados no mamoeiro: flores estaminadas ou masculinas encontradas em plantas masculinas; flores pistiladas encontradas em plantas femininas e flores hermafroditas ou completas encontradas em plantas hermafroditas. O sexo das plantas é determinado pela presença de um gene com três formas alélicas (M_1 , M_2 , e m) sendo M_1m o genótipo das plantas masculinas, M_2m os das plantas hermafroditas e mm das femininas (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938). Com o auxílio da biologia molecular, outra teoria estabeleceu que a determinação do sexo das plantas de mamoeiro é devido a presença de um cromossomo sexual primitivo, sendo as plantas masculinas XY, as hermafroditas XY^h , e as femininas XX (Ming *et al.*, 2007).

Formação dos gametas

A gametogênese ocorre em células especiais que, após sofrerem divisão celular originam o gameta masculino e o feminino. A formação de gametas está sob controle genético e irregularidades ocorridas ao longo do processo podem resultar no surgimento de gametas estéreis (Horner & Palmer, 1995; Robinson – Beers *et al.*, 1992).

A formação do grão de pólen, gameta masculino, ocorre no saco polínico durante o desenvolvimento da antera e apresenta duas fases: microesporogênese e microgametogênese. Na microesporogênese, as células esporogênicas primárias diferenciam-se até que alcancem o estágio de células mãe de micrósporos. Cada uma destas sofre meiose gerando, assim, quatro núcleos haplóides (micrósporos). A microgametogênese é caracterizada pelo início da formação do gameta propriamente dito, correspondendo a uma série de divisões mitóticas que geram o grão de pólen maduro, podendo o mesmo ser bicelular ou tricelular (Palmer *et al.*, 1992).

Os estádios de desenvolvimento do grão de pólen desde células mães de micrósporos até o grão de pólen maduro foram descritos e a formação do grão de pólen segue o padrão normal de desenvolvimento, ou seja, as células esporogênicas sofrem divisões meióticas, formando micrósporos que após mitose dão origem ao grão de pólen; a microgametogênese é caracterizada por divisão mitótica assimétrica de cada micrósporo dando origem a grãos de pólen binucleados (Santos *et al.*, 2008).

Damasceno Junior *et al.* (2009b) concluíram através de análise histoquímica que os grãos de pólen do mamoeiro são de natureza lipídica. Devido a sua natureza hidrofóbica, os lipídios restringem a perda de água no estigma e nos grãos de pólen (Lush, 1999) contribuindo para estabelecimento de contínua hidratação, importante no crescimento do tubo polínico (Wolters-Arts *et al.*, 1998).

Anatomia dos grãos de pólen

A parede do grão de pólen é resistente a perda de água e tem como importante função proteger o gametófito masculino no trajeto entre a antera e o

estigma; e também reconhecer o estigma compatível, as células do tapetum que estão se desintegrando liberam compostos que ficam mantidos em espaços formados pela ornamentação da parte externa da parede, proteínas de “reconhecimento”, que possibilitam a germinação do grão de pólen somente sobre o estigma compatível (Moore e Webb, 1978).

A estrutura da parede celular do grão de pólen é constituída de uma parede externa, a exina que é composta por esporopolenina (McCormick, 1993), sendo muito resistente (Dajoz, 1991) e a intina, parede interna feita de celulose (Moore & Webb, 1978).

Em relação ao seu tamanho e forma, os grãos de pólen podem chegar a 200 μ m de diâmetro (Raynor *et al.*, 1966), podendo ter ou não forma definida (Erdtman, 1986). Mas outras características como a estrutura e ornamentação de sua exina e possíveis aberturas também podem descrevê-los, devendo se observar os tipos (poros, colpos ou colpóros), o número e a disposição destas na superfície do grão de pólen (Soler & Nolla, 2002).

Estas aberturas são orifícios mais ou menos distintos que são ou podem, ser ocupadas na liberação do material interno do grão de pólen (Erdtman, 1986). Bem como, podem permitir acomodações de mudanças de volume nos grãos de pólen que estão sujeitos a alterações de umidade (Barth & Melhem, 1988). Com base na variação da forma, as aberturas podem ser alongadas, possuindo comprimento maior que a sua largura, sendo, assim, chamadas de colpos; circulares, sendo denominadas poros; e também podem ser uma associação de ambos (cólporo). Os grãos de pólen também podem ser agrupados em grupos de acordo com o seu número de aberturas, utilizando-se prefixos mono-, di-, tri- tetra-, penta-, hexa- e poli-, tanto para poro e colpo quanto para cólporo (Moore & Webb, 1978).

Baseado nestes critérios, o mamoeiro pode ser classificado como tricolpado e isopolar possuindo grãos de pólen de tamanho médio (Sierra *et al.*, 2006).

Viabilidade polínica

Em plantas que se reproduzem por sementes, a dupla fertilização é uma etapa muito importante. Na dupla fertilização um núcleo espermático irá se fundir

com a oosfera e originar o embrião e o outro núcleo irá se fundir com os núcleos polares dando origem ao endosperma (Russel, 1992). Entretanto, para que a dupla fertilização ocorra é necessário que grãos de pólen viáveis, que carregam os núcleos espermáticos, caiam sobre o estigma receptivo iniciando o fenômeno da germinação e posterior fertilização. Assim, é importante que os grãos de pólen estejam viáveis no momento da polinização, pois o mesmo terá que atingir o estigma receptivo (Dafni, 1992).

A estimativa da viabilidade do grão de pólen permite inferir sobre a capacidade de germinação e de desenvolvimento dos grãos de pólen, sendo importante destacar que o estágio de desenvolvimento da flor, a coleta e condições de armazenamento do grão de pólen influenciam sua viabilidade (Stanley & Linskens, 1974). De acordo com Galletta (1983) a viabilidade polínica pode ser estimada por quatro principais métodos: germinação *in vitro*; métodos colorimétricos; germinação *in vivo* e porcentagem de frutificação efetiva, obtida com a utilização do pólen em teste.

A utilização de corantes para estimar a viabilidade polínica é o método mais rápido e geralmente mais utilizado pelos pesquisadores. Entretanto, neste método a viabilidade pode ser superestimada, pois, algumas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ser corados, devido a presença suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias (Rodriguez-Riano & Dafni, 2000). Os métodos *in vivo* e de porcentagem de frutificação efetiva são trabalhosos e requerem maior tempo para obtenção de resultados (Galletta, 1983), o que torna a germinação *in vitro* um dos métodos mais utilizados, devido a sua rapidez, eficiência, e pode apresentar alta correlação com a pegamento de frutos e sementes (Dafni & Firmage, 2000).

Munhoz *et al.* (2008) compararam a viabilidade polínica no genótipo 'Sunrise Solo' utilizando métodos colorimétricos (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), Alexander, carmim acético, lugol e Sudan IV) e de germinação *in vitro*. Segundo os autores, o teste utilizando TTC forneceu estimativa de viabilidade (67,5%) próxima ao teste de germinação *in vitro* (65%) sendo, portanto, ambos utilizados para que se estime a viabilidade. Enquanto os demais corantes superestimaram a viabilidade polínica (> 90%), porém se mostraram eficientes na determinação de constituintes celulares e da integridade do grão de pólen. Damasceno Junior *et al.* (2009a) observaram que não houve diferença

significativa entre os dados de viabilidade polínica acessada com o uso da solução tripla ou com o diacetato de fluoresceína nos genótipos Tainung01 e Golden.

Germinação in vitro

A germinação *in vitro* é um dos métodos mais utilizados em testes de viabilidade polínica (Marcellán & Camadro, 1996), fazendo uso de meios de cultura que fornecem condições para que os grãos de pólen desenvolvam seus tubos polínicos. As condições ótimas para germinação do pólen variam entre as espécies e são influenciadas por fatores como os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação (Stanley & Linskens, 1974).

Geralmente, o meio básico utilizado para a germinação *in vitro* é constituído de sacarose e ácido bórico, podendo haver no meio outros nutrientes em diferentes dosagens (Galletta, 1983; Miranda & Clement, 1990). O equilíbrio osmótico entre o grão de pólen e o meio de germinação é promovido pela sacarose, bem como o fornecimento de energia para o desenvolvimento do tubo polínico (Stanley & Linskens, 1974); o boro por sua vez, estimula o crescimento do tubo polínico e diminui a probabilidade de rompimento do mesmo (Franzon & Raseira, 2007).

O mecanismo de ação do boro consiste na interação com o açúcar formando um complexo ionizável açúcar-borato que reage de maneira mais rápida com as membranas celulares (Askin *et al.*, 1990). A adição de boro ao meio é importante e as respostas variam de acordo com a espécie trabalhada (Pfahler, 1967). De um modo geral, o ácido bórico aumenta a eficiência da sacarose na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (Almeida *et al.*, 1987).

O meio para ser considerado bom deve proporcionar pelo menos 50% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que ocorre envelhecimento do grão de pólen, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. Mesmo que o pólen pareça fraco, a presença de alguns tubos polínicos vigorosos sugere que, pelo menos, ocorrerá moderada frutificação efetiva, apesar da baixa porcentagem de germinação (Scorza & Sherman, 1995).

Os testes de germinação, geralmente, consistem em germinar uma amostra de pólen em meio de cultura adequado e após um tempo pré-determinado estimar a porcentagem de grãos de pólen que desenvolveram o tubo polínico via observação em microscópio (Galletta, 1983). Diferentes corantes como lugol, carmin acético, anilina azul, azul de algodão e iodeto de potássio têm sido utilizados para uma melhor observação dos tubos polínicos germinados (Hauser & Marrison, 1964; Stanley & Linskens, 1974).

Diferentes estudos têm sido realizados com intuito de estabelecer e padronizar meios de cultura e condições ambientais para avaliar a viabilidade de pólen em diferentes espécies (Nunes *et al.*, 2001). Dantas *et al.* (2005) testaram a viabilidade do pólen de macieira utilizando diferentes combinações de sacarose e ácido bórico no meio de cultura; concluindo que em concentrações entre 15% e 25% de sacarose possibilitam sucesso na germinação *in vitro* e a presença de ácido bórico não teve efeito positivo. Enquanto Imani *et al.* (2011), obtiveram resultados positivos utilizando ácido bórico em diferentes cultivares de macieira. O meio definido como ótimo, foi composto por 15% de sacarose, 100 mg/l de ácido bórico, além de nitrato de cálcio e ágar.

Em estudos com três cultivares de *Citrus*, a concentração de 200 mg/l de boro estimulou a germinação de grãos de pólen e a ausência de boro resultou em maiores rompimentos de membranas do tubo polínico com liberação do conteúdo citoplasmático para o exterior em duas variedades (Pêra e Natal), enquanto para a cultivar Valência o melhor índice de germinação foi obtido na ausência de ácido bórico (Pio *et al.*, 2004). Salles *et al.* (2006) objetivando avaliar o efeito da sacarose nestas mesmas cultivares testaram diferentes concentrações de sacarose e obtiveram as melhores respostas na concentração de 100 gL⁻¹ de sacarose, proporcionando as maiores porcentagens de germinação de grãos de pólen.

Em bananeiras diplóides, Reis *et al.* (2011) determinaram que o meio de cultura que proporcionou maior taxa de germinação dos grãos de pólen era constituído de 15% de sacarose, enquanto a dosagem de ácido bórico, que deveria ser adicionada ao meio, era dependente do genótipo estudado.

Ainda são poucos os estudos de germinação dos grãos de pólen *in vitro* em mamoeiro, porém Cohen *et al.* (1989) trabalhando com plantas de mamoeiro masculino definiram como ótimo um meio suplementado com 1,5% de ágar, 5%

de sacarose, 200mg/L de nitrato de cálcio e sulfato de magnésio, 100mg/L nitrato de potássio e ácido bórico; com esse meio os autores obtiveram uma porcentagem de germinação de 65%. Tamaki *et al.*, (2011) estudando o efeito da variação sazonal na capacidade de germinação dos grãos de pólen de 'Sunrise Solo' utilizaram um meio de cultura com 15 g L⁻¹ de ágar, 50g.L⁻¹ de sacarose, e 100 mg.L⁻¹ de ácido bórico observaram que a viabilidade polínica variou de 72-80%.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Este estudo foi realizado com grãos de pólen coletados de plantas hermafroditas dos genótipos genitores JS12 e Sunrise Solo 72/12, e de seu híbrido UENF/CALIMAN01. As plantas foram cultivadas na Unidade de Apoio à Pesquisa – CCTA onde foram plantadas dezesseis plantas por genótipo, distribuídas em quatro repetições, sendo cada parcela constituída por quatro plantas. As plantas foram dispostas em fileiras com espaçamento entre e 2m x 2m sob sistema de irrigação por aspersão; os tratos culturais foram dispensados conforme o recomendado para a cultura.

Metodologia

Os meios utilizados na germinação dos grãos de pólen variaram quanto às concentrações de sacarose: 0%; 5%; 10 e 15% e de ácido bórico: 0; 7,5 e 15ppm. Estas foram preparadas individualmente dissolvendo-se 0; 5; 10 e 15g de sacarose e 0,00075 e 0,0015g de ácido bórico em 100ml de água destilada, com o auxílio de agitador magnético. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em tubos Falcon e guardadas em geladeira até que fossem utilizadas.

As quatro concentrações de sacarose e as três de ácido bórico foram testadas utilizando um esquema fatorial (4x3), totalizando 12 tratamentos. Cada

tratamento, combinação de sacarose e ácido bórico, foi colocado em lâminas (100µl por lâmina) e duas lâminas por tratamento por genótipo foi preparada.

Pela manhã flores recém-abertas foram coletadas em plantas hermafroditas e trazidas ao laboratório. No laboratório, após a distribuição dos tratamentos nas lâminas e com auxílio de uma pinça, os grãos de pólen foram distribuídos sobre os diferentes meios de germinação. Prepararam-se duas lâminas por tratamento, sendo as mesmas colocadas em câmara úmida e deixadas à temperatura ambiente (~25°C) durante seis horas.

Após este período, as lâminas foram coradas com anilina azul a 1% para facilitar a observação e contagem dos tubos polínicos. Com a utilização de microscópio de fluorescência usando os filtros de excitação de 320/385nm e de emissão de 400-580nm. Foram contados 150 grãos de pólen por lâmina, totalizando 300 grãos de pólen por tratamento, sendo considerados grãos de pólen germinados aqueles cujo comprimento do tubo polínico foi superior ao diâmetro do grão de pólen (Dafni, 1992).

As imagens foram capturadas usando a 3.3 MPixel Qcolor 3C câmera digital acoplada ao microscópio Olympus BX 60 sendo utilizado o Programa Image Ptro-Plus Software versão 5.1. (Média Cybenertics).

A variável de estudo foi transformada para percentual de viabilidade. O experimento foi conduzido utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial ($x \times y$), os graus de liberdade para os tratamentos, foram desdobrados nos seus efeitos e comparados via teste de comparação de médias utilizando o programa SAS (1999) e análise de regressão com auxílio do programa SigmaPlot.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os dois parentais e o genótipo híbrido seria testado, porém devido a problemas ocorridos nas plantas do genótipo SS72/12 no campo, como acometimento de doença, morte de plantas e reversão sexual impossibilitou que as flores dessas plantas fossem testadas junto com os outros dois genótipos.

O teste de normalidade realizado com os dados de germinação indicaram que os resultados seguem uma distribuição normal. A análise de variância mostrou que houve diferenças significativas, a 1% de probabilidade, para os valores de germinação dos grãos de pólen, para as três fontes de variação, inclusive para as interações entre os fatores, com exceção da interação genótipo x ácido bórico (Tabela 1).

O efeito dos tratamentos pode ser melhor observado na Figura 1, onde se observa que a germinação dos grãos de pólen responderam aos tratamentos a que foram submetidos. De uma maneira geral, nas condições testadas o genótipo JS12 respondeu melhor a germinação *in vitro*, com uma média geral de 34,63% e o UENF/CALIMAN01 com uma média de 23,61%. O coeficiente de variação foi de 11,95, indicando uma boa precisão do experimento.

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para os dados de germinação *in vitro* dos grãos de pólen de dois genótipos de mamoeiro cultivados em diferentes concentrações de sacarose (%) e ácido bórico (ppm).

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Genótipo (G)	1	0,1457**	120,25
Sacarose (S)	3	0,7680**	633,78
Ácido Bórico (AB)	2	0,0593**	48,98
G x S	3	0,1435**	118,41
G x AB	2	0,0019 ^{ns}	1,57
S x AB	6	0,0324**	26,77
G x S x AB	6	0,0266**	22,00
Resíduo	24	0,0012	
Total	47	-	
C.V.(%)		11,95	

^{ns}/Não significativo

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Observa-se que na ausência de sacarose, o percentual de germinação foi baixo independente do genótipo, porém houve uma melhora à medida que a concentração de sacarose foi sendo aumentada até um determinado valor; a partir desse valor, a resposta foi negativa (Figs. 1A e 1C). Os dados do genótipo UENF/CALIMAN01 (Figura 1A) não se ajustaram tão bem a curva de regressão quanto os dados do JS12 (Figura 1C), porém observa-se que em ambos os genótipos a resposta foi não linear. Considerando o efeito da sacarose isoladamente, observa-se que a concentração a 5% foi a que apresentou maior média de grãos de pólen germinados (63,05%); a partir dessa concentração a média caiu consideravelmente. Na germinação de grãos de pólen de bacuri, Sinimbú Neto *et al.* (2011) observaram relação positiva entre a porcentagem de germinação e concentração de sacarose até 7,5%; a partir desta, a resposta foi diminuída e na concentração de sacarose a 20% não houve germinação. Derin & Eti (2001), avaliando a germinação em grãos de pólen de romã, observaram que os melhores resultados foram alcançados em meios de cultura contendo 10g L^{-1} de sacarose.

Embora o efeito do ácido bórico em relação aos genótipos não tenha sido significativo, houve melhor germinação à medida que houve aumento da concentração de ácido bórico (Figs. 1B e 1D), sendo que a resposta no genótipo JS12 foi superior quando comparadas ao UENFCALIMAN/01.

Na ausência do ácido bórico apesar de haver melhor germinação dos grãos de pólen, os valores foram baixos nos dois genótipos, não chegando a atingir 50% de grãos de pólen germinados. Entretanto, pode-se observar que houve um efeito do ácido bórico no alongamento do tubo polínico, pois mesmo com poucos grãos de pólen germinados o tubo polínico cresceu consideravelmente (Figs. 3 e 4).

Considerado o efeito do ácido bórico isoladamente a melhor concentração foi a de 15ppm onde a média foi de 35,87%. De acordo com Mondal & Ghanta (2012) o suprimento extra de sacarose mantém a pressão osmótica e atua como um substrato para o metabolismo do grão de pólen. Por outro lado, o ácido bórico interage com a sacarose e forma um complexo ionizável de açúcar-borato, o qual reage mais rapidamente com as membranas celulares (Askin *et al.*, 1990) e está diretamente envolvido no crescimento do tubo polínico; a ausência de boro reduz a taxa de germinação conduzindo a inibição do crescimento do tubo polínico além

de causar outras anormalidades com a ruptura da extremidade do tubo polínico (Wang *et al.*, 2003).

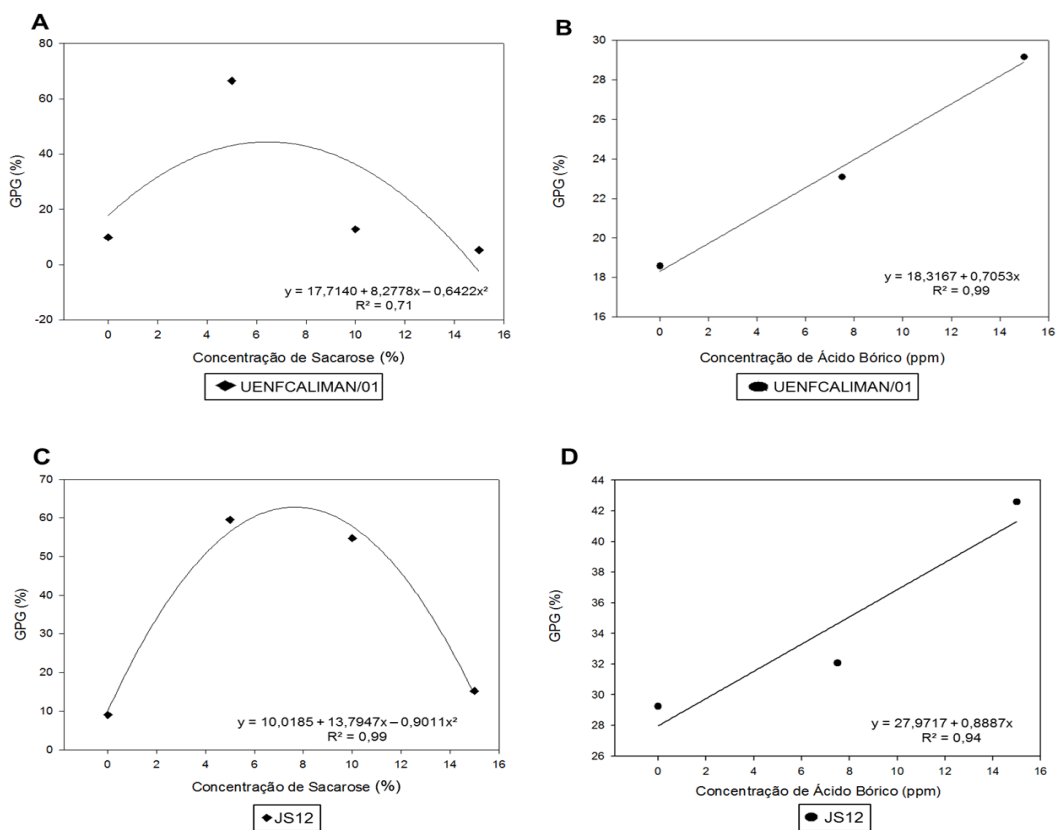


Figura 1. Porcentagem de grãos de pólen germinados *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico do genótipo UENF/CALIMAN01 (1A e 1B) e JS12 (1C e 1D).

Nos dois genótipos estudados, diferentes percentuais de germinação foram observados, desde tratamentos com poucos grãos de pólen germinados até tratamentos com percentuais altos de germinação tanto no genótipo UENFCALIMAN/01 (Tabela 2, Figura 2) quanto no JS12 (Tabela 3, Figura 2). Para ser considerado ótimo, o meio de germinação deve fornecer condições para máxima germinação e crescimento dos tubos polínicos dos grãos de pólen, devendo apresentar um mínimo de 50% de grãos germinados com tubos polínicos bem desenvolvidos. Diante disso, pode-se observar pelos resultados que mais de um tratamento foi capaz de fornecer condições para que o percentual de grãos de pólen germinados fosse superior a 50% com tubos polínicos bem desenvolvidos (Tabelas 2 e 3, Figura 2).

Tabela 2 – Porcentagem de germinação de grãos de pólen de UENFCALIMAN/01 em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10 e 15%) e ácido bórico (0, 7,5 e 15ppm).

[] Sacarose (%)	% Grãos de pólen germinados		
	[] Ácido Bórico (ppm)		
	0	7,5	15
0	13,66Cc	5,66Cb	10,33Ca
5	54,33Ac	63,00Ab	82,33Aa
10	3,66Bc	17,00Bb	17,66Ba
15	2,66Cc	6,66Cb	6,33Ca

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 – Porcentagem de germinação de grãos de pólen JS12 em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose (0, 5, 10 e 15%) e ácido bórico (0, 7,5 e 15ppm).

[] Sacarose (%)	% Grãos de pólen germinados		
	[] Ácido Bórico (ppm)		
	0	7,5	15
0	6,00Cb	1,00Cb	19,99Ca
5	37,66Ab	65,66Ab	75,33Aa
10	67,33Ab	55,66Ab	41,33Aa
15	6,00Bb	6,00Bb	33,66Ba

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

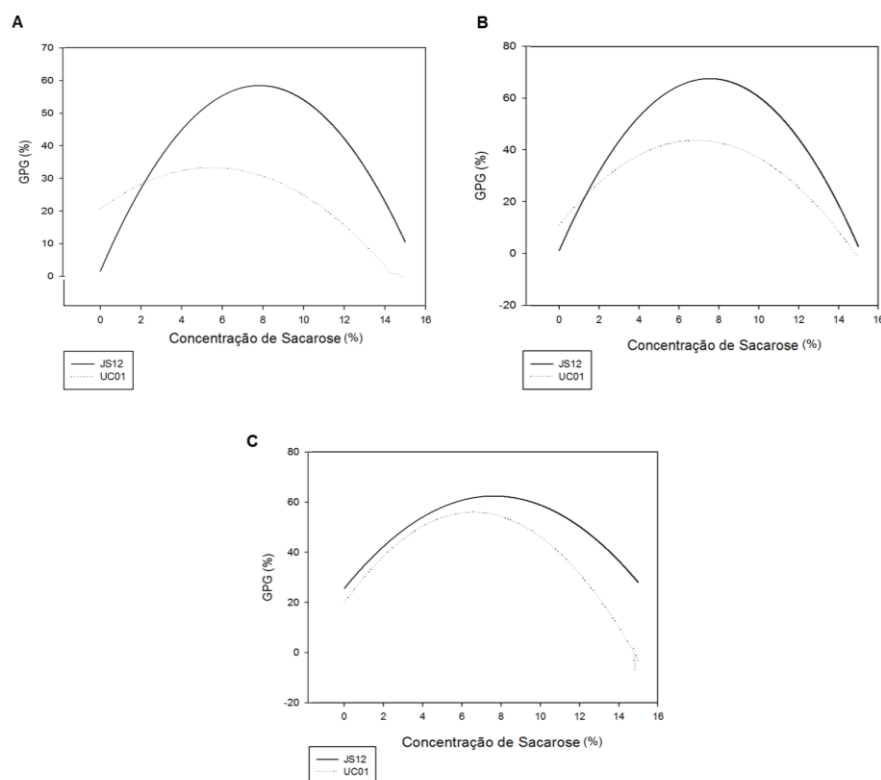


Figura 2. Porcentagem de grãos de pólen germinados *in vitro* em JS12 e UENFCALIMAN/01 com os níveis de ácido bórico fixados. A) 0ppm, B) 7,5ppm, C) 15ppm.

A interação dos dois componentes no meio de cultivo resultou em uma maior germinação, pois se observa que à medida que se adicionou sacarose e ácido bórico ao meio de cultura houve um aumento do percentual de germinação dos grãos de pólen (Figs. 3 e 4); após, uma determinada concentração, o efeito foi negativo, provavelmente devido ao desequilíbrio osmótico entre o meio e o interior do grão de pólen (Moreira *et al.*, 2005).

Houve diferença na resposta dos genótipos quanto aos tratamentos testados. Para o genótipo UENF/CALIMAN01, observa-se que a melhor concentração de sacarose foi de 5% de sacarose e 15ppm de ácido bórico que permitiu uma germinação média de 82,33% (Figura 3F), porém dois outros tratamentos deram bons resultados, sendo que em ambos o percentual de sacarose foi de 5%, variando a concentração de ácido bórico, 0ppm e 7,5ppm, respectivamente (Fig. 3D e 3E). Para o genótipo JS12, quatro combinações de sacarose e ácido bórico forneceram bons índices de germinação (Tabela 2, Figura

1). Entretanto, o maior percentual de germinação dos grãos de pólen para esse genótipo foi 75,33% obtida com o meio composto de 5% de sacarose e 15ppm de ácido bórico (Figura 4F). Nos outros três tratamentos, os índices foram de 65,66, 67,33 e 55,66% para meios constituídos de 5% de sacarose/10ppm de ácido bórico (Figura 4E), 10% de sacarose/0ppm de ácido bórico (Figura 4G), 10% de sacarose/7,5ppm de ácido bórico (Figura 4H), respectivamente.

Alguns trabalhos realizados com mamoeiro relataram que o uso de sacarose na concentração de 5% pode ser utilizado para fornecer condições necessárias para a germinação dos grãos de pólen (Cohen *et al.*, 1989; Munhoz *et al.*, 2008). Cohen *et al.* (1989) estudando a germinação em grãos de pólen provenientes de flores masculinas de mamoeiro definiram como ótimo um meio suplementado com 1,5% de ágar, 5% de sacarose, 200mg L⁻¹ de nitrato de cálcio e sulfato de magnésio, 100mg L⁻¹ nitrato de potássio e ácido bórico com percentual médio de germinação de 65%.

Em outro estudo de avaliação de viabilidade polínica de 'Sunrise Solo', Munhoz *et al.* (2008) compararam um meio contendo 1,2% de ágar e 5% de sacarose com outro diferindo basicamente na presença de nutrientes essenciais. Segundo os autores, o meio sem elementos essenciais teve melhor resposta de germinação com percentual de 65%, enquanto o meio constituído de elementos essenciais (nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio) o índice de germinação foi de 51,5%. No entanto, os resultados encontrados neste trabalho mostraram que apenas a utilização de sacarose e ácido bórico, em determinadas concentrações, promovem a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de mamoeiro, não sendo necessário o uso de outros compostos no meio. Entretanto, tem sido reportado que uma fonte de carbono que forneça energia para o desenvolvimento do tubo e uma de boro que promova o seu crescimento é suficiente para a germinação do pólen, não sendo necessária a presença de outros nutrientes (Miranda & Clement, 1990).

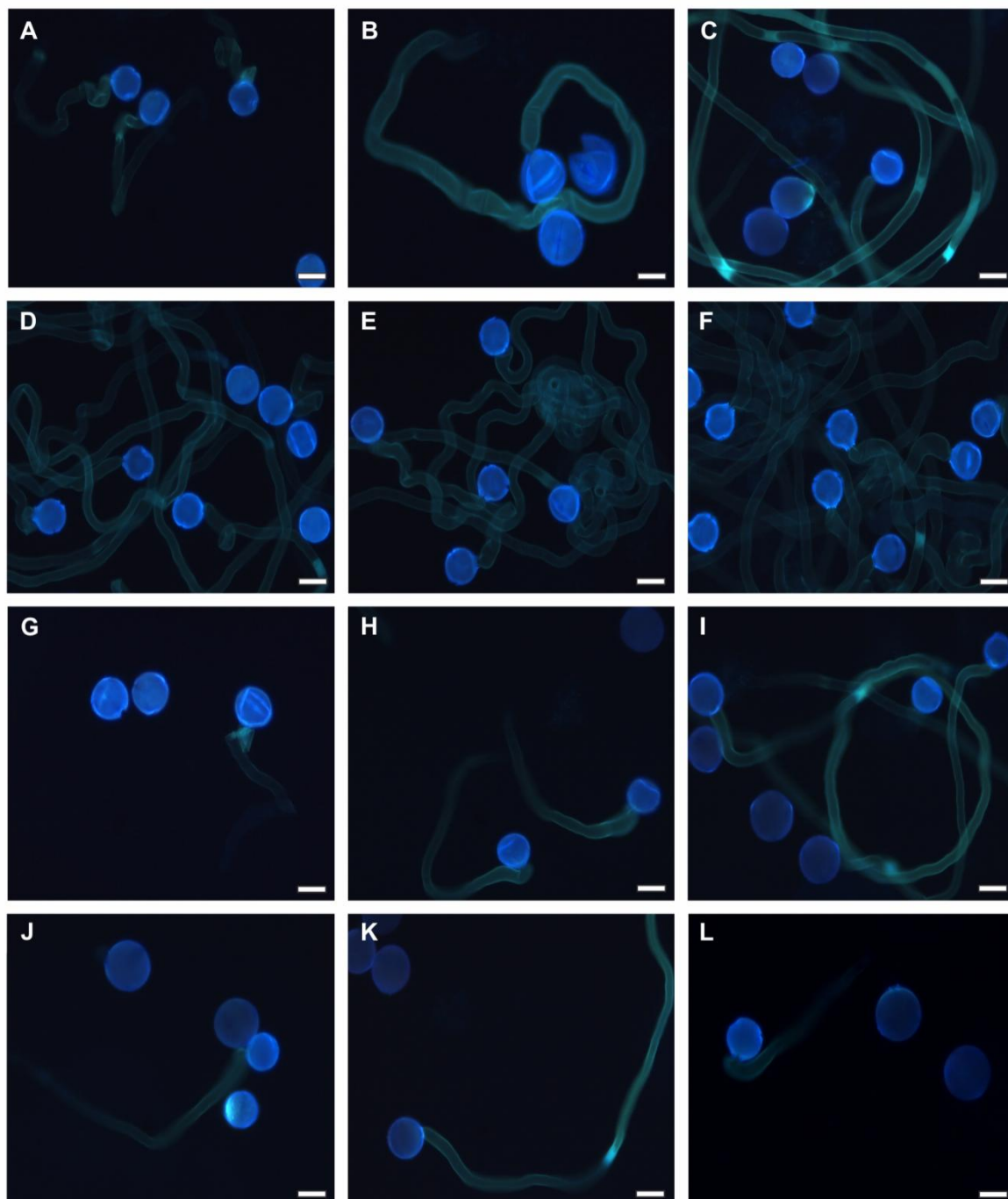


Figura 3. Germinação *in vitro* de grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos no UENF/CALIMAN01 submetidos a diferentes concentrações de sacarose (S) e ácido bórico (AB). A) T1 (0% S; 0ppm AB), B) T2 (0% S; 7,5ppm AB), C) T3 (0% S; 15ppm AB), D) T4 (5% S; 0ppm AB), E) T5 (5% S; 7,5ppm AB), F) T6 (5% S; 15ppm AB), G) T7 (10% S; 0ppm AB), H) T8 (10 % S; 7,5 ppm AB), I) T9 (10 % S; 15 ppm AB), J) T10 (15% S; 0ppm AB), K) T11 (15% S; 7,5ppm AB), L) T2 (15% S; 15ppm AB). Barra = 50 μ m

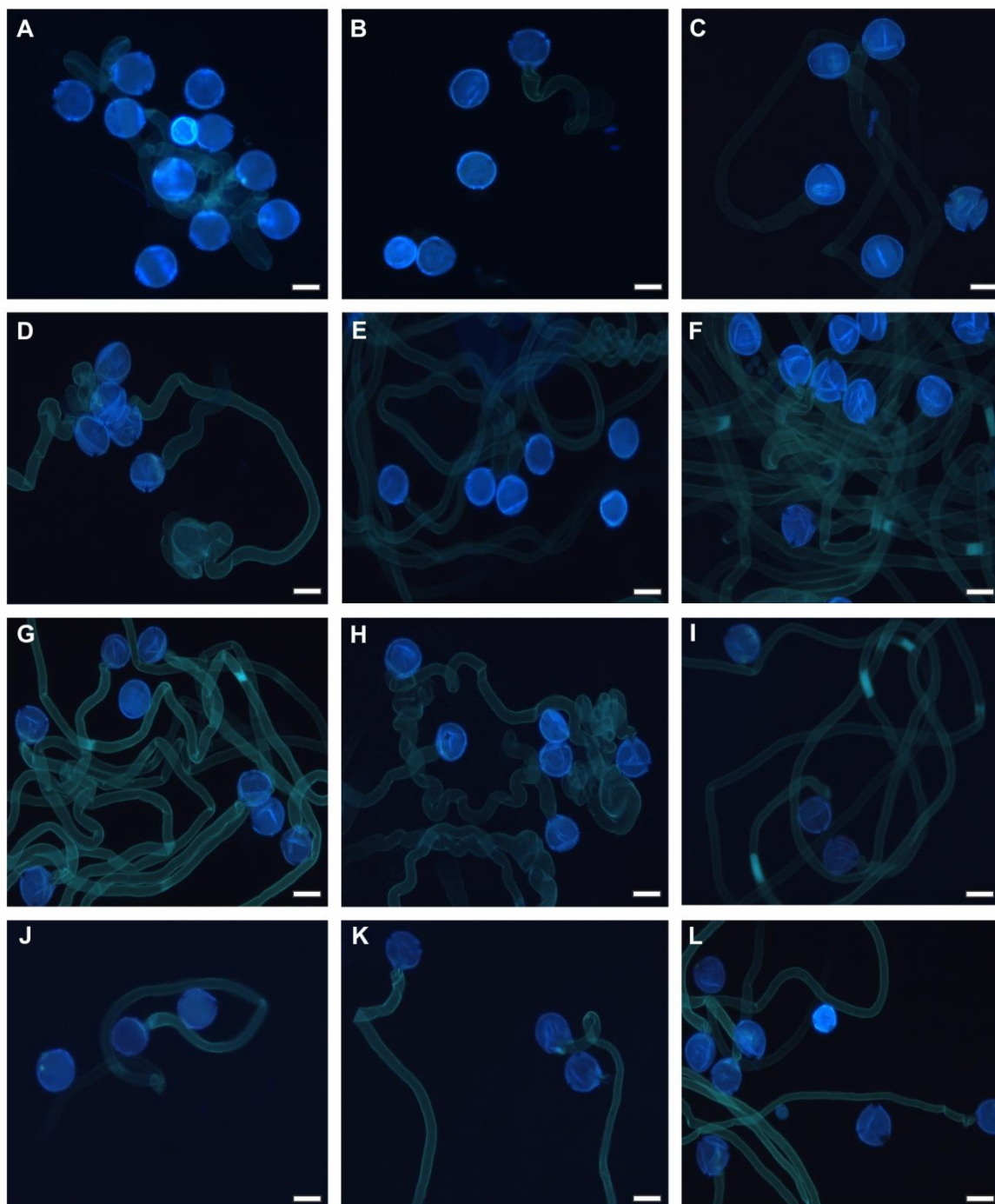


Figura 3. Germinação *in vitro* de grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos no JS 12 submetidos a diferentes concentrações de sacarose (S) e ácido bórico (AB). A) T1 (0% S; 0ppm AB), B) T2 (0% S; 7,5ppm AB), C) T3 (0% S; 15ppm AB), D) T4 (5% S; 0ppm B), E) T5 (5% S; 7,5ppm AB), F) T6 (5% S; 15ppm AB), G) T7 (10% S; 0ppm AB), H) T8 (10 % S; 7,5 ppm AB), I) T9 (10 % S; 15 ppm AB), J) T10 (15% S; 0ppm AB), K) T11 (15% S; 7,5ppm AB), L) T2 (15% S; 15ppm AB). Barra = 50 μ m.

Em *Solanum macranthum* Dunal, o maior percentual de grãos de pólen germinados foi encontrado quando combinados sacarose e ácido bórico. Quando utilizada apenas sacarose a melhor resposta foi obtida com sacarose a 20% e 82% de grãos de polens germinados, quando o meio foi suplementado apenas com ácido bórico o melhor índice foi obtido com ácido bórico a 100ppm. Quando combinados, a taxa de germinação mais alta foi de 98% em sacarose a 15% suplementada com 100ppm de ácido bórico (Mondal & Ghanta, 2012).

Dalkiliç & Mestav (2011) observaram em quince (*Cydonia oblonga* Mill.), uma espécie perene decídua, pertencente a família Rosaceae que o percentual de germinação *in vitro* de grãos de pólen variou de 0% em meio sem sacarose a 91,7% com 20% de sacarose; e variou de 32,7% em meio com 0 mg. L⁻¹ de ácido bórico a 94,9% em meio contendo 100 mg.L⁻¹. Em seis genótipos de bananeiras diplóides, Reis *et al.* (2011) concluíram que a influência de ácido bórico se mostrou dependente do genótipo, enquanto para sacarose a porcentagem de 15% se mostrou mais eficiente para todos os diplóides.

O efeito da sacarose e do ácido bórico na germinação de grãos de pólen em outras culturas tem sido avaliado e os resultados são variáveis. Em macieira, a presença de ácido bórico no meio não mostrou efeito positivo com a germinação *in vitro* (Dantas *et al.*, 2005). Franzon *et al.* (2007) avaliando o efeito do ácido bórico em relação ao meio de cultura padrão em duas populações de pitangueira observaram que o boro não influenciou na média de germinação *in vitro* em nenhuma das populações.

Em contrapartida, estudos com algumas cultivares de *Citrus* mostraram que a presença de boro na concentração de 200 mg L⁻¹ estimulou a germinação de grãos de pólen e a sua ausência resultou em maiores rompimentos de membranas do tubo polínico com liberação do conteúdo citoplasmático para o exterior (Pio *et al.*, 2004). Por outro lado, Salles *et al.* (2006) também trabalhando com citros observaram que o melhor meio foi composto de 100g.L⁻¹ e que o pH foi o diferencial na germinação.

Wang *et al.* (2003) observaram em *Picea meyeri* que em meio sem ácido bórico a germinação dos grãos de pólen variou de 18% a 24% e na presença do ácido bórico um percentual de germinação foi de 61%. Chagas *et al.* (2010) testando diferentes produtos químicos e concentrações para compor o meio de germinação *in vitro* para porta-enxertos de pereira observaram que o meio

composto de sacarose, ácido bórico, ágar, pH de 5,2-5,8 foi o que concedeu os melhores percentuais de grãos de pólen germinados. De acordo com Geetha & Jayaraman (2000) estudando a resposta de cinco genótipos de milho, as diferenças na percentagem de germinação de diferentes genótipos em um mesmo meio indica que a germinação *in vitro* é genótipo específica e depende da capacidade do grão de pólen germinar em meio artificial.

3.1.5. CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que:

- a) a resposta dos grãos de pólen a germinação *in vitro* é genótipo específica visto que os dois genótipos responderam de maneira diferente aos tratamentos;
- b) o efeito da sacarose na germinação *in vitro* é dependente da concentração deste produto no meio de cultivo considerando que há uma concentração ideal para promover a germinação; abaixo ou acima deste valor há um efeito negativo da sacarose;
- c) o efeito do ácido bórico ao meio promoveu o crescimento do tubo polínico já que mesmo na ausência da sacarose os poucos grãos de pólen germinados apresentaram tubos polínicos com comprimento considerável;
- d) a interação sacarose e ácido bórico promoveu os melhores percentuais de germinação *in vitro* dos grãos de pólen nos dois genótipos sendo, entretanto esta resposta dependente da concentração dos constituintes do meio de cultivo; e,
- e) o meio constituído por 5% de sacarose e 15ppm de ácido bórico forneceu os melhores índices de germinação e crescimento do tubo polínico para os dois genótipos e por isso foi definido como o meio ótimo de germinação *in vitro* dos grãos de pólen do UENF/CALIMAN01 e JS12.

3.2. EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS SOBRE A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMOEIRO

3.2.1. INTRODUÇÃO

As alterações climáticas envolvem mudanças na média das temperaturas que vem aumentando desde o final do século XIX e tende a aumentar ainda mais até o final do século atual (Houghton *et al.*, 2001). A temperatura é um dos fatores que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas, podendo assim limitar a distribuição geográfica das espécies (Saxe *et al.*, 2002). O estresse devido ao aquecimento em função da temperatura ambiental é uma ameaça séria as culturas no mundo inteiro (Hall, 2001). Entende-se por estresse devido ao aquecimento como a elevação da temperatura acima de um limite por um determinado período suficiente para causar danos irreversíveis ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Wahid *et al.*, 2007). De acordo com o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) a temperatura média global irá aumentar 0,3°C por década (Jones *et al.*, 1999).

Estresses causados por temperatura, altas ou baixas, podem ter um efeito maléfico em todas as fases de desenvolvimento da planta. Considerando que a maioria do suprimento de alimentos para a humanidade vem de angiospermas que se reproduzem via sexuada é importante entender como as plantas enfrentam o estresse durante a sua reprodução para que se possa fazer no futuro o manejo agrícola (Zinn *et al.*, 2010). Ainda de acordo com esses autores, as altas temperaturas provocam efeitos importantes nos tecidos reprodutivos das plantas como florescimento precoce ou tardio, assincronismo no desenvolvimento reprodutivo dos órgãos femininos e masculinos, problemas na formação dos gametas e na estrutura e função dos tecidos da corola, carpelos e estames.

Apesar de se saber que os efeitos da temperatura na reprodução das plantas afetam tanto os órgãos masculinos e femininos a grande maioria dos trabalhos concentra-se na parte masculina (Hedhly *et al.*, 2008), provavelmente porque o grão de pólen é mais sensível ao estresse ambiental em comparação ao óvulo (Prasad *et al.*, 2011). Em casos de alteração moderada da temperatura, o estresse causado pode provocar redução no número de grãos de pólen e na viabilidade, podendo gerar problemas durante a fertilização. Em casos mais graves, a completa esterilidade do grão de pólen e/ou inibição da deiscência das anteras podem resultar em nenhuma frutificação. Na fase de pós-polinização, a temperatura pode reduzir a fecundidade e afetar o crescimento do tubo polínico (Hedhly, 2011). Durante a fase progâmica, a temperatura afeta tanto a germinação do pólen quanto a cinética do crescimento do tubo polínico no estilo (Elgersma *et al.*, 1989). Estudos têm sido realizados em diferentes espécies buscando entender as consequências das alterações de temperatura na germinação do grão de pólen, entretanto este efeito é variável e dependente da espécie ou cultivar estudada (Sukhvibul *et al.*, 2000).

Esse tema tem sido estudado nas mais diferentes culturas (Prasad *et al.*, 2011; Zinn *et al.*, 2010; Reddy & Kakani, 2007; Hedhly *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2001; Kakani *et al.*, 2002; Kakani *et al.*, 2005) e os autores com base em seus resultados definiram as temperaturas cardinais ou seja, a T_{\min} (temperatura mínima na qual o grão de pólen germina; abaixo dela a germinação pode não correr), a T_{otm} (temperatura ideal na qual o grão de pólen atinge o máximo de germinação) e a T_{\max} (temperatura máxima onde a partir dela não ocorre a germinação do grão de pólen).

O mamoeiro é uma espécie cultivada tanto na região tropical quanto subtropical; a espécie é sensível a geada e se desenvolve bem entre as latitudes de 32° N e S com crescimento ótimo em 22-26°C e com chuvas bem distribuídas (Silva *et al.*, 2007). A espécie apresenta três formas básicas de sexo: plantas femininas, masculinas, e hermafroditas. Dependendo da limitação da temperatura as plantas hermafroditas podem ser cultivadas comercialmente em áreas tropicais; as plantas femininas podem desenvolver bem em regiões subtropicais, porém o sucesso comercial irá depender da disponibilidade e viabilidade dos grãos de pólen (Allan, 1963a).

O mamoeiro é muito sensível as variações da temperatura, haja visto as alterações que ocorrem nas flores hermafroditas durante o verão e ocasionalmente durante o inverno. A esterilidade de verão, muito comum no mamoeiro durante o verão, é um fenômeno conhecido como reversão sexual, pois a flor hermafrodita torna-se masculina funcional (Storey, 1958). Ou seja, possuem características de uma flor masculina e que de acordo com Decraene & Smets (1999) na região central da flor apresentam uma estrutura denominada pistiloide, que segundo a literatura refere-se como o ovário rudimentar em flores revertidas.

Em temperaturas mais amenas, a flor hermafrodita sofre alterações na sua morfologia gerando as flores carpelóides e pentândricas, que apesar de não ter uma frequência de ocorrência tão pronunciada quanto a esterilidade do verão, produzem frutos sem valor de mercado. Tem sido observado em mamoeiro que a temperatura tem um efeito maléfico nos grãos de pólen, tendo como consequência uma produção de frutos errática. Sharma & Bajpai (1969) estudando, durante um ano, a viabilidade polínica de cultivares indianos observaram que tanto a temperatura baixa quanto a alta pode diminuir a quantidade e a viabilidade dos grãos de pólen do mamoeiro. Allan (1963a) observou que a quantidade de pólen por antera e a fertilidade dos grãos de pólen sofrem influência das variações de temperatura, especialmente na germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico.

Devido a importância deste tema atualmente, objetivou-se avaliar o efeito da temperatura sobre a germinação *in vitro* dos grãos de pólen e com base nos dados estimar as temperaturas cardinais de germinação para grãos de pólen do mamoeiro.

3.2.2. REVISÃO DE LITERATURA

A cultura do mamoeiro e a temperatura

O mamoeiro é uma espécie polígama sendo encontrado no gênero plantas masculinas, femininas e hermafroditas. No Brasil, o mamoeiro cultivado é do tipo ginoandromonoico, ou seja, segrega para plantas hermafroditas e femininas. A flor masculina não apresenta o gineceu e se o apresenta o mesmo é um pistiloide; a planta feminina não apresenta o androceu, tendo apenas o gineceu constituído por um ovário, estilo e estigma; a flor hermafrodita apresenta tanto o androceu quanto o gineceu (Decraene & Smets, 1999).

A teoria mais aceita sobre a determinação do sexo das plantas de mamoeiro diz que o sexo das plantas é devido a presença de um gene com três formas alélicas, M_1 , M_2 e m , sendo o genótipo das plantas masculinas M_1m , das plantas hermafroditas M_2m e das femininas mm (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938). Embora a expressão fenotípica do sexo seja determinada pela presença de um gene, a mesma é bastante influenciada por fatores ambientais, principalmente a temperatura e umidade (Dantas *et al.*, 2002). O clima é um importante fator que afeta o rendimento do mamoeiro, sendo que a temperatura tem grande influência na formação de suas flores (Sippel *et al.*, 1989), podendo provocar anomalias florais. Considerando os três sexos, as plantas masculinas e hermafroditas são mais vulneráveis as anomalias florais quando comparadas com as plantas femininas, pois estas são mais estáveis durante o florescimento.

Condições de baixas temperaturas e excesso de umidade e nitrogênio no solo favorecem o aparecimento de pentandria e carpeloidia (Awada & Ikeda, 1957). A carpeloidia se caracteriza pela transformação dos estames em uma estrutura carnosa capaz de aderir parcial ou totalmente à parede dos carpelos, provocando a produção de frutos deformados e inapropriados para o comércio (Costa & Pacova, 2003). A pentandria se caracteriza pela redução do número de estames, de 10 para cinco, sendo que os estames remanescentes produzem cinco sulcos profundos na parede do ovário; os frutos produzidos serão deformados com a cavidade interna grande em relação à espessura da polpa, com sulcos bem pronunciados na casca e, portanto impróprios para o comércio (Dantas *et al.*, 2002).

Por outro lado, as temperaturas altas do verão provocam a reversão sexual na flor sendo este um problema recorrente nos plantios comerciais de mamão, e observada em plantas hermafroditas. Sob diferentes condições ambientais as flores hermafroditas apresentam o gineceu atrofiado, tornando-se masculinas funcionais; esse fenômeno é considerado como uma resposta dessas plantas às condições ambientais principalmente a temperatura (Storey, 1941). Figueiredo (2011) observou que primórdios florais de 4mm de tamanho já apresentam as características de reversão sexual e que em uma mesma axila floral há botões revertidos e botões normais, indicando ser a reversão um fenômeno pontual. As plantas masculinas também sofrem reversão, sendo comum em determinadas épocas do ano as flores masculinas desenvolverem ovário funcional, tornando-se hermafroditas funcionais com capacidade de produzir frutos popularmente, plantas conhecidas como “mamão macho” ou “mamão de corda” (Singh *et al.*, 1963).

A reversão sexual é um problema tão sério na cultura do mamoeiro que um dos objetivos dos programas de melhoramento é a seleção de plantas com baixa frequência de ocorrência dessa anomalia (Costa & Nacif, 1999); porém, o germoplasma do mamoeiro é todo ele sensível a estas alterações em maior ou menor grau; assim estabeleceu-se que a seleção de genótipos deve se concentrar em germoplasma que apresente até 10% de flores estéreis de verão (Costa & Pacova, 2003) e 10% de frutos carpelóides (Dantas *et al.*, 2002).

Damasceno Junior (2008) avaliou 23 linhagens e 22 híbridos obtidos entre linhagens do grupo Solo e Formosa e observou que as linhagens do grupo Solo tendem a ser mais vulneráveis a carpeloidia e pentandria enquanto que o material tipo Formosa é mais vulnerável a esterilidade de verão. Observou também que os híbridos apresentam médias superiores às das linhagens para as características pentandria, carpeloidia, e esterilidade de verão. De acordo com o autor os genótipos Costa Rica, SS (Prog.Tainung), Diva, Sunrise Solo, Caliman SG, Baixinho de Santa Amália, Caliman M5, Triwan Et, e Caliman G apresentaram baixa incidência de esterilidade de verão.

Em outro trabalho Damasceno Junior *et al.* (2008b) fizeram um levantamento do comportamento floral em dez progênies híbridas obtidas entre genitores Solo x Formosa em duas épocas de avaliação, março e setembro, e observaram um comportamento diferenciado dos genótipos entre épocas sendo que o número de flores masculinas funcionais foi maior em março (16,04)

comparado aos dados de setembro (6,69). O coeficiente de determinação (H^2) estimado foi de 94,36% em março e 79,61% em setembro. Os híbridos SS783 x JS12, SS72/12 x JS 12, TJ x JS11, SS783 x Tailândia, Sta. Barbara x Tailândia apresentaram uma alta produção de flores hermafroditas e baixa de flores revertidas. A combinação SS783 x JS12 foi considerada a mais promissora para a produção de frutos devido o seu comportamento floral nas duas épocas avaliadas.

Além da temperatura outro fator que causa a ocorrência das anomalias florais é a disponibilidade de água no solo (Awada & Ikeda, 1957); os cultivares Golden e Sunrise Solo quando cultivados sob irrigação apresentam baixa incidência de esterilidade de verão, provavelmente devido o fato de que esse sistema tende a elevar a umidade relativa do ar em torno da planta (Almeida *et al.*, 2003). Martelleto *et al.* (2011) avaliando a ocorrência de esterilidade de verão e carpeloidia no genótipo Baixinho de Santa Amália (BSA) cultivado sob manejo orgânico, em diferentes ambientes de proteção e manejado com ou sem bifurcação, concluíram que o BSA quando bifurcado apresentou uma baixa frequência de frutos carpelóides e alta de esterilidade de verão (77%); para esses autores a maior ocorrência de esterilidade de verão está correlacionada às temperaturas elevadas, a baixa luminosidade e menor vigor da planta.

Apesar da importância do tema para a cultura a ocorrência da esterilidade e das outras anomalias florais é estudada com base no fenótipo e há pouca ou quase nenhuma pesquisa quanto à expressão gênica dessas anomalias a nível celular. Ferramentas como a biologia celular, proteômica e outras poderão elucidar os genes e mecanismos envolvidos na expressão dessas anomalias (Figueiredo, 2011).

Temperatura e a reprodução sexual

Estudos realizados nas últimas décadas indicam que alterações climáticas estão ocorrendo e que afetarão todos os processos biológicos ao longo dos próximos anos (Hedhly *et al.*, 2008). Tais alterações incluem, entre outros fatores, aumento de temperatura, aumento da concentração de CO_2 e alterações no regime de chuvas (Solomon *et al.*, 2007). Nas plantas, as mudanças climáticas afetam tanto o seu desenvolvimento quanto a sua fisiologia (Hall, 2001), sendo um dos problemas para a adaptação das mesmas, principalmente quando esses estresses

coincidem com estádios críticos de desenvolvimento, como a floração (McWilliam, 1980). Em temperaturas muito altas, injúrias celulares severas e morte celular podem ocorrer em questões de minuto, devido ao colapso da organização celular. Em temperaturas moderadamente altas, injúrias ou morte podem ocorrer somente após uma exposição longa sendo as principais injúrias descritas a desnaturação e agregação de proteínas, aumento da fluidez dos lipídios na membrana. Efeitos indiretos de altas temperaturas podem incluir a inativação de enzimas no cloroplasto e mitocôndrias, inibição da síntese de proteína, degradação de proteínas e perda da integridade da membrana plasmática (Wahid *et al.*, 2007).

Em muitas espécies cultivadas o valor econômico consiste na semente e/ou fruto, resultantes da fase sexual da planta, e variações de temperatura fora do limite de tolerância suportado pela espécie podem comprometer a formação dos mesmos (Hedhly, 2011). Por isso estudos com intuito de identificar cultivares que sejam tolerantes às flutuações de temperatura principalmente nas plantas cultivadas e economicamente importantes vêm sendo realizados porém devido a complexidade do problema pouco tem sido obtido (Hall, 2001).

A consequência do estresse provocado tanto por temperaturas muito altas, quanto muito baixas dependem da intensidade, duração e velocidade da mudança de temperatura (Wahid *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2010).

Problemas acarretados por temperaturas extremas, altas ou baixas, têm consequências nos tecidos reprodutivos das plantas, afetando de maneira diferente as estruturas femininas e masculinas podendo gerar assincronismo no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (Herrero, 2003, Hedhly *et al.*, 2008). Altas temperaturas podem provocar defeitos na estrutura e função dos tecidos da corola, carpelos e estames, podendo reduzir o tamanho, número e causar deformidades nos órgãos florais (Takeoka *et al.*, 1991, Morrison & Stewart, 2002).

É importante que seja determinado a temperatura limite ou cardinal de uma cultura; temperatura limite se refere a um valor de temperatura média diária na qual começa uma redução detectável. Considera-se temperatura base ou mínima àquela a qual abaixo dela o crescimento ou desenvolvimento da planta é interrompido; temperatura superior ou máxima é aquela que acima dela o crescimento é interrompido. Essas temperaturas têm sido determinadas para as espécies cultivadas em condições naturais e experimentais e elas variam entre

espécies, entre genótipos dentro da espécie, e também depende das condições ambientais (Wahid *et al.*, 2007).

Assim, vários autores em diferentes espécies determinaram para a germinação *in vitro* de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico as temperaturas limites ou cardinais (Kakani *et al.* 2002, Young *et al.*, 2001, Hedhly *et al.*, 2005, Reddy & Kakani, 2007, Acar & Kakani, 2010, Zinn *et al.*, 2010, Prasad *et al.* 2011, Tamaki *et al.*, 2011).

Efeito da temperatura no grão de pólen

Estudos realizados em condições controladas sugerem que altas temperaturas são mais maléficas quando as flores surgem (primórdios florais) sendo que a sensibilidade continua por 10 a 15 dias (Wahid *et al.*, 2007). As fases reprodutivas mais sensíveis a alta temperatura são a gametogênese (8-9 dias antes da antese) e a fertilização (1-3 dias após antese) em várias plantas (Foolad, 2005). A redução na quantidade de frutos devido ao aumento da temperatura foram relatadas para algumas espécies como damasco (Rodrigo & Herrero, 2002), cerejeira (Hedhly *et al.*, 2007) e pêssigo (Kozai *et al.*, 2004).

A temperatura pode afetar a formação dos gametas, podendo diminuir a qualidade dos gametas que resultarão em problemas durante a fertilização e em casos mais graves podem provocar a completa esterilidade dos mesmos; durante a fase progâmica, da polinização a fertilização, tanto na parte masculina quanto na feminina com problemas na germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico, receptividade do estigma, viabilidade e longevidade do óvulo; ou ainda no período de formação do embrião (Hedhly, 2011). Mas, estudos sugerem que, quando analisado o efeito da temperatura separadamente sobre os gametas masculinos e femininos, o pólen é na maioria das vezes o mais vulnerável (Zinn *et al.*, 2010).

O grão de pólen é sensível a mudanças de temperatura desde seus primeiros estádios de desenvolvimento na antera até a ocorrência da dupla fertilização no gametófito feminino (Hedhly, 2011). Foi demonstrado que temperaturas elevadas podem afetar a deiscência das anteras e arquitetura da parede do grão de pólen, quantidade e morfologia do pólen, bem como sua

composição química e metabolismo (Aloni *et al.*, 2001, Prasad *et al.*, 2002, Koti *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento do grão de pólen, as alterações de temperatura provocam maiores danos. Embora o intervalo de tolerância seja variável entre as espécies, flutuações sutis de temperatura afetam de maneira negativa características como a viabilidade do pólen (Erickson & Markhart, 2002), a capacidade germinativa (Jóhannsson & Stephenson, 1998; Koti *et al.*, 2005), a taxa de crescimento do tubo polínico e produção de sementes e frutos (Sato *et al.*, 2002).

O efeito da temperatura sobre a germinação do grão de pólen é variável e dependente da espécie ou cultivar estudada (Sukhvibul *et al.*, 2000). Reddy e Kakani (2007) buscando a identificação de espécies/genótipos tolerantes a altas temperaturas estudaram sete acessos de espécies domesticadas de *Capsicum*, e observaram diferenças significativas quanto à germinação *in vitro* dos grãos de pólen, com média de 78% para máxima germinação; as temperaturas cardinais médias (T_{mim} , T_{otm} , T_{max}) observadas para todos os genótipos foram 15,2°C, 30,7°C, e 41,8°C, e baseado em um índice cumulativo de resposta a temperatura foi possível identificar acessos/espécies tolerantes a alta temperatura, intermediárias e sensíveis a altas temperaturas; esses genótipos deverão ser usados em programas de melhoramento visando o desenvolvimento de cultivares que possam produzir bem quando cultivados em altas temperaturas.

Em mamoeiro, esse tema tem sido estudado por Allan (1963a,b), Cohen *et al.* (1989), e Tamaki *et al.* (2011) onde se observa que há uma variação dependendo do genótipo e das condições em que o estudo foi realizado. Estudos que relacionam temperatura com germinação *in vitro* de grãos de pólen e crescimento de tubo polínico tem sido realizados para diferentes fruteiras, como citros (Distefano *et al.*, 2012), abacate (Alcaraz *et al.*, 2011), pistache (Acar & Kakani, 2010), pêra (Chagas *et al.*, 2010), pêsego (Hedhly *et al.*, 2005), damasco (Pirlak, 2002), e manga (Sukhvibul *et al.*, 2000).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material vegetal utilizado neste trabalho foram os genótipos JS12 e o híbrido UENF/CALIMAN01. As plantas foram cultivadas na Unidade de Apoio a Pesquisa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ. Foram plantadas dezesseis plantas por genótipo, distribuídas em quatro repetições, sendo cada parcela constituída por quatro plantas. As plantas foram dispostas em fileiras com espaçamento entre plantas de 2m e entre fileiras de 2m sob sistema de irrigação por aspersão; os tratamentos culturais foram dispensados conforme o recomendado para a cultura.

Os testes de germinação foram realizados no setor de Citogenética, do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da mesma universidade.

Metodologia

Para avaliação do efeito de temperatura na germinação *in vitro* de grãos de pólen, utilizou-se o meio de germinação composto de 5% de sacarose e 15ppm de ácido bórico definido como o melhor no trabalho anterior. A preparação foi realizada, individualmente, dissolvendo-se 5g de sacarose e 0,0015g de ácido bórico em 100ml de água destilada, com o auxílio de agitador magnético. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em tubos Falcon e guardadas em geladeira até que fossem utilizadas.

No período da manhã, flores recém-abertas foram coletadas. No laboratório, 100µl do meio de germinação foi colocado nas lâminas e os grãos de pólen foram distribuídos com auxílio de uma pinça sobre a solução. Foram preparadas cinco lâminas por tratamento, sendo as mesmas colocadas em câmara úmida e em incubador do tipo BOD com temperatura controlada variando de 15°C a 40°C, em intervalos de 5°C (15, 20, 25, 30, 35, 40°C).

Quatro horas após a incubação realizou-se a contagem dos grãos de pólen germinados, esta foi feita ao acaso sob microscópio campo claro usando uma

objetiva de baixa magnitude (10x). Foram contados em cada campo de observação o número de grãos de pólen germinados e não germinados, sendo contado no total 500 grãos de pólen por lâmina, totalizando 2500 grãos de pólen por tratamento. Foram considerados grãos de pólen germinados àqueles cujo tubo polínico apresentou comprimento superior ao diâmetro do grão de pólen (Dafni & Firmage 2000, Acar & Kakani 2010). O percentual de germinação *in vitro* de grãos de pólen foi estimado pela relação entre o número de grãos de pólen germinados pelo total de grãos de pólen contados em um campo de observação.

A variável de estudo foi submetida a análise de variância utilizando o programa SAS (1999). Para tal, os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$. O experimento foi conduzido utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial genótipo x temperatura, os graus de liberdade para os tratamentos, foram desdobrados nos seus efeitos e comparados via teste de comparação de médias e análise de regressão. Para melhor apresentação dos resultados, considerando as tabelas e gráficos, priorizou-se a utilização dos dados não transformados.

A determinação de temperaturas cardinais é muito utilizada nos estudos de germinação *in vitro* em resposta a temperatura. Estas temperaturas são definidas em temperatura mínima (T_{min}), na qual abaixo dela a germinação pode não ocorrer; a temperatura ótima (T_{otm}), na qual o grão de pólen atinge o máximo de germinação e a temperatura máxima (T_{max}), a partir dela não ocorre germinação do grão de pólen.

eraturas cardinais ou seja, a T_{min} (temperatura mínima na qual o grão de pólen germina; abaixo dela a germinação pode não correr), a T_{otm} (temperatura ideal na qual o grão de pólen atinge o máximo de germinação) e a T_{max} (temperatura máxima onde a partir dela não ocorre a germinação do grão de pólen).

Os dados de germinação *in vitro* em resposta a temperatura foram analisados utilizando modelo de regressão linear e não-lineares muito utilizados neste tipo de estudo (Acar & Kakani, 2010, Salem *et al.*, 2007). O ajuste de cada equação de regressão, descrevendo a resposta da germinação do pólen à temperatura, foi comparado pela variação explicada pelo coeficiente de determinação (R^2) e pelo erro padrão. O mais alto R^2 e o menor erro padrão foram utilizados para selecionar o modelo de regressão mais adequado aos dados.

O procedimento PROC IML (SAS 1999) foi utilizado para estimar os parâmetros do modelo de regressão não-linear quadrático (Equação 1), onde T é a temperatura referente ao tratamento, a, b, e c são os parâmetros da regressão de cada genótipo geradas pelo SAS. Assim, as temperaturas mínima (T_{\min}), ótima (T_{otm}) e máxima (T_{\max}), foram estimadas conforme Acar & Kakani (2010) e Salem *et al.* (2007) pelas equações 2 a 4:

$$\text{Germinação grão de pólen} = a + bT + cT^2 \quad (1)$$

$$(2) \quad T_{\text{otm}} = \frac{-b}{2c}$$

$$(3) \quad T_{\min} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2c}$$

$$(4) \quad T_{\max} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2c}$$

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância dos dados de germinação *in vitro* dos grãos de pólen revelou diferenças significativas a 1% de probabilidade para genótipos, temperaturas e a interação genótipo x temperatura (Tabela 1). O coeficiente de variação baixo indicou que o experimento teve uma boa precisão.

O máximo de germinação registrado foi de 81,72% em JS12 e de 78,04% em UENF/CALIMAN01, ambos obtidos quando os grãos de pólen foram cultivados a 30°C. Na temperatura de 25°C observou-se que em JS12 houve uma boa germinação (69,36%); porém para o UENF/CALIMAN01 a germinação foi baixa (24,40%). Nas demais temperaturas 15, 35 e 40°C a germinação dos grãos de pólen foi muito baixa, quase nula, em ambos os genótipos (Tabela 2).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para variável de germinação *in vitro* de grãos de pólen de dois genótipos de mamoeiro submetidas a diferentes temperaturas.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Genótipo (G)	1	17,038**	240,30
Temperatura (T)	5	99,329**	1400,88
G x T	5	3,908**	55,12
Resíduo	48	0,0709	
Total	59	-	
C.V(%)		6,37	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Cohen *et al.* (1989) estudando o efeito da temperatura na germinação de grãos de pólen de flores masculinas de mamoeiro, não verificaram germinação a 5°C e uma redução drástica a 40°C; para esses autores a faixa de temperatura ideal seria 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. Para Allen (1963b) a faixa de 18-24°C permitiu um bom percentual de germinação dos grãos de pólen, sendo a temperatura de 30°C a que forneceu os melhores resultados.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação de grãos de pólen dos genótipos UENFCALIMAN/01 e JS12 em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Genótipos					
	15	20	25	30	35	40
JS12	0,84Ae	9,12Ad	69,62Ab	81,72Aa	19,64Ac	4,15Ae
UENFCALIMAN/01	0,04Be	3,48Bd	24,40Bb	78,04Ba	19,72Bc	0,24Be

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a resposta da germinação *in vitro* dos grãos de pólen a temperatura o uso de modelos de regressão linear e não linear têm sido utilizados. Baseado nos resultados o modelo que melhor ajustou a variável resposta foi o modelo não-linear do tipo Gaussian. Verificou-se um aumento gradual do percentual de germinação até 30°C e após esta, os índices de germinação decresceram nos dois genótipos (Figura 1).

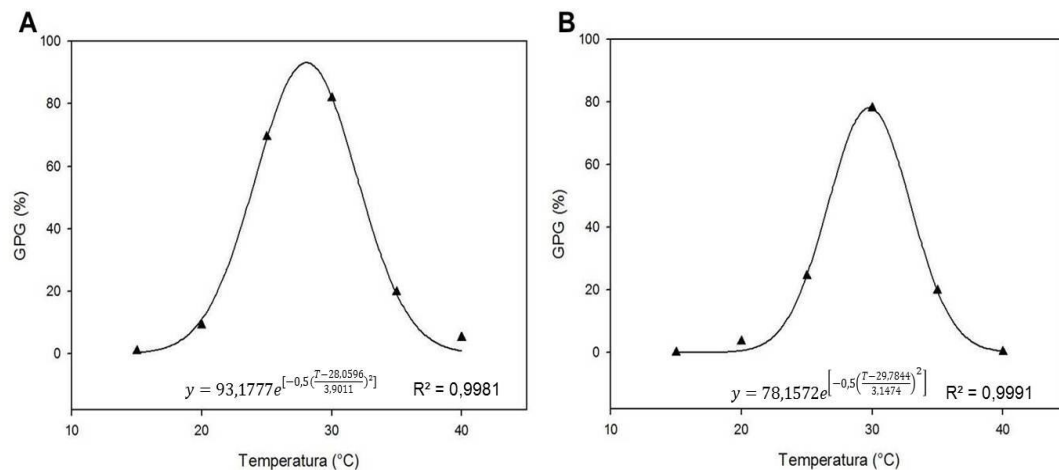


Figura 1 – Germinação do grão de pólen em resposta a temperatura. A) JS12, B) UENF/CALIMAN01.

Além de afetar a capacidade de germinação do grão de pólen, a temperatura influencia no crescimento do tubo polínico, podendo acelerá-lo ou retardá-lo (Hedhly, 2011). O crescimento dos tubos polínicos foi afetado pela temperatura nos dois genótipos (Figura 2). Além de baixos índices de germinação, temperaturas baixas (20 e 15°C) propiciaram menor alongamento dos tubos polínicos (Figura 2A, 2B, 2G e 2H). Acréscimo no desenvolvimento dos tubos foi observado em 25°C (Figura 2C e 2I) e tubos polínicos mais desenvolvidos foram encontrados na temperatura a 30°C (Figura 2D e 2J), a partir desta houve decréscimo no alongamento dos mesmos.

Trabalhos anteriores em mamoeiro mostraram resultados similares, Cohen *et al.* (1989) observaram que a 40°C o crescimento dos tubos polínicos era retardado. Tamaki *et al.* (2011) avaliando o efeito de sete temperaturas constantes encontraram diferenças significantes no crescimento dos tubos polínicos, segundo os autores os tubos polínicos mais desenvolvidos foram encontrados a 25°C,

seguidos por 20, 30, 15 e 35°C, enquanto a 40°C o comprimento do tubo polínico foi muito curto.

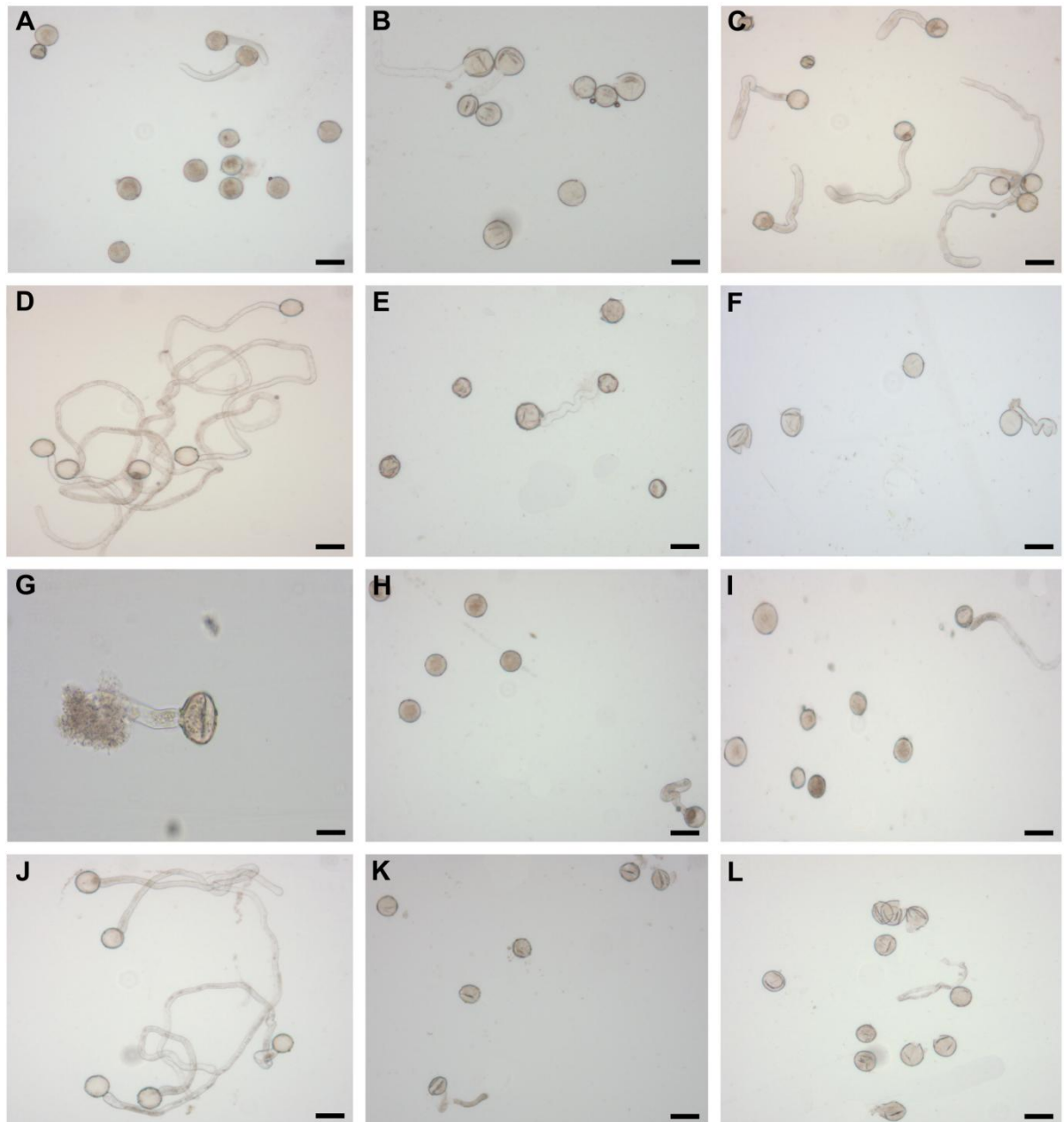


Figura 2 – Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de JS12 (A-F) e UENF/CALIMAN01 (G-L). A) Grãos de pólen incubados a 15°C, B) Grãos de pólen incubados a 20°C, C) Grãos de pólen incubados a 25°C, D) Grãos de pólen incubados a 30°C, E) Grãos de pólen incubados a 35°C, F) Grãos de pólen incubados a 40°C, G) Grãos de pólen incubados a 15°C, H) Grãos de pólen incubados a 20°C, I) Grãos de pólen incubados a 25°C, J) Grãos de pólen incubados a 30°C, K) Grãos de pólen incubados a 35°C, L) Grãos de pólen incubados a 40°C. Barra = 50µm

Variações de temperatura fora do limite de tolerância suportado pela espécie podem comprometer a germinação dos grãos de pólen (Hedhly, 2011). Embora determinada faixa de temperatura possa ser adequada para a germinação, é importante se conhecer as temperaturas cardinais para uma determinada característica medida em um determinado genótipo.

As temperaturas cardinais (T_{\min} , T_{otm} , T_{\max}) foram obtidas para os dois genótipos de mamoeiro (Tabela 3). A temperatura mínima variou de 15,9°C a 16,5°C com média de 16,2°C. A temperatura máxima variou de 39,3 (JS12) a 40,3 (UENF/CALIMAN01), com média de 40,1. Já as temperaturas ótimas para a máxima germinação dos grãos de pólen foram 27,9 e 28,5°C para JS12 e UENF/CALIMAN01, respectivamente, com média de 28,2°C. Acima de 40,1°C a germinação *in vitro* dos grãos de pólen é prejudicada, o que valida os resultados obtidos neste trabalho em que a germinação e crescimento dos tubos polínicos em ambos os genótipos foram bastante reduzidos. 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.

Observa-se que há pouca variação entre os genótipos; provavelmente devido à proximidade genética dos dois já que JS12 é um dos genitores do UENF/CALIMAN01 (Pereira *et al.*, 2003). O outro genitor SS 72/12 não foi testado nesse trabalho em função de problemas sofridos por suas plantas no campo, como morte de algumas plantas, acometimento de doença, bem como reversão sexual que impediram que se conseguisse bom número de flores hermafroditas para realizar os estudos junto com os outros dois genótipos.

Tabela 3 – Temperaturas cardinais para germinação *in vitro* de grãos de pólen.

Genótipo	Temperaturas cardinais (°C)		
	T_{\min}	T_{otm}	T_{\max}
JS12	15,9	27,9	39,9
UENF/CALIMAN01	16,5	28,5	40,3
Média	16,2	28,2	40,1

A germinação reduzida a 15 e acima de 35°C e a temperatura ótima de germinação 27,9-28,5°C podem refletir a origem tropical da espécie, visto que resultados semelhantes com temperaturas ótimas relativamente altas foram relatados para outras espécies subtropicais e tropicais.

Em espécies do gênero *Pistacia*, Acar & Kakani, (2010) avaliando oito temperaturas (5 a 40°C, com intervalos de 5°C) observaram média de 91,6% para germinação *in vitro* dos grãos de pólen de nove espécies estudadas e as temperaturas cardinais médias (T_{\min} , T_{otm} , T_{\max}) observadas para todos os genótipos foram 6,7°C, 23,9°C e 41,1°C.

Em estudos com genótipos de diferentes espécies de *Capsicum*, as temperaturas cardinais médias (T_{\min} , T_{otm} , T_{\max}) observadas para todos os genótipos foram 15,2°C, 30,7°C, e 41,8°C e baseado em um índice cumulativo de resposta à temperatura foi possível identificar espécies/genótipos sensíveis, intermediários e tolerantes a altas temperaturas (Reddy & Kakani, 2007).

A influência da temperatura na germinação de grão de pólen de seis genótipos de abacate foi estudada por Alcaraz *et al.* (2011), os autores observaram que 30°C forneceu os melhores índices de germinação para a maioria dos genótipos estudados. Para fruteiras de clima temperado, as temperaturas ótimas tendem a ser menores, como em damasco que varia entre 15-20°C e acima de 25°C se tem redução da germinação *in vitro* dos grãos de pólen (Egea *et al.*, 1992) e cerejeira (Pirlak, 2002).

As variações encontradas entre os resultados descritos neste trabalho e nas demais podem ser explicadas pelo fato do efeito da temperatura na germinação *in vitro* do grão de pólen ser variável entre as espécies e entre os genótipos da mesma espécie (Sukhvibul *et al.*, 2000).

3.2.5. CONCLUSÕES

Foram observadas diferenças significativas entre os genótipos, temperaturas e na interação entre eles;

O percentual de germinação foi bem reduzido em temperatura baixa (15°C) e aumentou gradativamente atingindo o maior valor a 30°C, e acima desta os

índices de germinação decresceram. Portanto, temperaturas altas e baixas têm efeito negativo na germinação dos grãos de pólen do mamoeiro;

Para os dois genótipos a temperatura de 30°C foi a que proporcionou um percentual alto de grãos de pólen germinados, sendo 78,04% para UENF/CALIMAN01 e 81,72% para JS12.

As temperaturas cardinais (T_{\min} , T_{otm} , T_{\max}) obtidas foram 15,9, 27,9 e 39,9°C para o genótipo JS12, e 16,5, 28,5 e 40,3°C para o UENF/CALIMAN01. A determinação das temperaturas cardinais é de grande importância, pois permitem identificar o nível de tolerância dos genótipos/espécies sob temperaturas altas e baixas.

4. 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**, 125:569–572.
- Agriannual. **Anuário da agricultura brasileira** (2011) São Paulo. FNP Consultoria e Agroinformativos, 345-370.
- Alcaraz, M.L., Montserrat, M., Hormaza, J.I. (2011) *In vitro* pollen germination in avocado (*Persea americana* Mill.): Optimization of the method and effect of temperature. **Scientia Horticulturae**, 130:152-156.
- Almeida, F.C.G., Silva, J.F. da, Alves, J.F., Silva, F.P. da, Almeida, F.A.G. (1987) Estudo da germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*: II., efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês. **Ciência Agrônômica**, 18:117-123.
- Almeida, F.T., Marinho, C.S., Souza, E.F., Gripta, S. (2003) Expressão sexual do mamoeiro sob diferentes lâminas de irrigação na região Norte Fluminense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25:383-395.
- Aloni, B., Peet, M., Pharr, M., Karni, L. (2001) The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. **Physiologia Plantarum**, 112:505–512.

- Allan, P. (1963a) Pollen Studies in *Carica Papaya*. I. Formation, development, morphology and production of pollen. **South African Journal of Agricultural Sciences**, 6:517-530.
- Allan, P. (1963b) Pollen Studies in *Carica Papaya*. II. Germination and storage of pollen. **South African Journal of Agricultural Sciences**, 6:613–624.
- Araujo, F.S., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. (2010) Genome size, base composition and karyotype of *Carica papaya* L. **Nucleus**, 53:25-31.
- Arkle Jr., T.D., Nakasome, H.Y. (1984) Floral differentiation in the hermaphrodite papaya. **Hortscience**, 19:832-834.
- Askin, A., Hepaksoy, S., Ozcagiran, R. (1990) Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise**, 27:105-116.
- Awada, M., Ikeda, W.S. (1957) Effects of water and nitrogen application on composition, growth, sugars in fruits, yield and sex expression of the papaya plants (*Carica papaya* L.). **Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii**.
- Badillo, V.M. (1971) Monografia de la familia *Caricaceae*. **Editorial Nuestra América** C.A. Maracay Venezuela, p.221.
- Bajpai, A., Singh, A. (2006) Meiotic behavior of *Carica papaya* L.: spontaneous chromosome instability and elimination in important cvs. in North Indian conditions. **Cytologia**, 71:131-136.
- Barth, O.M., Melhem, T.S. (1988) **Glossário Ilustrado de Palinologia**. Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas.
- Berry, S. Z., Rafique-Uddin, M. (1988) Effect of high temperature on fruit set in tomato cultivar and selected germplasm. **HortScience**, 23:606-608.
- Blum, A. (1988) Plant breeding for stress environments. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 223pp.

- Cerovic, R., Rizic, D., Micic, N. (2000). Viability of plum ovule at different temperatures. **Annual Applied Biology**, 137:53-59.
- Cohen, E., Lavi, U., Spiegel-Roy, P. (1989) Papaya pollen viability and storage. **Scientia Horticulturae**, 40:317-324.
- Costa, A.F.S., Pacova, B.E.V. (2003) 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.
- Costa, F.A.D., Nacif, S.R. (1999) Hibridação em mamão. *In*: Borém, A. (Ed). **Hibridação Artificial em Plantas**. Viçosa, Editora UFV. P. 307-329.
- Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Hodnett, G.L., Pereira, M.G., Stelly, D.M. (2008) Fluorescent *in situ* hybridization of 18S and 5S rDNA in papaya (*Carica papaya* L.) and wild relatives. **Caryologia**, 61:411-416.
- Chagas, E.A., Pio, R., Chagas, P.C., Pasqual, M., Bettioli Neto, J.E. (2010) Composição do meio de cultura e condições ambientais para a germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, 40:261-266.
- Dafni, A. (1992) **Pollination ecology: a practical approach**. New York, Oxford University Press.
- Dafni, A., Firmage, D. (2000) Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, 222:113-132.
- Dajoz, I., Bottraud, I.T., Gouyon, P.H. (1991) Evolution of pollen morphology. **Science**, 253:66-68.
- Dalkiliç, Z., Mestav, H.O. (2011) *In vitro* pollen quantity, viability, and germination tests in quince. **African Journal of Biotechnology**, 10:16516-16520.
- Damasceno Junior, P.C., Pereira, T.N.S., Freitas Neto, M., Pereira, M.G. (2010) Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, 63:229-236.

- 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 (*C. papaya* L.). **Caryologia**, 62:10-15.
- Damasceno Junior, P.C., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Silva, F.F., Souza, M.M., Nicoli, R.G. (2009b) Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L.; Caricaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31:182-189.
- Damasceno Junior, P.C., Pereira, T.N.S., Pereira, M.G., Silva, F.F. (2008a) Conservação de grão de pólen de mamoeiro. **Ceres**, 55:433-438.
- Damasceno Junior, P.C., Pereira, T.N.S., Silva, F.F., Viana, A.P., Pereira, M.G. (2008b) Comportamento floral de híbridos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) avaliados no verão e primavera. **Ceres**, 55:310-316.
- Damasceno Junior, P.C. (2008) **Estudos citogenéticos, genéticos, e moleculares como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 139pp.
- Dantas, A.C.M., Peixoto, M.L., Nodari, R.O., Guerra, M.P. (2005) Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 27:356-359.
- Dantas, J.L.L., Dantas, A.C.V.L., Lima, J.F. (2002) **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa, UFV, 422p.
- Decraene, L.R., Smets, E.F. (1999). The floral development and anatomy of *Carica papaya* (Caricaceae). **Canadian Journal of Botany**, 77:582-598.
- Derin, K.; Eti, S. (2001) Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 25:169-173.
- Distefano, G., Hedhly, A., Las Casas, G., La Malfa, S., Herrero, M., Gentile, A. (2012) Male–female interaction and temperature variation affect pollen performance in *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, 140:1-7.

- Egea, J., Burgos, L., Zoroa, N., Egea, L. (1992) Influence of temperature on the *in vitro* germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Journal Horticultural Science**, 67:247-250.
- Ehlers, J.D., Hall, A.E. (1998) Heat tolerance of contrasting cowpea lines in short and long days. **Field Crop Research**, 55:11-21.
- Elgersma, A., Stephenson, A.G., Nijs, A.P.M. (1989) Effects of genotype and temperature on pollen tube growth in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Sexual plant reproduction**, 2:225-230.
- Erdtman, G. (1986) pollen morphology and plant taxonomy: an introduction to palynology. 2nd Ed, Almqvist e Wiksell, Stockholm, Sweden. 553p.
- Erickson, A.N., Markhart, A.H. (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annum* L.) to elevated temperature. **Plant Cell Environ**, 25:123–130.
- Faostat. (2012) FAO (Food and Agriculture Organization). Faostat on-line electronic database <http://faostat.fao.org>
- Figueiredo, M. (2011) **Morfologia floral e análises de genes envolvidos na reversão sexual em mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacaezs, RJ, 64pp.
- Foolad, M.R. (2005). Breeding for abiotic stress environmental in tomato. In: Ashraf, M.; Harris, P.J.C. (Eds.). Abiotic stresses: **Plant resistance through breeding and molecular approaches**. The Haworth Press Inc., New York, USA. Pp. 613-684.
- Franzon, R.C., Raseira, M.C.B., Wagner Jr, A. (2007) Testes de germinação *in vitro* e armazenamento de pólen de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Acta Scientarium**, 29:251-255.
- Galletta, G.J. (1983) Pollen and seed management. In: J. N. Moore & J. Janick (eds.) **Methods in Fruits Breeding**. Indiana, Purdue University. Pp.23-47.

- Geetha, K., Jayaraman, N. (2000) Pollen germination and pollen tube growth studies in *in vitro* in maize. **Indian Journal of Agriculture Research**, 34:206-208.
- Hall, A.E. (ed.) (2001) **Crop Response to Environment**, CRC Press
- Hauser, E.J.P., Marrison, J.H. (1964) The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. **American Journal of Botany**, 51:748-752.
- Hedhly, A. (2011) Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. **Environmental and Experimental Botany**, 74:9-16.
- Hedhly, A., Hormaza, J.I., Herrero, M. (2008) Global warming and plant sexual reproduction. **Trends in Plant Science**, 14:30-36.
- Hedhly, A., Hormaza, J.I., Herrero, M. (2007) Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. **Journal of Applied botany and Food Quality**, 81:158-164.
- Hedhly, A., Hormaza, J.I., Herrero, M. (2005) The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth and stigmatic receptivity in peach (*Prunus persica* L. Batsch.). **Plant Biology**, 7:476-483.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M. (2003) The effect of temperature on stigma receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Plant Cell Environment**, 26: 1673-1680.
- Herrero, M. (2003) Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 358:1019-1024.
- Hofmeyr, J.D.J. (1938) Genetical studies of *Carica papaya* L. **South African Journal of Science**, 35:300-304.
- Horner, H.T., Palmer, R.G. (1995) Mechanisms of genic male sterility. **Crop Science**, 35:1527-1535.

- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M., Van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A. (eds.) (2001) *Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I of the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Imani, A., Barzegar, K., Piripireivatlou, S., Masomi, S.H. (2011) Storage of apple pollen and *in vitro* germination. **African Journal of Agricultural Research**, 6:624-629.
- Jóhannsson, M.H., Stephenson, A.G. (1998) Effects of temperature during microsporogenesis on pollen performance in *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae). **International journal of plant sciences**, 159:616-626.
- Jones, P.D., New, M., Parker, D.E., Mortin, S., Rigor, I.G. (1999) Surface area temperature and its change over the past 150 years. **Review Geophysics**, 37:173-199.
- Kakani, V.G., Reddy, K.R., Koti, S., Wallace, T.P., Prasad, P.V.V., Reddy, V.R., Zhao, D. (2005) Differences *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of botany**, 96:59-67.
- Kakani, V.G., Prasad, P.V.V., Craufurd, P.Q., Wheeler, T.R. (2002) Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. **Plant, Cell & Environment**, 25:1651-1661.
- Koti, S., Reddy, K.R., Reddy, V.R., Kakani, V.G., Zhao, D. (2005) Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. **Journal of Experimental Botany**, 56:725-736.
- Kozai, N., Beppu, K., Mochioka, R., Boonprakob, U., Subhadrabandhu, S., Kataoka, I. (2004) Adverse effects of high temperature on the development

- of reproductive organs in 'Hakuho' peach trees. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 79:533-537.
- Lush, W.M. (1999) Winter chemotropism and pollen tube guidance. **Trends Plant Science**, 4:413-418.
- Magdalita, P.M., Drew, R.A., Godwin, L.D., Adkins, S.W. (1998) An efficient interspecific hybridization protocol for *Carica papaya* L. x *C. cauliflora* Jacq. **Animal Production Science**, 38:523-530.
- Marcellán, O.N., Camadro, E.L. (1996) The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, 67:101-104.
- Martelleto, L.A.P., Ribeiro, R.L.D., Sudo-Martelleto, M., Vasconcellos, M.A.S., Pereira, M.B. (2011) Expressão da esterilidade feminina e da carpeloidia em mamoeiro sob diferentes ambientes de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33:1185-1193.
- Márton, M.L., Dresselhaus, T. (2010) Female gametophyte-controlled pollen tube guidance. **Biochemical Society Transactions**, 38:627-630.
- McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. **The plant cell**, 5:1265-1275.
- McWilliam, J.R. (1980) Adaptation of plants to water and high temperature stress: summary and synthesis – adaptation to high temperature stress. *In*: Turner, N.C., Krammer, P.J. (eds.) **Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress**. John Wiley and Sons, New York, 444-447.
- Ming, R., Yu, Q., Moore, P.H. (2007) Sex determination in papaya. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 18:401-408.
- Miranda, P.A., Clement, C. R. (1990) Germination and storage of pejobaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, 38:29-33.
- Mondal, S., Ghanta, R. (2012) Effect of sucrose and boric acid on *in vitro* pollen germination of *Solanum Macranthum* Dunal. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, 2:202-206.

- Moore, P. D., Webb, J. A. (1978) **An illustrated guide to pollen analysis**. 1.ed. New York: A Halsted Press Book, 133p.
- Moreira, M.D., Coutinho, P.M., Skolwronski, L., Couto, F.A.A., Rosado, J.F., Fidelis, E.G. (2005) Interferência *in vitro* de pesticidas e condições ideais para a germinação e crescimento do tubo polínico do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Acta Scientiarum**, 27:171-176.
- Morrison, M.J., Stewart, D.W. (2002) Heat stress during flowering in summer Brassica. **Crop Science** 42:797-803.
- Munhoz, M., Luz, C.F.P., Meissner Filho, P.E., Barth, O.M., Reinert, F. (2008) Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, 31:209-214.
- Nunes, J.C.O., Dantas, A.C.M., Pedrotti, E.L., Orth, A.I., Guerra, M.P. (2001) Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23:35-39.
- Palmer, R.G., Albertsen, M.C., Horner, H.T. (1992) Male sterility in soybean and maize: developmental comparisons. **Nucleus**, 35:1-18.
- Peet, M.M., Willits, D.H. (1998) The effect of high temperature on greenhouse grown tomato yields in warm climate. **Agriculture Forest Meteorology**, 92:191-202.
- Pfahler, P.L. (1967) *In vitro* germination and pollen tube growth of maize (*Zea mays* L.) pollen: calcium and boron effects. **Canadian Journal of Botany**, 45:839-845.
- Pio, L.A.S., Santos, F.C., Rufini, J.C.M., Ramos, J.D., Araújo, A.G. (2004) Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10:293-296.
- Pirlak, L. (2002) The effects of temperature on pollen germination and pollen tube growth of apricot and sweet cherry. **Gartenbauwissenschaft** 67:61-64.

- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen Jr., L.H., Thomas, J.M.G. (2002) Effects of elevated temperature and carbon dioxide on seed-set and yield of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L) **Global Change Biology**, 8:710-721.
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen Jr., L.H. (2011) Longevity and temperature response of pollen as affected by elevated growth temperature and carbon dioxide in peanut and grain sorghum. **Environmental and Experimental Botany**, 70:51-57.
- Raynor, G.S., Cohen, L.A., Hayes, J., Ogden, E. (1966) Dyed pollen grains and spores as tracers in dispersion and deposition studies. **Journal of applied meteorology**, 5:728-729
- 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 horticultrae**, 112:130-135.
- Reis, R.V., Morais, L.S., Silva, S.O., Amorim, E.D., Ledo, C.A.S., Viana, A.P. (2011) Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bananeira sob diferentes concentrações de ácido bórico e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:547-553.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E., Gasser, C.S. (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female sterile mutants. **Plant Cell**, 4:1237-1250.
- Rodrigo, J., Herrero, M. (2002). Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. **Scientia Horticulturae**, 92:125-135.
- Rodriguez-Riano, T., Dafni, A. (2000) A new procedure to asses pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, 12:241-244.
- Russell, S.D. (1992) Double Fertilization. **International review of Cytology**, 140:357-388.
- Salem, M.A., Kakani, V.G., Koti, S., Reddy, K.R. (2007) Pollen-based screening of soybean genotypes for high temperatures. **Crop Science**, 47:219-231.

- Salles, L.A., Ramos, J.D., Pasqual, M., Junqueira, K.P., Silva, A.B. (2006) Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, 30:170-174.
- Santos, L.M.S., Pereira, T.N.S., Souza, M.M., Damasceno Junior, P.C., Costa, F.R., Ribeiro, B.F., Freitas, N.G., Pereira, M.G. (2008) Optical and ultrastructural study of pollen grain development in hermaphrodite papaya tree (*Carica papaya* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 51:539-545.
- SAS Institute (1999) SAS/STAT User's guide, version 9.2. SAS Institute, Inc. Cary, NC.
- Sato, S., Peet, M.M., Thomas, J.F. (2002) Determining critical pre-and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. **Journal of Experimental Botany**, 53:1187-1195.
- Saxe, H., Cannell, M.G., Johnsen, Ø., Ryan, M.G., Vourlitis, G. (2002) Tree and forest functioning in response to global warming. **New Phytologist**, 149: 369-399.
- Scorza, R., Sherman, W.B. (1995) Peaches. *In*: Janik, J., Moore, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John, Sons, 325-440.
- Sharma, H.C., Bajpai, P.N. (1969) Studies on floral biology of papaya. **Indian Journal of Science**, 3:28-32.
- Sierra, C.L.S., Caetano, C.M., Servia, J.L.C., Lagos, T.C. (2006) Palinología de *Carica* y *Vasconcellea* (Caricaceae). **Acta Agronómica**, 55:33-38.
- Silva J.A.T., Rashid, Z., Nhut, D.T., Sivakumar, D., Gera, A., Souza Jr., M.T., Tennant, P.F. (2007) Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. **Tree and Forest Science and Biotechnology**, 1:47-73.
- Singh, R.N., Majumdar, P.K., Sharma, D.K. (1963) Seasonal variation in the sex expression of papaya. **Indian Journal Agricultural Science**, 33:261-267.

- Sinimbú Neto, F.A., Martins, A.B.G., Barbosa, J.C. (2011) Viabilidade *in vitro* de grãos de pólen de bacurizeiro – Clusiaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33:593-600.
- Sippel, A., Claassens, N., Holtzhausen, L. (1989) Floral differentiation and development in *Carica papaya* L. cultivar 'Sunrise Solo'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 40:23-33.
- Soler J.B., Nolla J.M.R. (2002) Introducción. In: Valero-Santiago AL, Cadahia-García A (Eds): **Polinosis, Polen y Alergia**, 7-16. MRA ediciones, España.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M.M.B., Miller, H.L., Cheng, Z. (eds.) (2007) **Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. New York: Cambridge University Press.**
- Stanley, R.G., Linskens, H.F. (1974) **Pollen: biology, Biochemistry management**. New York: Springer-Verlag, p.172.
- Storey, W.B. (1938) The primary flower types of papaya and the fruit types that develop from them. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, 35:83-85.
- Storey, W.B. (1941) The botany and sex relations of papaya. **Hawaii Agricultural Experiment Station Bulletin**, 87:5-22.
- Storey, W.B. (1958) Modification of sex expression in papaya. **Hort. Adv.** 2:49-60
- Sukhvibul, N., Whiley, A.W., Vithanage, V., Smith, M.K., Doogan, V.J., Hetherington, S.E. (2000) Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (*Mangifera indica* L.) **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 75:64-68.
- Takeoka, Y., Hiroi, K., Kitano, H., Wada, T. (1991) Pistil hyperplasia in rice spikelets as affected by heat-stress. **Sexual Plant Reproduction**, 4:39-43.

- 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.
- Taylor, L.P., Hepler, P.K. (1997) Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48:461-91.
- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J.A., Berger, J.D., Nayyar, H. (2010) Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environmental Experimental Botany**, 67:429-443.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007) Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental Experimental Botany**, 61:199-223.
- Wang, Q., Lu, L., Wu, X., Li, Y., Lin, J. (2003) Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. **Tree Physiology**, 23:345-351.
- Warren, G.F. (1998) Spectacular increase in crop yields in the twentieth century. **Weed Technology**, 12:752-760.
- Wolters-Arts, M., Lush, W.M., Mariani, C. (1998) Lipids are required for directional pollen-tube growth. **Nature**, 392:818-821.
- Young, T.E.; Ling, J., Geisler-Lee, C.J., Tanguay, R.L., Caldwell, C.; Gallie, D. R. (2001). Developmental and thermal regulation of maize heat shock protein, HSP101. **Plant Physiology**, 127:777-791.
- Zinn, K.E., Tunc-Ozdemir, M., Harper, J.F. (2010) Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, 61:1959-1968.