

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO  
DE PLANTAS  
RAFAELA GRAZIELE CASTRILLON**

**Estudos reprodutivos em *Cucurbita spp*: comportamento pós -  
meiótico, viabilidade polínica e efeito da temperatura no  
crescimento do tubo polínico.**

ALTA FLORESTA  
MATO GROSSO- BRASIL  
JANEIRO – 2018

RAFAELA GRAZIELE CASTRILLON

**Estudos reprodutivos em *Cucurbita spp*: comportamento pós -  
meiótico, viabilidade polínica e efeito da temperatura no  
crescimento do tubo polínico.**

Dissertação apresentada à  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO  
GROSSO, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Genética  
e Melhoramento de Plantas, para obtenção  
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Alessandro  
Machado Souza

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Aparecida  
Bandini Rossi

ALTA FLORESTA  
MATO GROSSO- BRASIL  
JANEIRO – 2018

Walter Clayton de Oliveira CRB 1/2049

C355e CASTRILLON, Rafaela Grazielle .  
Estudos Reprodutivos em Cucurbita Spp: Comportamento Pós - Meiótico, Viabilidade Polínica e Efeito da Temperatura no Crescimento do Tubo Polínico. / Rafaela Grazielle Castrillon - Alta Floresta/ Cáceres/ Tangará da Serra, 2018.  
50 f.; 30 cm.(ilustrações) Il. color. (sim)

Artigo Científico - Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado Acadêmico) Genética e Melhoramento de Plantas, Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Multicampi, Universidade do Estado de Mato Grosso, 2018.  
Orientador: Sérgio Alessandro Machado Souza  
Coorientador: Ana Aparecida Bandini Rossi

1. Pólen. 2. Morfologia Polínica. 3. Abóbora. I. Rafaela Grazielle Castrillon. II. Estudos Reprodutivos em Cucurbita Spp: Comportamento Pós - Meiótico, Viabilidade Polínica e Efeito da Temperatura no Crescimento do Tubo Polínico.: .  
CDU 633

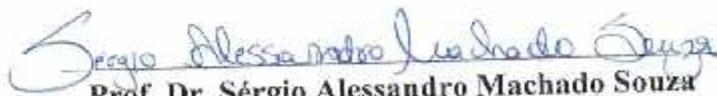
**Estudos reprodutivos em *Cucurbita* spp: comportamento pós-meiótico, viabilidade polínica e efeito da temperatura no crescimento do tubo polínico.**

**RAFAELA GRAZIELE CASTRILLON**

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 19 de janeiro de 2018.

Comissão Examinadora:



**Prof. Dr. Sérgio Alessandro Machado Souza**  
Orientador - UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso



**Prof. Dr. Ana Aparecida Bandini Rossi**  
UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso



**Dra. Aisy Botega Baldoni Tardin**  
Embrapa Agrossilvipastoril

Aos meus pais, Douglas e Natanagilda, a meus irmãos, Douglas Jr. e Adriano  
pelo apoio incondicional.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por proporcionar cada novo amanhecer, por me guiar no caminho, dando-me força e proteção.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

À meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Alessandro Machado Souza que muito acrescentou em minha formação acadêmica nesses dois anos de trabalho, quero expressar minha admiração pela sua competência profissional, gratidão pela sua amizade, acolhimento e principalmente pela forma humana que conduziu minha orientação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas (PGMP) por todo conhecimento compartilhado.

Às colegas de Mestrado Kelli Zortéa, Jéssica Moreira, Vanessa Mello e Maria Wlly pela paciência e ensinamentos compartilhados.

Aos colegas do laboratório, em especial à Rosimara e Rosimeire Bispo, pela contribuição nas atividades de campo e laboratório, pelos bons momentos de risadas e confraternização.

À minha mãe Natanagilda Castrillon, que esteve sempre ao meu lado me incentivando e apoiando.

À meu irmão Douglas Jr. por toda ajuda e apoio.

Aos meus primos, tios e avós, pelas orações e o constante incentivo na minha caminhada.

À família Trindade Campos por me receber em sua casa em Alta Floresta, pela amizade e cumplicidade oferecida.

Aos amigos Valci Barbosa, Thaiany Gomes, Paulo Henrique, Fabiane Santos, Thaynara Albanezi, Shinarley Azevedo, Jennyfer Obollares, Fabio Lopes e Wesley Thereza, que mesmo distante, sempre se fazem presente.

## BIOGRAFIA

Rafaela Grazielle Castrillon, filha de Douglas A. C. Castrillon e Natanagilda C. A. Castrillon, nascida em 04/03/1989, natural de Rosário Oeste - MT, se mudou em 1989 para Cáceres - MT. Cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Esperidião Marques e o ensino médio na Escola Agrotécnica Federal de Cáceres, hoje Instituto Federal de Mato Grosso - IFMT. Em agosto de 2007 ingressou na Faculdade de Engenharia de Alimentos pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), *Campus* Barra do Bugres. Em janeiro de 2013 transferiu a faculdade para o Centro Universitário de Várzea Grande (UNIVAG). Diplomou-se em dezembro de 2013. Iniciou atividade profissional em outubro de 2013, atuando como supervisora de qualidade e responsável técnica da Única Água Mineral Natural. Ingressando no mestrado de Genética e Melhoramento de Plantas da UNEMAT em fevereiro de 2016, sob a orientação do Prof. Dr. Sergio Alessandro Machado Souza. Durante o mestrado recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), desenvolvendo pesquisa voltada à biotecnologia e recursos genéticos vegetais, visando estudos reprodutivos em *Cucurbita spp.*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Centro de origem, domesticação e aspectos botânicos do gênero Cucurbita..	3
2.2. Recursos genéticos .....	4
2.3. O grão de pólen.....	5
2.4. Caracterização palinológica .....	6
2.5. Viabilidade polínica .....	7
2.6. Germinação in vitro.....	9
2.7. Efeito da temperatura no grão de pólen .....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Material de estudo .....	11
3.2. Análise dos produtos meióticos .....	11
3.3. Estimativa da viabilidade polínica .....	12
3.4. Determinação do meio de cultura para germinação dos grãos de pólen .....	13
3.5. Germinação in vitro.....	13
3.6. Morfologia polínica.....	15
4. RESULTADOS .....	18
4.1. Índice meiótico.....	18
4.2. Viabilidade Polínica .....	20
4.3. Germinação do tubo polínico .....	22
4.4. Morfologia do pólen .....	28
CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## RESUMO

CASTRILLON, Rafaela Grazielle, M.Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, Janeiro de 2018. **Estudos reprodutivos em *Cucurbita spp*: comportamento pós - meiótico, viabilidade polínica e efeito da temperatura no crescimento do tubo polínico.** Orientador: Sergio Alessandro Machado Souza. Co-orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi.

A escassez de informação sobre os aspectos reprodutivos de *Cucurbita*, referente aos estudos e efeito da temperatura sobre os atributos reprodutivos, levaram-nos a desenvolver o presente estudo com o objetivo de verificar a regularidade no comportamento pós - meiótico, viabilidade polínica, efeito da temperatura sobre a germinação e morfologia do grão de pólen em espécies de *Cucurbita*. Os genótipos utilizados são oriundos da Coleção Ativa de Germoplasma de *Cucurbita* da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) - *Campus* Alta Floresta. O estudo foi realizado com um genótipo de *Cucurbita máxima* e 10 genótipos de *Cucurbita moschata*. O índice meiótico (IM) foi desenvolvido com o corante Carmim acético 1%, para identificação dos produtos pós-meióticos. A viabilidade polínica foi realizada com base na coloração tripla de Alexander, onde os grãos de pólen foram classificados baseados na coloração como viáveis (cor lilás) e inviáveis (cor verde). A germinação *in vitro* dos grãos de pólen foi desenvolvida com meio de cultura a base de sacarose e ágar, testado anteriormente e classificado como melhor meio de cultura para essa análise. A morfologia do grão de pólen foi realizada com a utilização de hidróxido de sódio 10% e posteriormente houve a caracterização da estrutura polínica. Os resultados obtidos no índice meiótico foram regulares e houve associação entre diâmetro e comprimento do botão floral com as fases pós-meióticas. Na viabilidade via teste colorimétrico, ocorreu alta viabilidade polínica. A germinação *in vitro* apresentou elevada frequência de polens férteis. Também foi possível estabelecer a temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura ótima de germinação das espécies analisadas. A morfologia do grão de pólen evidenciou estrutura apolar, porado, tamanho gigante e em sua maioria com formato oblato-esferoidal, não apresentando variações quanto ao tipo de abertura e ornamentação da exina.

Houve concordância entre os dados obtidos nas análises e as informações poderão servir de base para novos estudos.

Palavras - chave: pólen, morfologia polínica, abóbora.

## ABSTRACT

CASTRILLON, Rafaela Grazielle, M.Sc., Universidade do Estado de Mato Grosso, december de 2017. **Reproductive studies in *Cucurbita spp*: meiotic post behavior, pollen viability and temperature effect on pollen tube growth.** Adviser: Sergio Alessandro Machado Souza. Co-adviser: Ana Aparecida Bandini Rossi.

The scarcity of information on the reproductive aspects of *Cucurbita*, concerning the studies and the effect of temperature on the reproductive attributes, led us to develop the present study with the objective of verifying the regularity in the postmeiotic behavior, pollen viability, temperature effect on the germination and morphology of the pollen grain in *Cucurbita* species. The genotypes used are from the *Cucurbita* Germplasm Collection of the Mato Grosso State University (UNEMAT) - Campus Alta Floresta. The case study was carried out with a genotype of *Cucurbita maximus* and 10 genotypes of *Cucurbita moschata*. The meiotic index (IM) was developed with 1% acetic Carmine dye for identification of the post-meiotic products. The pollen viability was performed based on the Alexander triple coloration, where the pollen grains were classified based on coloration as viable (lilac color) and infeasible (green color). The in vitro germination of the pollen grains was developed in a culture medium with a sucrose and agar base, previously tested and classified as the best culture medium for this analysis. The pollen grain morphology was carried out using 10% sodium hydroxide and the characterization of the pollen structure was carried out posteriorly. The results obtained in the meiotic index were regular and there was an association between diameter and length of the floral bud with the post-meiotic phases. In viability through colorimetric test, high pollen viability occurred. In vitro germination showed a high frequency of fertile pollen. It was also possible to establish the minimum temperature, maximum temperature and optimum germination temperature of the analyzed species. The morphology of the pollen grain showed apolar structure, porous, giant size and mostly with oblatospheroidal shape, showing no variations as to the type of opening and ornamentation of exina. There was agreement between the data obtained in the analyzes and the information could serve as a basis for further studies.

Key words: pollen, pollen morphology, pumpkin.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as hortaliças, as plantas da família Cucurbitaceae compreendem cerca de 118 gêneros e 825 espécies, com uma distribuição predominantemente tropical. Aproximadamente 30 destas espécies são utilizadas com fins econômicos, destacando-se as abóboras, as melancias, os melões e os pepinos (Barbieri et al., 2006), que ocupam uma parcela significativa do agronegócio brasileiro, estimado em R\$ 300 milhões anuais (Ferreira e Diniz, 2007).

Assim como ocorre para outras espécies de importância econômica, a implementação de atividades de coleta, caracterização, avaliação desses materiais e monitoramento de fatores intrínsecos ao ambiente, será possível a manutenção da variabilidade genética do gênero *Cucurbita*, o qual corresponde às abóboras e a disponibilização dessa variabilidade para programas de melhoramento de abóbora.

O conhecimento da fertilidade das espécies envolvidas num programa de melhoramento é importante para que o melhorista tenha chance de ser bem-sucedido nos cruzamentos a serem realizados. Segundo Defani-Scoarize et al. (1995), o sucesso da hibridação, tanto intra quanto interespecífica, em termos genéticos, também é determinada por uma meiose regular, para que resulte na formação de gametas viáveis, resultando sucesso nos programas de melhoramento.

Além do desenvolvimento de novas cultivares através da hibridação interespecífica, um novo desafio para o melhoramento é a atual preocupação com o aquecimento global e a obtenção e identificação de cultivares tolerantes a altas temperaturas. O quinto relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2013), com base na revisão de milhares de pesquisas realizadas nos últimos cinco anos, mostra que a temperatura do planeta poderá aumentar até 4,8°C neste século, o que deve gerar grande impacto nos ecossistemas de todo o planeta.

Pequenos aumentos na temperatura podem interferir na viabilidade polínica, na capacidade germinativa e nas taxas de crescimento do tubo

polínico (Hedhly et al., 2008). Os estudos reprodutivos em abóboras, ainda são incipientes, dessa forma, ampliar essas análises pode ser de fundamental importância para ampliar as pesquisas de melhoramento nessa cultura.

Diferentes ferramentas estão disponíveis para avaliar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento reprodutivo das plantas, e incluem a avaliação do estigma, receptividade do óvulo e o comportamento meiótico, bem como a germinação do pólen e o comportamento do tubo polínico e sua influência sobre a subsequente frutificação (Hedhly et al., 2008).

A escassez de informação sobre os aspectos reprodutivos de *Cucurbita* tanto referente a estudos básicos, quanto ao efeito da temperatura sobre os atributos reprodutivos, indica a necessidade de estudos relacionados a esses eventos, principalmente na região conhecida como Amazônia matogrossense, que está localizada em uma área denominada de arco do desmatamento, susceptível às intensas ações antrópicas da fronteira agrícola, em especial queimadas e a conversão mecanizada de floresta e cerrado em pastagens e lavouras. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo, verificar a regularidade no comportamento pós - meiótico, viabilidade polínica, efeito da temperatura sobre a germinação e morfologia do grão de pólen em espécies de *Cucurbita*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Centro de origem, domesticação e aspectos botânicos do gênero *Cucurbita*

O gênero *Cucurbita*, que inclui as abóboras (*C. moschata*), as morangas (*C. maxima*) e as abobrinhas (*C. pepo*) é nativo das Américas (Whitaker e Robinson, 1986) e fazia parte da alimentação da civilização Olmeca, depois incorporadas pelas civilizações Asteca, Inca e Maia. Registros arqueológicos associam essas espécies ao homem há cerca de 10.000 anos (Ferreira, 2007) e sugerem que as plantas do gênero *Cucurbita* foram uma das primeiras a serem domesticadas. O valor nutritivo e a palatibilidade das sementes foram, provavelmente, a principal atração para os primeiros coletores e, mais tarde, para a domesticação (Nee, 1990).

As abóboras são classificadas na divisão Magnoliopyta, classe Magnoliopsida (Dicotiledôneas), subclasse Dilleniidae, ordem Violales, família Cucurbitaceae pertencentes ao gênero *Cucurbita* (Whitaker e Robinson, 1986). As espécies mais conhecidas do gênero *Cucurbita* são: *Cucurbita moschata*, que engloba as abóboras conhecidas popularmente como “de pescoço”; *Cucurbita pepo*, formada pelas abóboras arredondadas, abobrinha e mogangos, e *Cucurbita maxima*, as morangas (Pereira, 1999).

As espécies mais cultivadas do gênero *Cucurbita* (*C. maxima*, *C. moschata* e *C. pepo*) são monóicas de fecundação predominantemente cruzada, todas com 20 pares de cromossomos (Whitaker e Robinson, 1986). O alto número de cromossomos indica que o gênero pode ser de origem poliplóide, havendo evidências para origem alotetraplóide (Weeden, 1984). Apesar da indicação de poliploidia, a espécie comporta-se como diplóide, o que também já está registrado em outras espécies alopólíides (Singh, 1993).

As flores femininas são grandes, solitárias, axilares, opostas às gavinhas e com cálice estrelado, corola campanulada, gamopétala, a cor variando de amarelo a amarelo-alaranjado. O ovário é ínfero, os estigmas são grandes com cerca de dois cm, com três lóbulos. As flores masculinas

possuem pedicelos delgados e surgem primeiro e em maior número que as pistiladas (Whitaker e Robinson, 1986).

O fruto é uma baga indeiscente, com polpa que pode variar de coloração branca, amarela a laranja-escuro possuindo uma média de 100 a 300 sementes (Whitaker e Robinson, 1986). A existência de variação no formato e no tamanho dos frutos também é uma característica do gênero *Cucurbita*.

## 2.2 Recursos genéticos

No que se refere à conservação da base genética, a importância da biodiversidade para a segurança e para a dinâmica do sistema agroalimentar é evidente, já que os recursos genéticos são a base da atividade agrícola (Pessanha, 2005).

O Brasil possui a maior diversidade de plantas nativas e plantas cultivadas no mundo. Este patrimônio genético constitui a base alimentar e a fonte de matéria-prima para inúmeras atividades de populações locais e se constitui também elemento organizador de contextos culturais específicos (Oliveira et al., 2006). Dentre tantos, o Brasil destaca-se como detentor de estimada variabilidade genética da cultura da abóbora, porém existe alta probabilidade de perda desses genes devido a vários fatores (QUEIRÓZ, 1993).

Segundo Kokopelli (2011), a diversidade genética dessa espécie é considerável quanto à forma de seus frutos e de suas sementes, aos ciclos de crescimento, à resistência às doenças virais e à capacidade de conservação. A variabilidade disponível é de extrema importância para melhorar os materiais já domesticados ou promover a inserção daqueles de qualidade superior (Rubenstein et al., 2006).

Os recursos genéticos podem ser conservados *ex situ*, em bancos de germoplasma mantidos por instituições de pesquisa, ou *in situ*, em unidades de conservação. A conservação on farm, que consiste na conservação de recursos genéticos realizada pelos agricultores, permite a dinâmica de

interação entre planta, homem e meio, propiciando a manutenção e enriquecimento da diversidade genética e cultural, e a manutenção de processos ecológicos (Eyzaguirre e Iwanaga, 1995).

A segurança alimentar, no contexto de controle e acesso à base genética, interage em alguns elementos dado as preocupações ambientais, pois requer a implementação de políticas voltadas ao conhecimento, à conservação e ao controle público do acesso à biodiversidade (Pessanha, 2005).

### **2.3 O grão de pólen**

O grão de pólen é um corpúsculo que abriga o gametófito masculino tanto de angiospermas quanto das gimnospermas (Moore e Webb, 1978), constituindo-se em um elo entre cada geração e estando, portanto, envolvido com a reprodução e perpetuação das espécies. A reprodução sexual das plantas com flores começa com a entrega do núcleo espermático ao óvulo. Esse processo tem início com a deposição do grão de pólen, seja por insetos, vento ou outros meios, no estigma da planta (Krichevsky et al., 2007).

A formação do grão de pólen ocorre dentro das anteras e compreende dois eventos: a microsporogênese e a microgametogênese (Mascarenhas, 1992; Horner e Palmer, 1995). Durante esses dois processos independentes, a célula-mãe do grão de pólen ou microsporócito presente nos sacos polínicos sofre meiose após a citocinese, dando origem a quatro micrósporos ou aos grãos de pólen jovens (microsporogênese) (Rodrigues et al., 2004). O micrósporo sofre, então, uma divisão mitótica, resultando em dois núcleos, o reprodutivo e o germinativo. Posteriormente, ocorre a segunda divisão mitótica, que envolve, apenas, o núcleo germinativo. Essa divisão dá origem a duas células alongadas e em forma de meia-lua, denominadas células espermáticas (microgametogênese) (Santos e Zanettini, 2002).

De acordo com Mascarenhas (1992) e Horner e Palmer (1995), a literatura relata vários genes que atuam durante a pré-meiose, a meiose e a

pós-meiose, e qualquer anormalidade, durante o processo de formação dos grãos de pólen, pode resultar no surgimento de pólenes anormais ou inviáveis.

Existem dois tipos de grãos de pólen, os binucleados e os trinucleados. Grãos de pólen binucleados contêm uma célula generativa e uma vegetativa, e, nesse caso, a célula generativa se divide durante o crescimento do tubo polínico, dando origem a dois gametas masculinos. O grão de pólen trinucleado é formado quando a divisão da célula generativa ocorre antes do crescimento do tubo polínico (Brewbaker, 1957).

O tubo polínico é um prolongamento celular do grão de pólen formado após a germinação, no estigma da flor. A função do tubo polínico é transmitir os gametas do pólen até o ovário, permitindo que isso ocorra a longas distâncias, vários centímetros em alguns casos (Cresti et al., 1992).

## **2.4 Caracterização palinológica**

De acordo com Erdtman (1972), palinologia é a ciência que retrata a parede celular externa dos grãos de pólen e esporos, referindo à sua ornamentação, tamanho, formato e aberturas. É uma ciência útil não apenas para palinologistas, mas também para sistemáticos e ecologistas (Mullins e Emberlin, 1997).

No desenvolvimento do grão de pólen, pode ocorrer uma fase de dispersão onde o grão de pólen é transportado por centímetros ou quilômetros de distância até alcançar o estigma, podendo durar segundos ou dias, dependendo do ambiente onde a planta se desenvolve e as circunstâncias de polinização (Dafni e Firmage, 2000).

A parede celular do grão de pólen é importante no auxílio do cumprimento de funções intrínsecas a essa estrutura (Klein, 2007). Designada de esporoderme, consiste de dois estratos principais: uma camada mais interna e leve, a intina, e outra camada mais densa, a exina (Erdtman, 1972). A exina compreende duas camadas: a ectexina – camada externa geralmente esculpura de forma específica – e a endexina – camada interna não esculpura (Mariath et al., 2006).

As características mais dessemelhantes do grão de pólen são o tamanho dos grãos maduros, número de poros e a escultura da exina (Erdtman, 1972). O padrão da exina é determinado pelo esporófito, enquanto o tamanho do grão de pólen é determinado por ambos genótipos esporofítico e gametofítico (Nepi et al., 1995; Kalinowski et al., 2005).

A constituição da cobertura do pólen não é universal, fazendo dele um caráter taxonômico importante, que desempenha relevante papel nas interações pólen-pistilo (Dickinson et al., 2000).

Segundo Erdtman (1972) a família Cucurbitaceae é apontada como euripolínica. Possuindo grãos de pólen colpados, colporados, rugosos, porados, ou forados, variando na forma de oblato a prolato e no tamanho (comprimento do eixo maior) de 18  $\mu\text{m}$  (*Sicydium tamnifolium*) a 180  $\mu\text{m}$  (*Cucurbita*). Geralmente a exina é mais espessa que a intina, reticulada com muro simplibaculado.

## **2.5 Viabilidade polínica**

A germinação e viabilidade do grão de pólen têm recebido considerável atenção devido à sua aplicação no melhoramento de plantas, na conservação e no entendimento da resposta fisiológica durante a fertilização (Khan e Perveen, 2006). Os programas de melhoramento genético vegetal estão fundamentados na obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no germoplasma de determinada espécie, e dentre os fatores responsáveis pelo sucesso desses programas, destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos cuja eficácia depende, diretamente, da viabilidade do pólen (Techio et al., 2006).

A capacidade de germinação do pólen pode interferir na taxa de frutificação (Mondal e Ghanta, 2012), visto que qualquer falha do grão de pólen para germinar e, posteriormente, para fertilizar um óvulo significa um resultado mal sucedido de um evento de polinização (Dafni, 1992). Assim, a viabilidade polínica é, geralmente, considerada como indicativo da capacidade do grão de

pólen de realizar sua função de liberar as células espermáticas no saco embrionário, permitindo que ocorra a fertilização (Shivanna et al., 1991)

Considerando-se a função do grão de pólen no ciclo de vida de uma planta, uma maneira de testar a viabilidade polínica seria realizar a polinização e, posteriormente, analisar a frutificação. No entanto, devido ao tempo que essa atividade leva, outros métodos são, frequentemente, utilizados (Karakaya, 2011). Existe uma grande variedade de técnicas que podem ser usadas para a avaliação da viabilidade do grão de pólen (Oliveira et al., 2001). Os métodos diretos incluem a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro*, e os indiretos são baseados em parâmetros citológicos, como a reação a corantes e fluorocromos (Shivanna e Johri, 1985; Dafni, 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992, Kears e Inouye, 1993).

Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos, que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro. Dentre esses testes, destacam-se os testes com lugol, carmim acético e a solução tripla de Alexander (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

As substâncias que compõem a solução tripla de Alexander reagem de maneira diferente para cada estrutura do grão de pólen. O verde de malaquita interage com a celulose da parede celular, enquanto a fucsina ácida reage com o protoplasma, resultando a coloração verde para pólen inviável e lilás para grão de pólen viável (Alexander, 1969).

Entretanto, nesse método, a viabilidade pode ser superestimada, pois, algumas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ser corados, devido à presença suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias (Rodriguez-Riano e Dafni, 2000).

Apesar dos testes de coloração ser procedimentos simples, eles não fornecem informações sobre a capacidade germinativa do pólen, o que pode ser avaliado através de testes de germinação *in vitro* (Techio et al., 2006). Esse tipo de teste é considerado um dos melhores como indicativo da viabilidade (Shivanna et al., 1991) e consiste em fazer germinar uma amostra de pólen em um meio de cultivo e observar, ao microscópio, a porcentagem de grãos que originam tubos polínicos (Stanley e Linskens, 1974).

Os testes de germinação são considerados métodos seguros, pois partem do pressuposto de que o grão de pólen é capaz de germinar e produzir um tubo polínico *in vitro* e fertilizar o óvulo (Dafni, 1992).

## **2.6 Germinação in vitro**

O teste de germinação *in vitro* tem, por princípio, a reprodução das condições naturais do estigma e estilete, nas quais o pólen germina, visto que, em condições naturais, o estilete supre o grão de pólen com água, açúcares e aminoácidos, promovendo a germinação do tubo polínico (Kears e Inouye 1993).

Os métodos de germinação *in vitro* são úteis em estudos sobre a fisiologia, bioquímica da germinação dos grãos de pólen, programas de melhoramento e armazenamento do pólen (Mercado et al., 1994). No entanto, a taxa de germinação do pólen *in vitro* depende da determinação de um meio ótimo, que deve ser considerado como critério para viabilidade (Heslop- Harrison et al., 1987).

Existe uma correlação entre a citologia do pólen e a perda da sua viabilidade (Brewbaker, 1957). Os grãos de pólen trinucleados perdem a viabilidade rapidamente e, dificilmente, germinam em meio artificial, ao contrário dos grãos de pólen binucleados.

Alguns fatores podem afetar a manutenção da capacidade germinativa do grão de pólen, como a umidade relativa, a temperatura ambiente (King, 1961; Gill et al., 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992), o vigor e o estágio fisiológico da planta e a idade da flor (Johri e Vasil, 1961; Shivanna e Johri, 1989). Em muitas espécies, baixas temperaturas e baixa umidade são favoráveis para a longevidade do pólen (Adhikari e Campbell, 1998).

## **2.7 Efeito da temperatura no grão de pólen**

A fase reprodutiva das plantas é altamente sensível tanto ao calor quanto ao frio. Apenas um único dia muito quente ou uma única noite muito fria

podem ser fatais para o sucesso do processo reprodutivo (Zinn et al., 2010). Dados indicam que o estresse da temperatura, sofrido durante o desenvolvimento do gameta, a fase entre a polinização e o desenvolvimento do zigoto e a fase de desenvolvimento do embrião, reduz a frutificação e o número de sementes (Hedhly et al., 2008).

Alguns processos são afetados, negativamente, pelas altas temperaturas como: a meiose; o desenvolvimento do endotécio na antera, resultando na redução da deiscência da antera e liberação do pólen; o número de grãos de pólen retidos no estigma; a germinação do pólen; o crescimento do tubo polínico; a viabilidade do óvulo; o processo de fertilização e pós-fertilização; e o crescimento do endosperma e o do embrião (Kinet e Peet, 1997), sendo alguns estágios mais sensíveis do que outros (Giorno et al., 2013).

O desenvolvimento reprodutivo masculino é altamente organizado e mais sensível a vários estresses ambientais, incluindo altas temperaturas (Endo et al., 2009). Trabalhos abordando o efeito da temperatura sobre a morfologia dos grãos de pólen, deiscências das anteras (Koti et al., 2005), composição química e metabolismo do grão de pólen (Aloni et al., 2001) têm sido realizados. Além disso, testes de viabilidade em plantas expostas a estresse de temperatura podem ser usados para uma triagem de tolerância ao calor, permitindo uma diferenciação entre plantas suscetíveis e tolerantes ao calor (Gaur et al., 2013).

Young et al. (2004) demonstraram a maior suscetibilidade do pólen a altas temperaturas, em relação aos órgãos reprodutivos femininos, ao realizar cruzamentos recíprocos em *Brassica napus*. Os autores observaram que a frutificação foi reduzida em 88% quando as plantas doadoras de pólen foram submetidas a altas temperaturas, enquanto que a redução foi, apenas, de 37% quando as plantas receptoras foram tratadas com altas temperaturas.

Um dos mais suscetíveis estádios fenológicos a altas temperaturas é o estágio de polinização (Hatfield, 2013), visto que, embora diferentes genótipos não respondam de forma igual a esse estresse, trabalhos têm demonstrado que a falta de viabilidade do pólen é o principal fator para a não frutificação (Kafizadeh et al., 2008).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material de estudo

Os 11 genótipos de *Cucurbita moschata* e *máxima* avaliados neste estudo (Tabela 1), foram adquiridos de uma população em um experimento localizado no município de Paranaíta (9°43'20,47" S, 56°31'20,87" O) norte do Estado de Mato Grosso, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2017. Os genótipos utilizados são oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da UNEMAT/Campus Alta Floresta.

As análises foram conduzidas no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus de Alta Floresta.

**Tabela 1** – Descrição dos genótipos conservados na Coleção Ativa de Germoplasma da Unemat/Campus Alta Floresta

Genótipo	Espécie	Nome popular	Município (origem da semente)
Unemat 015	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abobrinha	Alta Floresta
Unemat 016	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora de Mato Grosso	Paranaíta
Unemat 017	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora	Paranaíta
Unemat 018	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Moranginha	Paranaíta
Unemat 020	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora comum	Paranaíta
Unemat 022	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora pescocinho	Paranaíta
Unemat 023	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora paulista	Terra Nova do Norte
Unemat 024	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora pescoço	Terra Nova do Norte
Unemat 025	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora paulistinha	Carlinda
Unemat 026	<i>Cucurbita moschata</i> Duch.	Abóbora menina	Paranaíta
Unemat 027	<i>Cucurbita maxima</i> L.	Moranga	Terra Nova do Norte

#### 3.2 Análise dos produtos pós - meióticos

Nesta análise, botões florais em diferentes fases de desenvolvimento, foram coletados em *bulk* de 40 plantas de cada genótipo descrito na Tabela 1 e

fixados em etanol 70%. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer à - 10 C° até o preparo. Os botões florais foram dissecados tendo as três anteras retiradas e maceradas em uma gota (30 µl) de carmim acético 1% para liberação das células. Em seguida, as lâminas foram confeccionadas e analisadas em microscopia de campo claro em microscópio óptico (Biotika B50) em uma magnitude de 400x pelo método de varredura. As imagens obtidas em microscópio foram capturadas em câmera digital acoplada ao equipamento, utilizando o programa ISCapture.

Para a análise de relação entre tamanho do botão floral e produto pós-meiótico, o comprimento e diâmetro de cada botão floral foi mensurado com o auxílio de um paquímetro.

Para a estimativa do índice meiótico (IM), quantificou-se o número de produtos pós-meióticos, denominados: mônade, díade, tríade, tétrade e políade. Para o cálculo, utilizou-se a expressão proposta por Love (1951), onde  $IM = [(número\ total\ de\ tétrades\ normais) / (número\ total\ de\ mônades + díades + tríades + tétrades + políades)] \times 100$ .

### **3.3 Estimativa da viabilidade polínica**

Botões florais, em fase de desenvolvimento próximo a antese, foram coletados em *bulk* de 40 plantas de cada genótipo descrito na Tabela 1 e fixados em etanol 70%. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer à - 10 C° até o preparo das lâminas para análise.

Para avaliar a viabilidade polínica, as anteras foram depositadas sobre a lâmina e maceradas com 50 µl da coloração tripla de Alexander para a liberação dos grãos de pólen.

O número de grãos de pólen viáveis (lilás) e não viáveis (verde) foram contabilizados em microscópio óptico (Biotika B50) em uma magnitude de 400x pelo método de varredura. As imagens obtidas em microscópio foram capturadas em câmera digital acoplada ao equipamento, utilizando o programa ISCapture.

Foram analisados 250 grãos de pólen por lâmina, totalizando 2000 grãos de pólen por variedade.

Os dados foram submetidos à análise de intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade, as análises foram executadas com auxílio do programa Genes (Cruz, 2013).

### **3.4 Determinação do meio de cultura para germinação dos grãos de pólen**

Foram testadas três concentrações de sacarose (0, 5, 10%) e quatro de ácido bórico (0; 7,5ppm; 15ppm; 30 ppm), em arranjo fatorial com 12 tratamentos (3x4) e duas repetições. Flores em antese inicial, dos genótipos descritos na Tabela 1, foram coletadas pela manhã, entre 08:00 e 09:00 horas.

No momento do preparo das lâminas, o meio de cultura (100 µl) foi depositado na lâmina com auxílio de uma micropipeta. Os grãos de pólen foram distribuídos sobre lâminas, contendo 100 µl das diferentes concentrações testadas, de forma independente, e as mesmas foram alocadas em uma câmara úmida e mantidas à temperatura ambiente (~25° C).

As avaliações de germinação do pólen foram realizadas através da razão entre o número de polens germinados e o número total de polens observados. Foram analisadas duas lâminas por tratamento, sendo contabilizados 150 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 300 grãos de pólen/genótipo/tratamento. Foram considerados germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico fosse superior ao diâmetro do grão de pólen.

### **3.5 Germinação in vitro**

Os grãos de pólen, dos genótipos descritos da Tabela 1, foram coletados de flores isoladas um dia antes da antese (Figura 1). Para evitar discrepâncias, o pólen de uma única flor, por genótipo, foi utilizado na análise.



**Figura 1** – (A) Botão em pré-antese; (B) Botão isolado um dia antes da antese.

Para a avaliação da germinação, utilizou-se o meio de cultura que apresentou melhor resultado entre os meios testados, sendo sacarose a 5% e ágar a  $0,05\text{gL}^{-1}$ . Com auxílio de uma micropipeta, foram distribuídos  $100\ \mu\text{l}$  do meio sobre uma lâmina, e em seguida os grãos de pólen foram depositados sobre o mesmo, uniformemente. Para a análise, foram preparadas quatro lâminas/genótipo, acondicionadas em câmara úmida e em seguida, depositadas em uma câmara incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com controle de temperatura e fotoperíodo (Eletrolab – EL 202/4) em temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ , de forma independente, por um período de uma hora. Após este período foram contabilizados 250 grãos de pólen em cada lâmina em microscopia óptica (Bioptika B50) com magnitude de  $400\times$  pelo método de varredura, totalizando 1000 grãos de pólen para cada genótipo. Foram considerados germinados os polens que desenvolveram tubo polínico com tamanho igual ou superior ao diâmetro do pólen.

Os dados de germinação *in vitro*, em resposta à temperatura, foram submetidos à análise de regressão. 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, as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SigmaPlot 12.0.

As temperaturas cardinais, mínima ( $T_{\text{mínima}}$ ), ótima ( $T_{\text{ótima}}$ ) e máxima ( $T_{\text{máxima}}$ ) foram estimadas de acordo com o modelo de regressão. O modelo quadrático foi o que mais se ajustou aos dados, onde foi transformado em equação de segundo grau, sendo obtidas duas raízes, a de menor valor indicou a temperatura mínima e a de maior valor, a temperatura máxima de germinação. A temperatura ótima foi determinada através da estimativa do vértice da parábola, o qual indica, exatamente, onde a curva deixa de ser côncava e passa a ser convexa.

$$\text{Germinação do grão de pólen} = a + bx + cx^2 = 0$$

$$\text{Temperatura ótima} = \frac{-b}{2c}$$

$$\text{Temperatura máxima} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

$$\text{Temperatura mínima} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

### 3.6 Morfologia polínica

No preparo das amostras para análise, botões florais próximo a antese, foram coletados em *bulk* de 40 plantas de cada genótipo descrito na Tabela 1 e fixados em solução etanol-ácido acético, na proporção 3:1 e mantidos sob refrigeração (4° C), por no mínimo 24 horas. Posteriormente, foram retiradas duas anteras por botão e colocadas em microtubos de 1 ml, contendo 500 µl de ácido acético 100% ficando em repouso por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 3000 rotações por minutos, durante 5 minutos, e o sobrenadante, descartado.

O preparo da amostra dos grãos de pólen ocorreu através da solução aquosa de hidróxido de sódio a 10%, eliminando seu conteúdo celular para observação da parede externa do pólen (exina).

Os grãos de pólen ficaram imersos na solução de hidróxido de sódio, em temperatura ambiente durante 8 minutos. Os tubos com as amostras foram centrifugados novamente e, depois da centrifugação, a mistura acetolítica foi retirada, permanecendo, apenas, os grãos de pólen. Em cada tubo foi acrescentado 1 ml de água destilada mais 2 gotas de álcool etílico, sendo centrifugado novamente e decantado. Posteriormente, foi acrescentado, em cada tubo, 1 ml de água destilada e glicerina na proporção de 3:1, permanecendo por, no mínimo, duas horas.

Para observação dos grãos de pólen, foram confeccionadas lâminas contendo duas gotas da amostra glicerinada. Em seguida, colocou-se uma lamínula sobre a amostra e a lâmina foi observada ao microscópio óptico (Bioptika B50) em uma magnitude de 400x.

As mensurações dos grãos de pólen foram realizadas no mesmo dia da preparação das lâminas, evitando possível dilatação, que pode ocorrer com o passar do tempo (Melhem e Matos, 1972; Salgado-Labouriau, 1973), visto que os grãos de pólen tendem a aumentar o tamanho depois de submetidos ao processo de acetólise (Faegri e Deuse, 1960).

Foram obtidas medidas dos diâmetros polar e equatorial em vista equatorial (posição em que o grão de pólen está perpendicular à vista polar) e do diâmetro equatorial em vista polar (posição em que o grão de pólen está com uma área polar voltada para o observador) dos grãos de pólen, além das medidas das aberturas, da espessura das camadas da exina (sexina e nexina) e do apocolpo (Milward-Azevedo et al., 2010). Foram realizadas 25 medições de cada característica do pólen, aleatoriamente, em diferentes lâminas, sendo mensurados, no mínimo, cinco pólenes por lâmina, em um total de 25 grãos de pólen.

Para classificar os grãos de pólen, de acordo com seu formato, foi utilizada a relação entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E) em vista equatorial descrita por Erdtman (1952) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Classificação dos grãos de pólen com base na razão entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E), segundo Erdtman (1952)

Classes de Pólen	
P/E	Denominação
0,50	Peroblato
0,50 – 0,74	Oblato
0,75 – 0,87	Suboblato
0,88 – 0,99	Oblato-esferoidal
1,00	Esférico
1,01 – 1,14	Prolato-esferoidal
1,15 – 1,33	Subprolato
1,34 – 2,00	Prolato
> 2,00	Perprolato

Subesferoidal

Em relação ao seu tamanho, os grãos de pólen foram classificados de acordo com Erdtman (1945), baseando-se no comprimento do eixo maior, nas seguintes classes: muito pequenos (< 10 µm), pequenos (10-25 µm), médios (25-50 µm), grandes (50-100 µm), muito grandes (100-200 µm) e gigantes (> 200 µm).

A forma das aberturas foi determinada de acordo com a relação entre os dois diâmetros da mesma (Erdtman, 1952). Aberturas dos grãos de pólen são classificadas como poro quando são mais ou menos circulares e cuja relação entre os dois diâmetros for inferior a 2. Por outro lado, aberturas do tipo colpo são aberturas alongadas cuja relação entre os dois diâmetros for superior a 2 e quando a abertura for a fusão das duas formas é classificado como colporo.

Posteriormente às descrições polínicas, as terminologias adotadas foram baseadas no glossário de Barth e Melhem (1988), Barth (1964) e Punt et al. (2007).

Os grãos de pólen foram examinados sob microscopia óptica (Biotika B50), e as imagens capturadas, analisadas e medidas, utilizando-se o Anati Quanti 2® UFV (AGUIAR et al., 2007).

Para os grãos de pólen em vista equatorial das espécies, foram estimados média, desvio padrão da média, coeficiente de variação e intervalo de confiança.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

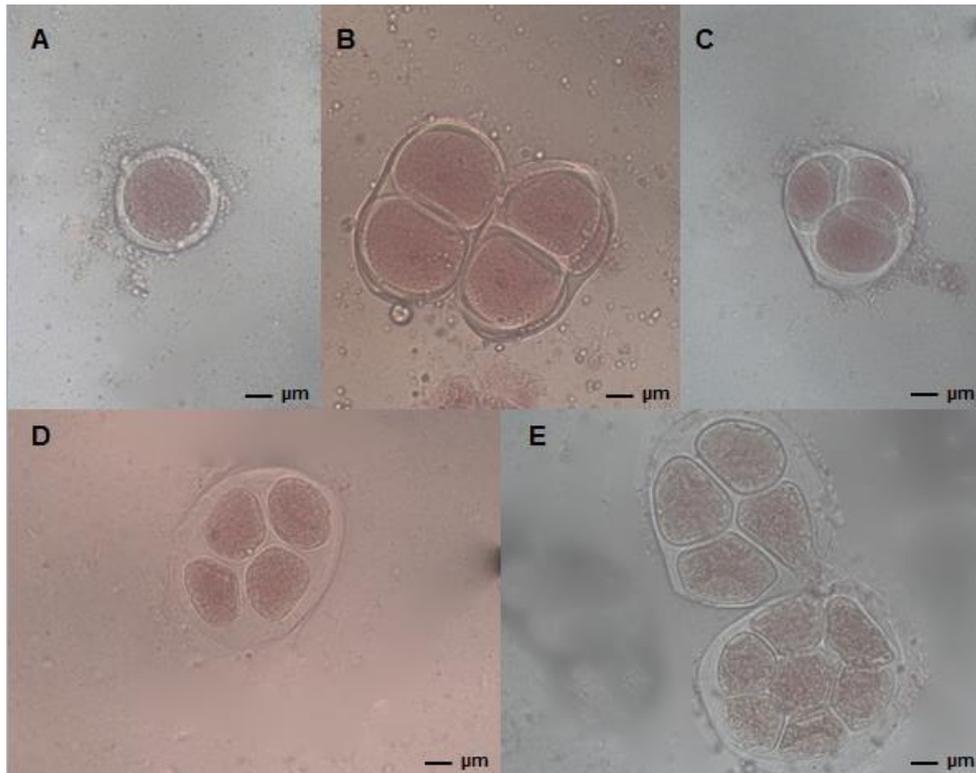
### 4.1. Índice meiótico

Os genótipos estudados apresentaram índice meiótico (IM) superior a 90% (Tabela 3), ainda que tenha ocorrência de produtos pós-meióticos irregulares. Segundo Love (1951), genótipos que apresentam índice meiótico abaixo de 90%, podem acarretar disfunções reprodutivas, restringindo o uso no melhoramento genético devido à instabilidade citogenética.

Os genótipos Unemat 017 e Unemat 023 apresentaram maior valor de IM (99,65%). E o genótipo Unemat 027, menor valor de IM (93%), devido a presença de células mônade, díade, tríade e políade (Figura 2) durante a análise, ocorrendo o mesmo nos genótipos Unemat 015 e Unemat 023. Nos genótipos Unemat 016 e Unemat 017 houve a presença de células díade e tríade. Para os genótipos Unemat 018, Unemat 022 e Unemat 025, presença de células mônade, díade e tríade e nos genótipos 020 e Unemat 024, a ocorrência de tríades.

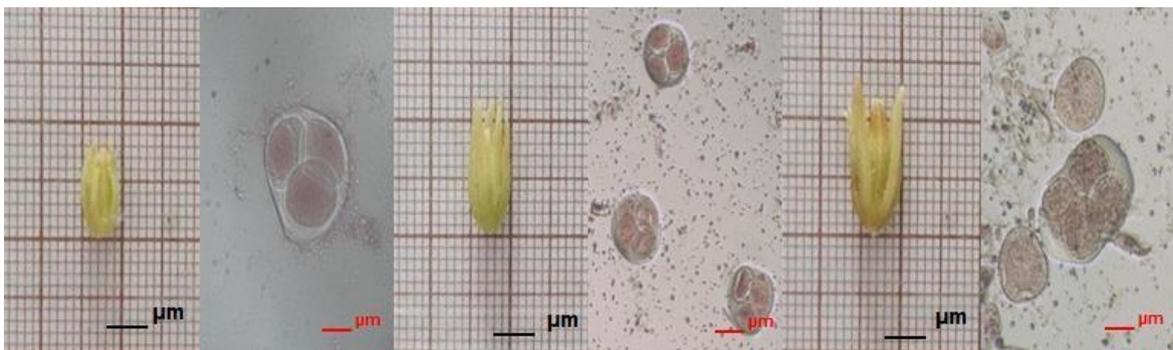
**Tabela 3** – Índice meiótico (%) e média do diâmetro e comprimento do botão floral

<b>Genótipo</b>	<b>Índice Meiótico (%)</b>	<b>Tamanho do Botão (mm) (diâmetro x comprimento)</b>
Unemat 015	99,45	6,04 x 11,83
Unemat 016	99,35	6,25 x 14,25
Unemat 017	99,65	5,87 x 12,21
Unemat 018	97,05	5,11 x 11,80
Unemat 020	98,35	6,51 x 14,99
Unemat 022	98,90	5,73 x 13,74
Unemat 023	99,65	5,93 x 13,72
Unemat 024	98,40	5,46 x 11,98
Unemat 025	99,35	6,46 x 15,70
Unemat 026	99	6,05 x 11,94
Unemat 027	93	4,56 x 11,29



**Figura 2** – Irregularidades meióticas e Índice meiótico em *C. maxima*. A) Mônade; B) Díade; C) Tríade; D) Tétrade; E) Políade. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Com base na média entre diâmetro e comprimento do botão floral dos genótipos de *Cucurbita*, pode-se estabelecer que existe uma associação entre o tamanho do botão floral e as fases meióticas. Foi observado produtos pós-meióticos em botões florais cujo estágio de desenvolvimento variaram, em média, de 4,56 a 6,51 mm de diâmetro (Figura 3) nas duas espécies avaliadas.



**Figura 3** – Tamanho do botão floral e produtos pós-meióticos em genótipos de *Cucurbita*. Barra preta = 5 mm; Barra Vermelho = 20  $\mu\text{m}$ .

Nascimento Júnior et al. (1990), relatam que a identificação de alterações genéticas entre as populações, dentro de uma espécie em estudo, é um aspecto básico nos programas de melhoramento.

Damasceno Junior et al. (2010) orientam que sejam introduzidos em pesquisas de melhoramento genético, que envolvam cruzamentos, genótipos que previamente tenham sugerido médias altas em índice meiótico.

#### 4.2. Viabilidade Polínica

A viabilidade polínica, com a solução de Alexander, apresentou resultados com alta porcentagem. Apontando médias entre 80,05% à 96,80%, com exceção do genótipo Unemat 020 (Tabela 4). Dois genótipos apresentaram resultados bem distintos, o acesso Unemat 022 apresentou alta porcentagem de viabilidade de pólen (96,80%), enquanto o acesso Unemat 020, destacou-se pela baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis (71,15%). Nepi e Pacini (1993) observaram que em *Cucurbita pepo*, a viabilidade dos grãos de pólen é de aproximadamente 92% no momento em que os botões florais iniciam antese. Já para os genótipos de *C. máxima* e *C. moschata*, avaliados neste estudo, botões florais em antese inicial apresentaram viabilidade polínica de aproximadamente 84% e 88%, respectivamente.

Dentre os genótipos estudados, somente o genótipo Unemat 020, apresentou média baixa, com limite inferior de 61,60% e limite Superior de 78%.

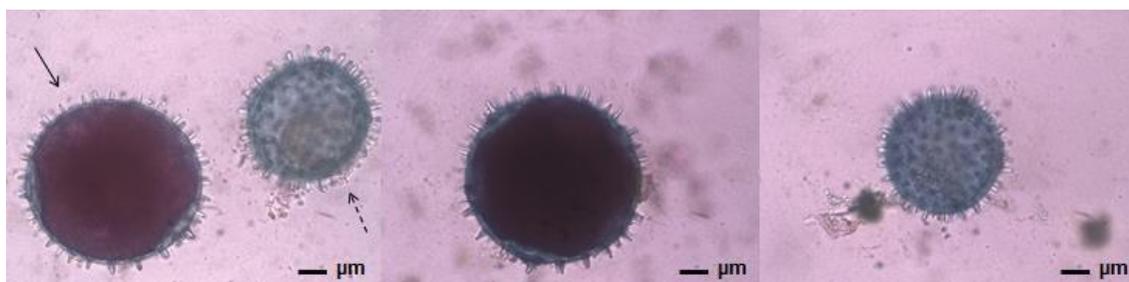
**Tabela 4** – Porcentagem de viabilidade polínica de 11 genótipos de *Cucurbita*

Genótipo	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior (LI)	Limite Superior (LS)	Coefficiente de Variação (CV)
Unemat 015	80,05	18,14	47,30	106,63	22,66
Unemat 016	93,40	3,43	87,19	98,43	3,67
Unemat 017	89,05	3,16	83,33	93,69	3,55
Unemat 018	80,95	3,30	74,98	85,79	1,66
Unemat 020	71,15	5,28	61,60	78,89	7,43
Unemat 022	96,80	1,57	93,95	99,10	1,62
Unemat 023	90,20	7,90	75,93	101,78	8,76
Unemat 024	85,35	10,09	67,12	100,13	11,82
Unemat 025	93,80	6,09	82,79	102,72	6,49

Unemat 026	93,35	3,49	87,04	98,46	3,74
Unemat 027	84,10	1,22	81,88	85,89	1,45

De acordo com Alexander (1980), através dos testes com a solução tripla de Alexander, é possível diferenciar os grãos de pólen inviáveis dos viáveis. O autor ainda diz que, grãos de pólen inviáveis não possuem o núcleo e apenas a celulose contida na parede celular, apresentará coloração.

Os grãos de pólen que possuíam protoplasma e parede celular íntegros, indicado pela coloração lilás do protoplasma e contorno verde da parede celular foram considerados viáveis. Os grãos de pólen inviáveis apresentaram tonalidade verde claro (Figura 4) no interior da célula, indicando ausência de material genético.



**Figura 4** – Grãos de pólen *C. moschata* corados com Solução de Alexander. Grão de pólen viável (seta inteira) e grão de pólen inviável (seta pontilhada). Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Na viabilidade do genótipo Unemat 027, a média encontrada foi de 84,10%, considerado um valor alto. Esses dados corroboram os obtidos por Nicodemo et al. (2007), que realizou estudo de viabilidade polínica com a mesma espécie *Cucurbita maxima* Duch, utilizando a solução tripla de Alexander, obtendo média de 91,2%.

Loguercio e Battistin (2004), afirmam que por meio de estudos sobre a viabilidade polínica, podem-se obter informações da fertilidade das espécies e/ou cultivares, obtendo-se uma visão prévia da infertilidade das plantas estudadas, como também conhecer o potencial reprodutivo de uma população e das adversidades da fertilidade que possam ocorrer.

A alta porcentagem de viabilidade polínica, semelhante à encontrada no presente estudo com utilização da solução de Alexander, também foi observada por Souza (2008) e Martins (2010) ao avaliar espécies de

*Capsicum*, com média geral em 95% e 93,65%, grãos de pólen viáveis, respectivamente. Munhoz et al. (2008), analisaram a viabilidade do grão de pólen de *Carica papaya* L. com a solução de Alexander, resultando 92,6% dos grãos de pólen viáveis.

Techio et al. (2006) ao analisar a viabilidade polínica em acessos de capim – elefante, relataram que o Reativo de Alexander apresenta dados com maior distinção na coloração do grão de pólen. Isso ocorre devido à ação simultânea do verde de malaquita, que interage com a celulose da parede celular, e a fucsina ácida que interage com o protoplasma.

A alta viabilidade polínica encontrada nos genótipos de *Cucurbita* é resultante de uma meiose regular e um índice meiótico estável, como relatado nos resultados da análise anterior. De acordo com Defani-Scoarize et al. (1995), o comportamento meiótico de uma espécie está relacionado ao seu grau de fertilidade e as alterações durante a divisão celular, refletindo na viabilidade dos grãos de pólen.

#### **4.3. Germinação do tubo polínico**

Os dados de germinação *in vitro* dos genótipos de *Cucurbita*, evidenciaram alta frequência de polens férteis. Nos genótipos Unemat 018 e Unemat 022 foram observados o maior percentual de germinabilidade entre os doze genótipos avaliados (Tabela 5), estabelecendo 98,9% de grãos de pólen germinados na temperatura de 35°C.

Ao avaliar diferentes temperaturas na germinação dos grãos de pólen de algodão, Kakani et al. (2005) observaram que houve diferenças significativas entre as cultivares testadas, sendo que a temperatura que mostrou maior percentual de germinação foi a 33 °C. Segundo Scorza e Sherman (1995) a germinação do pólen deve resultar de 50 a 80% de grãos de pólen com tubo polínico devidamente desenvolvido.

**Tabela 5** – Porcentagem de germinação *in vitro* (%) dos 11 genótipos de *Cucurbita* avaliados em diferentes temperaturas

Genótipos	Temperaturas			
	25°C	30°C	35°C	40°C
Unemat 015	81,3	77	83,8	62,8
Unemat 016	72,7	92,3	90,2	61,8
Unemat 017	83,7	77,1	84,5	65,1
Unemat 018	78,3	98,6	98,9	79,2
Unemat 020	83,2	85,7	81,8	65,1
Unemat 022	98,1	98,6	98,9	70,4
Unemat 023	50,3	90,4	96,6	68,4
Unemat 024	84	69,9	69,6	70,4
Unemat 025	70,6	88,2	92,0	80,1
Unemat 026	16,5	45,8	62,8	67,6
Unemat 027	80,5	88,7	91,7	70,5

A menor média de germinação foi encontrada no genótipo Unemat 026 nas temperaturas 25°C e 30°C, respectivamente 16,5% e 45,8%. A taxa de germinabilidade foi crescente, porém foram as mais baixa entre os genótipos avaliados, dentre as temperaturas de 25°C a 35°C (Tabela 5).

Entre os quatro tratamentos, o maior índice de germinação foi à 35°C, para os genótipos Unemat 015, Unemat 017, Unemat 018, Unemat 022, Unemat 023, Unemat 025 e Unemat 027, com médias entre 83,8% a 98,9% de germinação. E o menor índice germinativo foi á 40°C, nos genótipos Unemat 015, Unemat 017, Unemat 016, Unemat 020, Unemat 022 e Unemat 027, com médias entre 61,8% a 70,4% de germinação.

Após submeter os dados de germinação *in vitro*, à análise de regressão, constatou-se que a temperatura mínima variou de 3,20°C a 22,54°C e a temperatura máxima de 33,52°C a 58,04°C (Tabela 6). Já a temperatura ótima entre 29,63°C a 40,27°C. As temperaturas mínimas e máximas permitem identificar o intervalo tolerável em que o grão de pólen possui capacidade de germinação. E a temperatura ótima, onde a taxa de germinação será maior.

**Tabela 6** – Temperatura mínima, máxima e ótima na germinação do grão de pólen de *Cucurbita*

Genótipos	Temperaturas (°C)		
	Mínima	Máxima	Ótima
Unemat 015	7,28	54,46	30,87
Unemat 016	17,75	45,79	31,77
Unemat 017	3,20	58,04	30,65
Unemat 018	16,67	48,47	32,57
Unemat 020	8,21	51,31	29,76
Unemat 022	10,81	48,46	29,63
Unemat 023	21,31	33,52	33,52
Unemat 024	*	*	37,5
Unemat 025	15,79	52,55	34,17
Unemat 026	22,54	58	40,27
Unemat 027	13,79	50,24	32,01

\*Temperatura não identificada.

O genótipo Unemat 026 apresentou a maior temperatura ótima (40,27°C) e o genótipo Unemat 020 apresentou a menor temperatura ótima (29,63°C).

O genótipo Unemat 017 foi o que obteve menor valor de temperatura mínima e maior temperatura máxima, 3,20°C e 58,04°C, respectivamente. Houve uma oscilação da taxa de germinação, como mostra a Figura 6 – D.

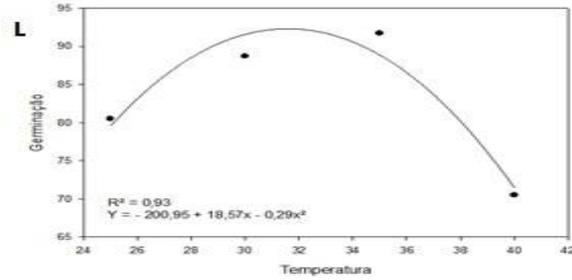
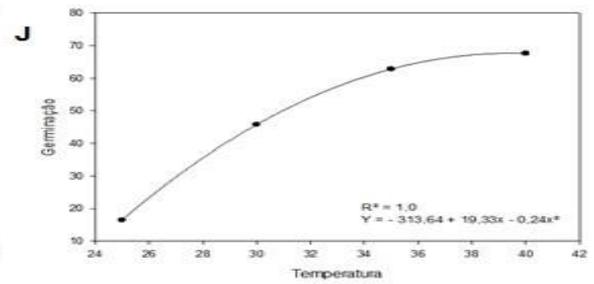
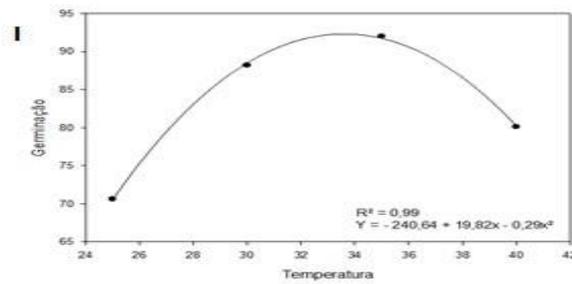
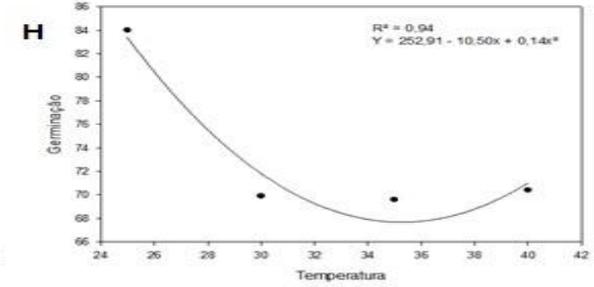
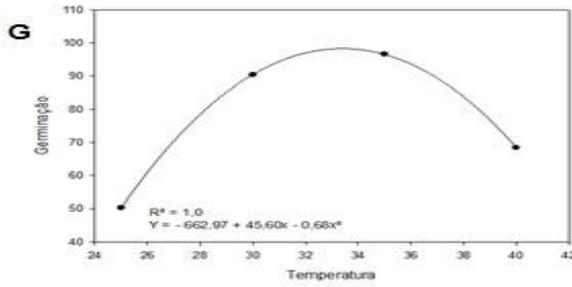
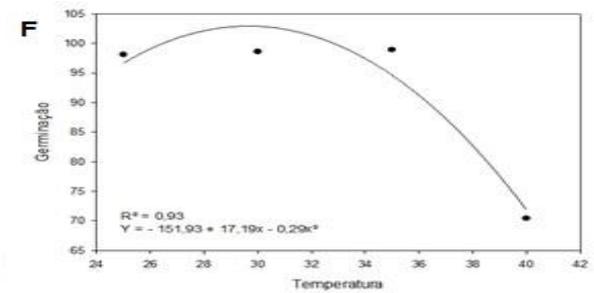
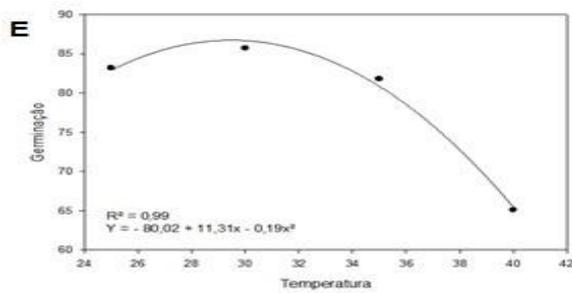
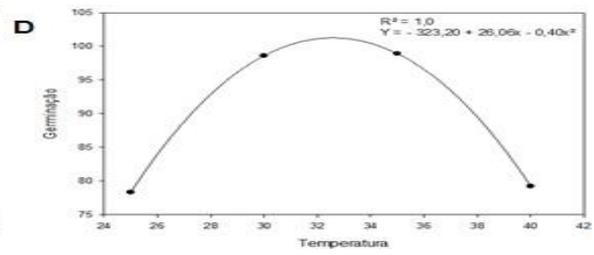
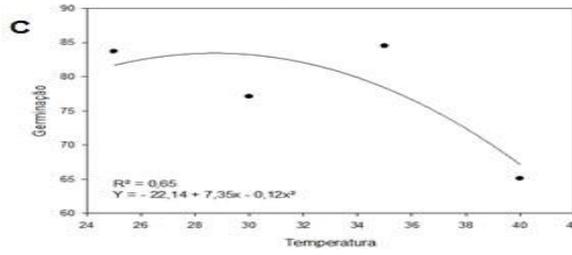
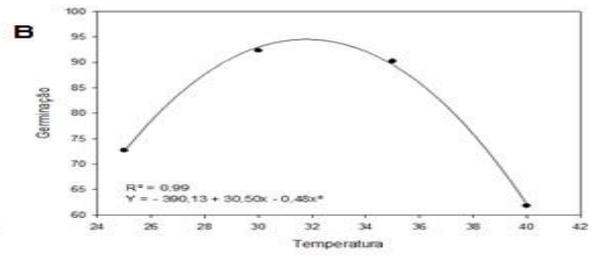
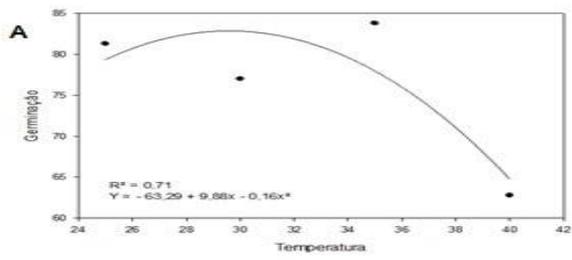
De acordo com Freitas (2013), a exposição de plantas em alta ou baixa temperatura pode ter efeito prejudicial em todas as fases de desenvolvimento da planta. Hedhly et al. (2008) complementa que, a fase reprodutiva é uma das fases mais afetadas pela temperatura, pois seus efeitos comprometem tanto os órgãos masculinos quanto os femininos. Podendo ser essa uma das causas da oscilação germinativa do genótipo Unemat 027.

Alguns autores ao estudar o efeito da temperatura, em outras espécies, tem constatado a redução na germinação nas condições *in vitro* e no crescimento do tubo polínico quando submetidas em temperaturas elevadas, obtendo resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. Beer (1963) ao analisar amendoim comum (*Arachis hypogaea* L.), concluiu que temperaturas superiores a 33 °C reduzem a viabilidade e germinação do grão de pólen. O estresse de temperatura causado a cultura do tomate, torna-os incapazes de produzir pólenes viáveis, reduzindo assim, a frutificação (Sato et al., 2000).

Kumar et al. (2013), avaliaram grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e observaram um declínio na viabilidade polínica, na germinação do pólen, no crescimento do tubo polínico. Sendo assim, temperaturas elevadas pode ser um fator prejudicial na produção de olerícolas.

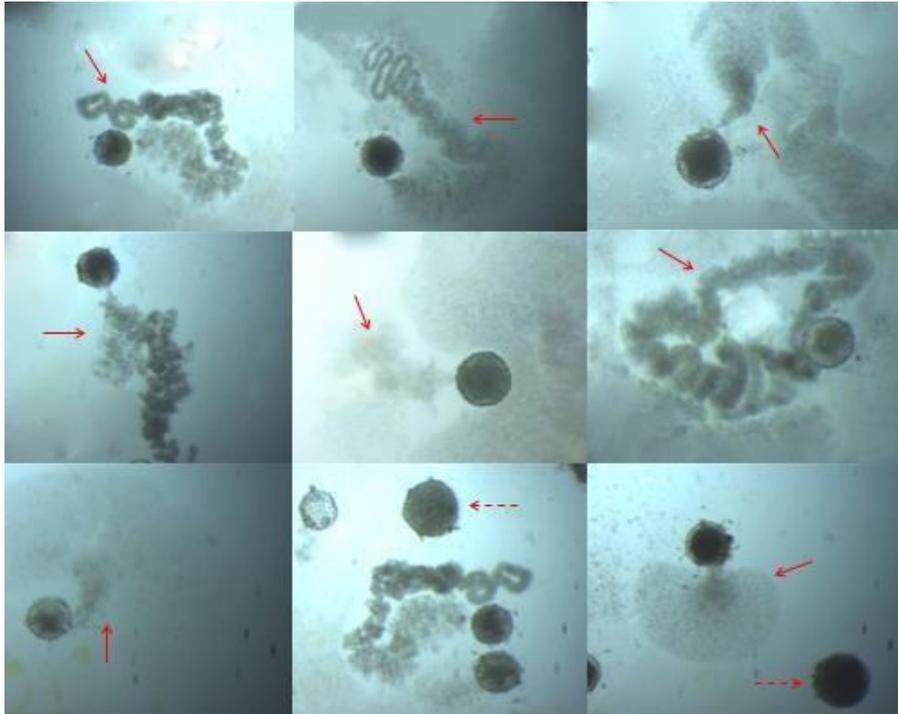
Nos genótipos Unemat 016, Unemat 018, Unemat 023, Unemat 025 e Unemat 027, a germinação iniciou baixa e foi aumentando gradualmente até o valor máximo na temperatura de 35°C, que foi a temperatura considerada ótima para germinação do grão de pólen (Tabela 6), acima desse valor houve nova redução da germinação (Figura 6 – A, D, G, I, L).

Capistrano (2015), ao avaliar amendoim forrageiro, observou que a germinação *in vitro* decresceu após a utilização de temperaturas superiores a 30°C e obteve a menor taxa germinativa aos 40°C.



**Figura 6** – Porcentagem de grãos de pólen germinados *in vitro* em diferentes temperaturas. A – Unemat 015; B – Unemat 016; C – Unemat 017; D – Unemat 018; E – Unemat 020; F – Unemat 022; G – Unemat 023; H – Unemat 024; I – Unemat 025; J – Unemat 026; L – Unemat 027.

A utilização do meio de cultura composto por sacarose (5%) e ágar (0,05gL<sup>-1</sup>) proporcionou boa germinação e crescimento adequado do tubo polínico (Figura 7).



**Figura 7** – Grãos de pólen germinados dos genótipos de *Cucurbita*. Tubo polínico (seta inteira) e grão de pólen inviável (seta pontilhada).

De acordo com Karni e Alone (2002), o desenvolvimento e a germinação do pólen dependem da captação e metabolismo de açúcar pelo mesmo. Com isso, trabalhos têm sido desenvolvidos para verificar como a temperatura interfere nesses processos e, conseqüentemente, nas porcentagens de germinação *in vitro* e frutificação (Aloni et al., 2001). O que torna importante a adequação de estratégias para o desenvolvimento adequado de espécies com importância econômica.

A identificação do pólen (viável/inviável) realizada com base no teste colorimétrico, de viabilidade polínica, foi observada como complementação na resposta dos genótipos aos diferentes regimes de temperatura na germinação *in vitro*.

#### 4.4. Morfologia do pólen

As espécies de *Cucurbita* apresentaram grãos de pólen apolar, com tamanho variando entre grande a gigante e de âmbito circular. Na espécie *Cucurbita maxima*, o genótipo Unemat 027 apresentou tamanho gigante, com forma oblato-esferoidal e com valor médio do diâmetro equatorial e polar, respectivamente, 256,14 $\mu$ m e 292,29  $\mu$ m (Tabela 7). Observou-se que o valor do diâmetro polar não ficou dentro do intervalo de confiança em 95% de significância.

**Tabela 7** – Mensuração do diâmetro equatorial e do eixo polar em vista equatorial dos grãos de pólen dos genótipos de *Cucurbita*

Genótipo	Vista Equatorial						
	Diâmetro Equatorial			Diâmetro Polar			
	x $\pm$ sx	IC (95%)	CV (%)	x $\pm$ sx	IC (95%)	CV (%)	P/E ( $\mu$ m)
Unemat 015	291,41 - 10,59	286,71 - 295,65	3,63	287,42 - 11,03	282,52 - 291,83	3,84	0,98
Unemat 016	261,05 - 28,41	248,43 - 272,41	10,88	253,13 - 31,62	241,09 - 267,78	12,39	0,97
Unemat 017	275,37 - 21,96	265,62 - 284,16	7,67	264,52 - 36,78	248,19 - 279,24	13,90	0,95
Unemat 018	154,51 - 7,33	151,25 - 157,44	4,74	148,50 - 8,39	144,77 - 151,86	5,65	0,95
Unemat 020	311,66 - 82,07	275,21 - 344,49	26,33	273,81 - 94,99	231,63 - 311,81	34,69	0,87
Unemat 022	85,28 - 3,34	83,79 - 86,61	3,91	83,08 - 3,41	81,56 - 84,44	4,11	0,97
Unemat 023	280,14 - 21,60	270,55 - 288,78	7,71	277,97 - 21,73	268,32 - 286,67	7,82	0,98
Unemat 024	277,60 - 32,55	263,14 - 290,62	11,72	273,69 - 33,17	258,97 - 286,96	12,11	0,98
Unemat 025	214,37 - 9,28	210,24 - 218,08	4,33	211,05 - 7,10	207,89 - 213,89	3,36	0,98
Unemat 026	251,08 - 16,82	243,61 - 257,81	6,70	247,51 - 16,95	239,98 - 254,29	6,85	0,98
Unemat 027	256,14 - 21,41	246,63 - 264,71	8,36	252,29 - 20,90	243,01 - 260,65	8,28	0,98

x = média; s = desvio padrão; IC = intervalo de confiança; CV= coeficiente de variação; P/E = eixo polar/eixo equatorial.

Os grãos de pólen da espécie *Cucurbita moschata* mostraram os maiores valores médios dos eixos equatorial e polar, exceto o genótipo Unemat 022.

Segundo Barbosa (2009), o tamanho do grão de pólen difere na quantidade de nutriente presente na célula, fazendo com que polens maiores tenham maior reserva de nutrientes e principalmente amido, que permite durante a germinação, que tubos polínicos cresçam através de estigmas profundos, o que não ocorre em grãos de pólen pequenos. Essa afirmação

pode justificar o alto índice da emissão do tubo polínico, em determinadas temperaturas, na análise de germinação *in vitro*. O tamanho do pólen pode ter influenciado positivamente no resultado.

Os resultados obtidos para os tamanhos e classificações dos grãos de pólen, estão de acordo com o proposto por Erdtman (1952). O formato dos grãos de pólen, obtidos pela razão P/E, variou de oblato – esferoidal a perprolato (Tabela 8). A maioria dos genótipos possui formato oblato – esferoidal, exceto Unemat 020, que apresentou formato suboblato. Nos genótipos Unemat 018 e Unemat 022, os tamanhos do grão de pólen diferiram da maioria com tamanho gigante, possuindo, respectivamente, tamanho muito- grande e grande. Essa diferença constatada entre os genótipos Unemat 018 e Unemat 020, apesar de serem da mesma espécie, pode ser causada por fatores abióticos, intrínseco ao ambiente.

**Tabela 8** – Caracterização morfológica dos genótipos de *Cucurbita* avaliados

<b>Genótipo</b>	<b>Formato</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Âmbito</b>
Unemat 015	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 016	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 017	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 018	Oblato-esferoidal	Muito - grande	Circular
Unemat 020	Suboblato	Gigante	Circular
Unemat 022	Oblato-esferoidal	Grande	Circular
Unemat 023	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 024	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 025	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 026	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular
Unemat 027	Oblato-esferoidal	Gigante	Circular

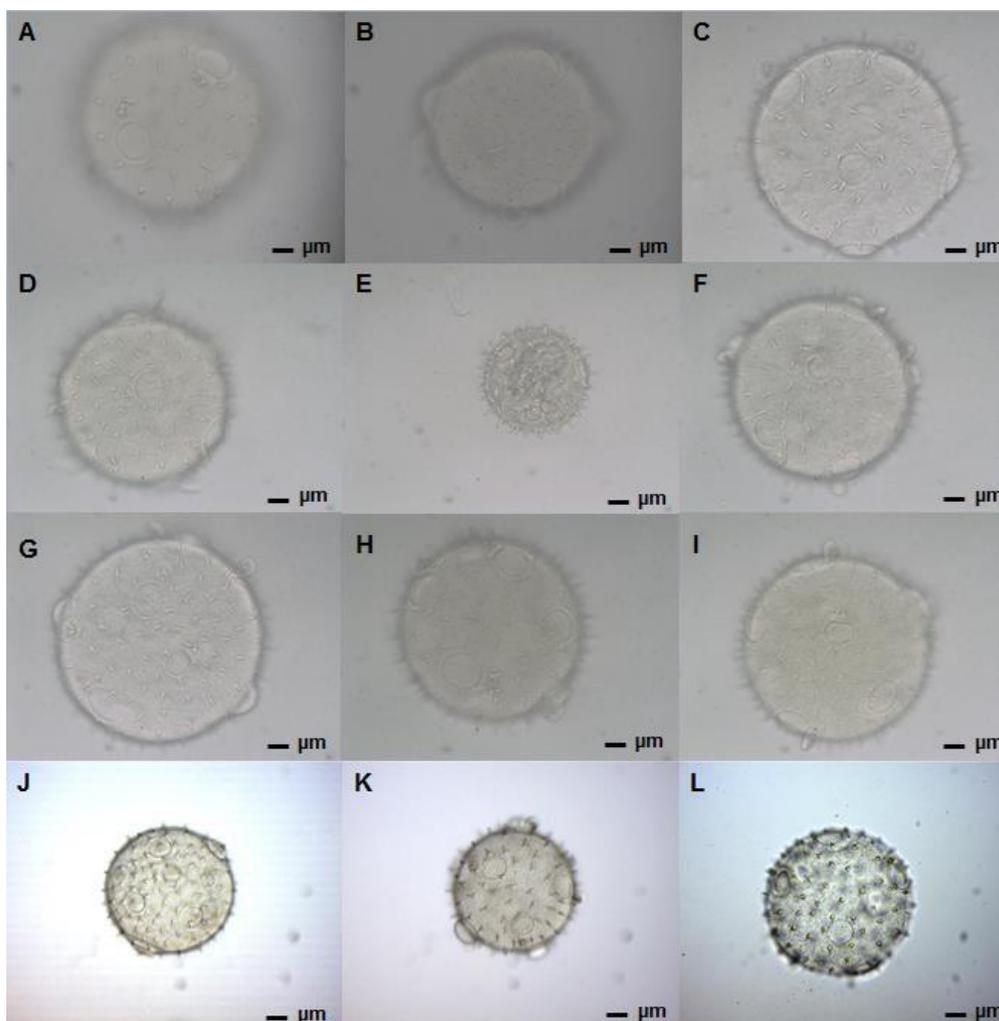
Resultados semelhantes foram obtidos por Barbosa (2009), que ao avaliar linhagens e cultivares da espécie *Cucurbita moschata*, obteve grãos de pólen que variou de oblato – esferoidal a prolato – esferoidal.

Perveen et al. (2008), estudando espécies da família Cucurbitaceae, encontrou grãos de pólen com formato variando de oblato a prolato.

De acordo com Iwanaimi e Yoshio (1988), a análise dos descritores polínicos, em uma caracterização morfológica, serve para distinguir e relacionar espécies, devido às características como formato, número e tipo de aberturas,

posição e ornamentação da exina dentre outras, que são determinadas geneticamente.

Os grãos de pólen foram encontrados de forma isolada, sem aglomeração, em ambas as espécies de *Cucurbita*, apresentaram várias aberturas arredondadas, denominadas poro. Morfologicamente, todos os genótipos são iguais, possuindo grãos de pólen com âmbito circular, pantoporado, com poros operculado e exina com ornamentação espinhosa (Figura 8), distinguindo apenas pelo tamanho e formato.



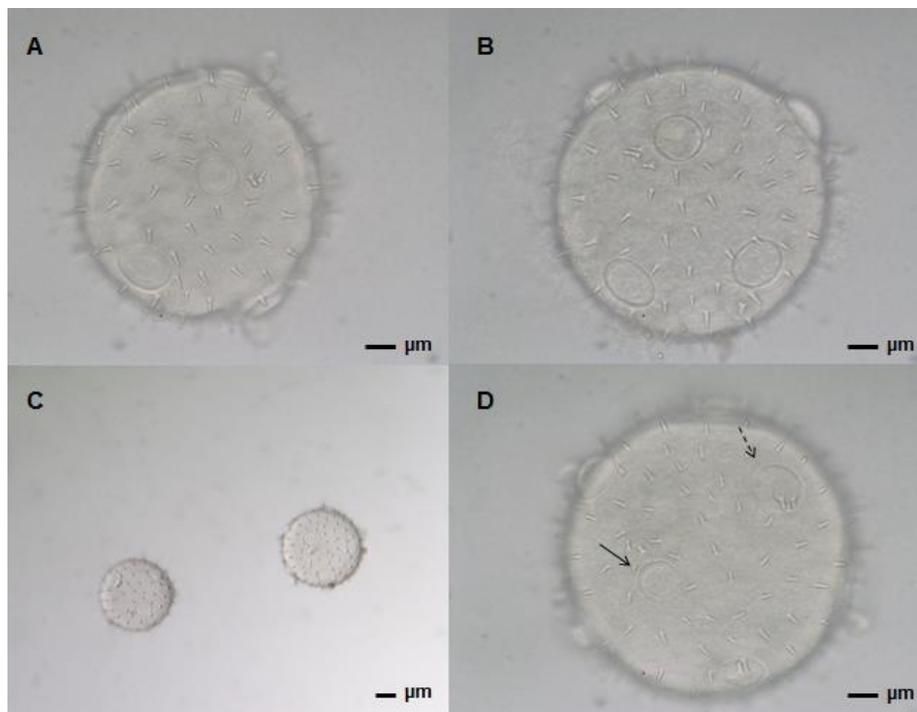
**Figura 8** – Microscopia óptica dos grãos de pólen de *Cucurbita*. A – Unemat 015; B – Unemat 027; C – Unemat 016; D – Unemat 017; E – Unemat 018; F – Unemat 020; G – Unemat 021; H – Unemat 023; I – Unemat 024; J – Unemat 025; K – Unemat 022; L – Unemat 026. Barra: 10 µm.

Observou-se variação na média do diâmetro dos poros dos genótipos avaliados (Tabela 9), porém todos dentro do intervalo de confiança em 95% de

significância. O genótipo Unemat 022 apresentou a menor média e desvio padrão e Unemat 015 apresentou a maior média para o diâmetro do poro. O número de aberturas encontradas nos grãos de pólen variou de 6 a 10 poros, distribuídos por todo grão de pólen, por isso denominado pantoporado (Figura 9).

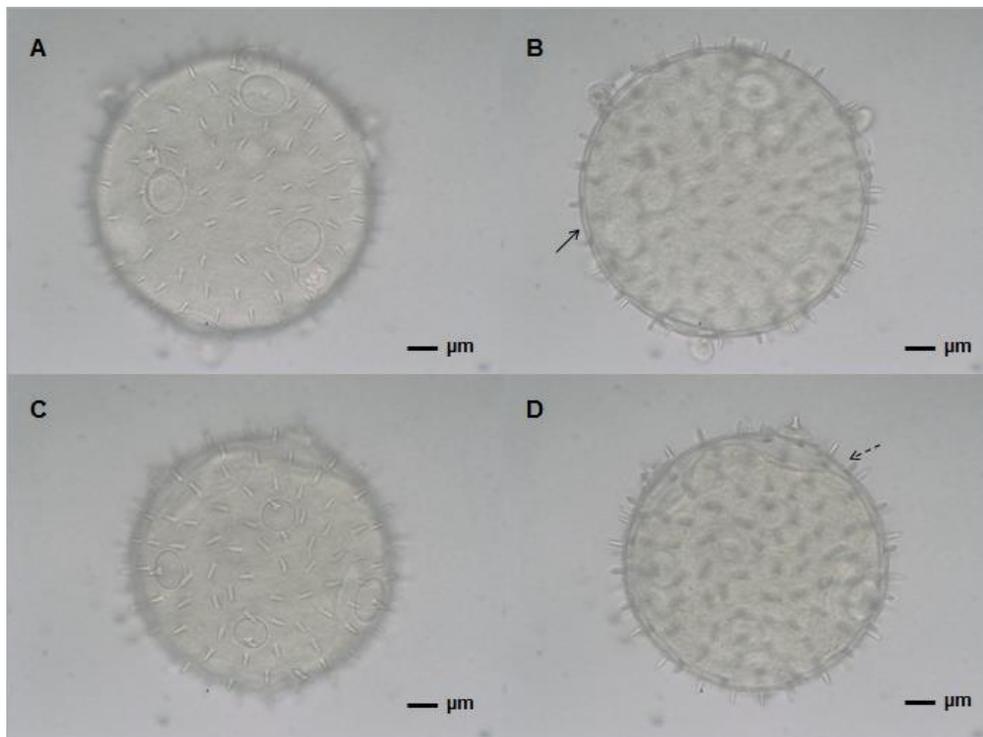
**Tabela 9** – Mensuração do diâmetro do poro encontrado no grão de pólen dos genótipos de *Cucurbita*

Genótipo	Diâmetro do Poro			Exina ( $\mu\text{m}$ )
	$\bar{x} \pm \text{sx}$	IC (95%)	CV (%)	
Unemat 015	57,07 - 4,66	55,17 - 58,77	7,47	5,06
Unemat 016	45,76 - 7,31	42,51 - 48,68	15,97	3,45
Unemat 017	47,96 - 5,33	45,59 - 50,10	11,12	5,68
Unemat 018	24,73 - 3,10	23,35 - 25,98	12,56	4,24
Unemat 020	47,00 - 14,29	40,65 - 52,71	30,41	5,21
Unemat 022	14,22 - 1,34	13,62 - 14,75	9,44	8,26
Unemat 023	41,43 - 5,62	38,94 - 43,68	13,56	1,97
Unemat 024	48,37 - 5,54	45,91 - 50,59	11,46	4,52
Unemat 025	34,03 - 3,20	32,61 - 35,31	9,41	3,60
Unemat 026	45,22 - 6,65	42,27 - 47,89	14,71	3,25
Unemat 027	56,43 - 6,91	53,36 - 59,20	12,25	3,94



**Figura 9** – Morfologia do grão de pólen avaliado de *C. maxima* (Imagem A) e *C. moschata* (Imagem B). A – B: Vista equatorial (Barra: 15  $\mu\text{m}$ ); C: Grão de pólen isolado (Barra: 10  $\mu\text{m}$ ); D: Poro com opérculo íntegro (seta inteira) e poro rompido (seta pontilhada). Barra: 15  $\mu\text{m}$ .

Foi possível observar a exina com ornamentação hegemonicamente espinhosa (Figura 10), variando apenas na espessura (Tabela 9). O genótipo Unemat 023 e Unemat 022 possuíram a menor e maior espessura de exina, respectivamente.



**Figura 10** – Microscopia óptica dos grãos de pólen de *C. moschata*: A – C: exina com ornamentação espinhosa; B: exina fina; D: exina espessa. Barra: 10 µm.

Dajoz et al. (1991) nos esclarece que certas características morfológicas, como o número de poros, acomete suas propriedades fisiológicas, quando expostas a determinadas condições ambientais. Franchi et al. (2002) complementa que o número de poros não está relacionado com o teor de água, porém, os poros normalmente desdobram-se, tornando-se local primacial para perda de água.

Nesse sentido, o número de aberturas pode influenciar no desempenho e vida útil do grão de pólen, quando exposto ao ambiente e em determinadas temperaturas.

## 5. CONCLUSÕES

Os genótipos utilizados apresentaram um índice meiótico regular, indicando iminência em possíveis cruzamentos. O diâmetro e o comprimento do botão floral estabeleceu associação com relação às fases meióticas.

A viabilidade polínica pelo teste colorimétrico foi alta, tornando a solução de Alexander um bom aliado para teste de viabilidade. Portanto, sugere-se a sua utilização para estimar a viabilidade polínica de espécies de *C. maxima* e *C. moschata*, em análises laboratoriais corriqueiras.

A germinação *in vitro* apresentou elevada frequência de polens férteis. Também foi possível estabelecer a temperatura mínima, temperatura máxima e temperatura ótima de germinação das espécies de *Cucurbita*.

Os grãos de pólen estudados não apresentaram variação morfológica quanto ao tipo de abertura e ornamentação da exina. Pesquisas na área de palinologia se fazem necessárias, principalmente no gênero *Cucurbita*.

A partir dos resultados obtidos, foi possível estabelecer continuidade e complementação dos dados. Havendo concordância entre os resultados da caracterização polínica e estudos reprodutivos em *Cucurbita*.

Desta forma, os resultados apresentados neste estudo, poderão auxiliar em novas pesquisas desenvolvidas na região da Amazônia matogrossense em espécies de *C. maxima* e *C. moschata*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, K. N.; CAMPBELL, C. G. In vitro germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. **Euphytica**, 102:87–92, 1998.

ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and non aborted pollen. **Stain Technology**, 44:117-122, 1969.

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, 55:13-18, 1980.

ALONI, B.; PEET, M.; PHARR, M.; KARNI, L. The effect of high temperature and high atmospheric CO<sub>2</sub> on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. **Physiologia Plantarum**, 112:505–512, 2001.

BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G.; NEITZKE, R. S.; GARRASTAZÚ, M. C.; SCHWENGBER, J. E. **Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado - período de 2002 a 2006**. 1.ed. Pelotas, RS – Embrapa Clima Temperado, 2006, 30 p. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 176).

BARBOSA, G. da S. **Desempenho agrônômico, caracterização morfológica e polínica de linhagens de abóbora (*Cucurbita moschata*) com potencial para o lançamento de cultivares**. Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2009, 92p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

BARTH, O. M.; MELHEM, T.S. **Glossário Ilustrado de Palinologia**. Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas, 1988.

BARTH, O. M. **Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional – Glossário Palinológico**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 63: 133-162, 1964.

BEER J.F. Influences of temperature on *Arachis hypogaea* L. with special reference to its pollen viability. Thesis, **State Agricultural University**, Wageningen, The Netherlands, 1963.

BREWBAKER, J. L. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. **J. Hered.** 48:271-77, 1957.

CAPISTRANO, M. C. **Fatores determinantes na fertilidade dos gametas e conservação de pólenes do amendoim forrageiro (*Arachis pintoï*) no Acre**. Rio Branco – AC: Universidade Federal do Acre , 2015, 98p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia). Rio Branco – AC, 2015. 98p.

CAVALCANTE, H. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DORNELLES, A. L. C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of "Lee" mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradise* x *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 86(1):103-114, 2000.

CRESTI, M.; BLACKMORE, S.; VAN WENT, J. L. Atlas of sexual reproduction in flowering plants. **Springer - Verlag**, Berlin. 249 p., 1992.

CRUZ, C. D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 25(3):271- 276, 2013.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 250p., 1992.

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, 222:113-132, 2000.

DAJOZ, I; TILL-BOTTRAUD, I; GOYOUN, P. H. Evolution of pollen morphology. **Science**, 253:66-68, 1991.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; FREITAS-NETO, M.; PEREIRA, M. G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, Firenze, 63(1):229-236, 2010.

DEFANI-SCOARIZE, M. A; PAGLIARINI, M. S.; AGUIAR, C. G. Evolution of meiotic behavior in double-cross maize hybrids and their parentes. **Maydica**, 40(1,2):319-324, 1995.

Dickinson, H.G.; Elleman, C.J.; Doughty, J. Pollen coating chimeric genetics and new functions. **Sexual Plant Reproduction**, 12:302-309, 2000.

ENDO, M.; TSUCHIYA, T.; HAMADA, K.; KAWAMURA, S.; YANO, K.; OHSHIMA, M.; HIGASHITANI, A.; WATANABLE, M.; KAWAGISHI-KOBAYASHI, M. High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. **Plant Cell Physiology**, 50: 1911–1922, 2009.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy. III. *Morina* L. With na addition on pollenmorphological terminology**. Svensk bo. Tidskr. 39p., 1945.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms**. Almqvist e Wiksell, Stockholm, 1952.

ERDTMAN, G. **Pollen morphology and plant taxonomy**. Hafner Publishing Company, New York, 1971.

EYZAGUIRRE, P.; IWANAGA, M. Farmers contribution to maintaining genetic diversity in crops, and its role within the total genetic resources system. In: **Participatory Plant Breeding**. Proceedings of a Workshop on Participatory Plant Breeding. IPGRI, Rome, Italy. 9-18p, 1995.

FAEGRI, K.; DEUSE, P. **Size variation in pollen grains with different treatment**. *Pollen et Spores*, 2(2):293-298, 1960.

FAEGRI, K.; IVERSEN, J. **Textbook of pollen analysis**. Blackwell, Oxford. 2:237p, 1964.

FERREIRA, M. A.; DINIZ, F. **Rede de pesquisa vai incrementar a produção de cucurbitáceas em áreas de agricultura familiar e assentamentos**. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_3/cucurbitaceas/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_3/cucurbitaceas/index.htm). Acesso em: 12, março, 2017.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa - UFV, 3:421, 2007.

FREITAS, L. L. **Efeito da temperatura sobre a germinação in vitro de grãos de pólen em dois genótipos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2013. 58 p. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) - Universidade Estadual do Norte do Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

FRANCHI, G. G.; NEPI, M.; DAFNI, A.; PACINI, E. Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutionary significance. *Plant Systematics and Evolution*, 234:211-227, 2002.

GAUR, P. M.; JUKANTI, A. K.; SAMINENI, S.; CHATURVEDI, S. K.; BASU, P. S.; BABBAR, A.; JAYALAKSHMI, V.; NAYYAR, H.; DEVASIRVATHAM, V.; MALLIKAJUNA, N.; KRISHNAMURTHY, L.; GOWDA, C. L. L. Climate change and heat stress tolerance in Chickpea. In: Tuteja, N.; Gill, S.S. (ed). **Climate change and plant abiotic stress tolerance**. Wiley Blackwell. 837-856p, 2013.

GILL, M. S. N.; MALIK, C.P. Pollen biotechnology storage and viability. In: Malik, C.P. (ed) **Pollen Physiology and Biotechnology**. Today and tomorrow's. New Delhi, India: Printer and Publisher, 1992.

GIORNO, F.; WOLTERS-ARTS, M.; MARIANI, C.; RIEU, I. Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants*, 2:489-506, 2013.

HATFIELD, J.L. Climate change: Challenges for future crop adjustments. In: Tuteja, N.; Gill, S.S. (ed). **Climate change and plant abiotic stress tolerance**. Wiley Blackwell. 1208 p, 2013.

HEDHLY, A.; HORMAZA, J. I.; HERRERO, M. Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science*. 14:30-36, 2008.

HESLOP-HARRISON, J. Pollen germination and pollen-tube growth. **Review of Cytology**, 107:1-78, 1987.

HORNER, H. T.; PALMER, R. G. Mechanisms of genetic male sterility. **Crop Science. Madison**, 35:1527-1535, 1995.

IPCC. **Climate change 2013: the physical science basis. Summary for policymakers.** Disponível em: [http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGI\\_AR5\\_SPM\\_brochure.pdf](http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGI_AR5_SPM_brochure.pdf). Acesso em 30/11/2016.

IWANAMI, Y.S.; YOSHIO, Y. Pollen: Illustrations and scanning of electronmicrographs. **Tokio: Kodans e Springer-Verlag**, 1988.

JOHRI, B. M.; VASIL, J. K. Physiology of pollen. **The Botanical Review**, 27(3):325-381, 1961.

KAFIZADEH, N.; CARAPETIAN, J.; KALANTARI, K. M. Effects of heat on pollen viability and pollen tube growth in pepper. **Research Journal of Biological Sciences**, 3:1159-1162, 2008.

KAKANI, V. G.; REDDY, K. R.; KOTI, S.; WALLACE, T.P.; PRASAD, P. V. V.; REDDY, V.R.; ZHAO, D. Differences *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of cotton cultivars in response to high temperature. **Annals of botany**, v.96, p. 59-67, 2005.

KALINOWSKI, A.; KLIMKO, M.; WOJCIECHOWSKA, B. Pollen morphology and twodimensional patterns of pollen coat and protoplast proteins in *Aegilops kotschyi* x *Secale cereale* amphiploids. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, 47(2):97-110, 2005.

KARAKAYA, D. Effects of inflorescence on pollen viability and morphology of strawberry (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Science and Technology**, 1:43-47, 2011.

KEARS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists.** Niwot: University Press of Colorado, 1993.

KHAN, S. A.; PERVEEN, A. Germination capacity of stored pollen of *abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) and their maintenance. **Pakistan Journal of Botany**, 38:233-236, 2006.

KINET, J. M.; PEET, M. M. Tomato. In: H.C. Wien. (ed) **The physiology of vegetable crops.** Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) International. 207–258, 1997.

KING, J. R. The freeze drying of pollen. **Economic Botany**, 15: 91-98, 1961.

KLEIN, D. E. **Estudo do sistema heteromórfico de auto-incompatibilidade em uma população de *Psychotria nuda* (CHAM. & SCHLECHT.) Wayra (Rubiaceae): morfologia floral; sucesso reprodutivo; aspectos celulares e teciduais; e análise da composição protéica de partes florais.** Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, 2007, 173p. (Tese - Doutorado em Biociências e Biotecnologia).

KOKOPELLI. **Manual de sementes.** Disponível em: [https://issuu.com/sesopi/docs/manual de sementes](https://issuu.com/sesopi/docs/manual_de_sementes). Acesso em: 28, julho, 2017.

KOTI, S., REDDY, K. R.; REDDY, V. R.; KAKANI, V. G.; ZHAO, D. 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, 2005.

KRICHEVSKY, A.; KOZLOVSKY, S. V.; TIAN, G.; CHEN, M.; ZALTSMAN, A.; CITOVSKY, V. How pollen tubes grow. **Developmental Biology**, Kansas, 303: 405–420, 2007.

KUMAR, S.; THAKUR, P.; KAUSHAL, N.; MALIK, J. A.; GAUR, P.; NAYYAR, H. Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59. p.823-843, 2013.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium Cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul- Brasil. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.**, 11(1):192-205, 2004.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, Madson, 43(42): 72-76, 1951.

MARIATH, J. E. A.; DE PRIESTER, W.; SPAINK, H. P.; WANG, M. Flor. In: APEZZATO-DAGLÓRIA B.; CARMELLO-GUERREIRO S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2:329- 373, 2006.

MARTINS, K. C. **Palinologia de *Capsicum* spp.: Caracterização, divergência genética e viabilidade polínica.** Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2010, p. 77. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MASCARENHAS, J. P. Pollen gene expression: Molecular evidence. **Int. Rev. Cytol.** 140:3-18, 1992.

MELHEM, T. S.; MATOS, M. E. R. Variabilidade de forma dos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. Labiatae. **Hoehnea**, 2:1-10, 1972.

MERCADO, J. A.; FERNÁNDEZ-MUFIOZ, R.; QUESADA, M. A. In vitro germination of pepper pollen in liquid medium. **Scientia Horticulturae**, 57:273-281, 1994.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; SOUZA, F.C.; BAUMGRATZ, J,F,A.; GONÇALVES-ESTEVEES, V. Palinotaxomia de *Passiflora* L. subg *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Brasil, **Acta Botânica Brasílica**, 24(1):135-45, 2010.

MONDAL, S.; GHANTA, R. 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, 2012.

MOORE, P. D.; WEBB, J. A. **An illustrated guide to pollen analysis**. New York: A Halsted Press Book, 1:133, 1978.

MULLINS, J.; EMBERLIN, J. Sampling pollens. **J. Aeresol Science**, 28:365- 370, 1997.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; FILHO, P. E. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasil. Bot.**, 31(2):209-214, 2008.

NASCIMENTO JÚNIOR, A.; CARVALHO, F. I. F.; BARBOSA NETO, J. F.; FEDERIZZI, L. C. Agentes mutagênicos e a intensidade de variabilidade genética em caracteres adaptativos na cultura de aveia (*Avena sativa* L.). **Agronomia Sul-rio-grandense**, Porto Alegre, 26(2):199-216, 1990.

NEE, M. The domestication of *Cucurbita* (*Cucurbitaceae*). **Econ Bot**, 44(3):56-68, 1990.

NEPI, M.; CIAMPOLINI, F.; PACINI, E. Development of *Cucurbita pepo* pollen: ultrastructure and histochemistry of the sporoderm. **Canadian Journal of Botany**, 73:1046-1057, 1995.

NEPI, M.; PACINI, E. First observations on nectaries and nectar of *Cucurbita pepo*. **Giornale Botanico Italiano**, Firenze, 127:1208-1210, 1993.

NICODEMO, D.; COUTO, R. H. N.; MALHEIROS, E. B.; JONG, D. Biologia floral em moranga (*Cucurbita maxima* Duch. var. "Exposição"). **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, 29:611-616, 2007.

OLIVEIRA, A. G. de; CLEAVER, A. J. T.; EMPERAIRE, L.; KAGEYAMA, P. Y.; STELLA, A. Encontro nacional sobre agrobiodiversidade e diversidade cultural. In: **Agrobiodiversidade e diversidade cultural**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. 82p, 2006.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF, 2004.

PEREIRA, W. **Recomendações para a frutificação da abobora híbrida tipo Tetsukabuto: uso de polinizadores e reguladores de crescimento de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Hortícolas, 1999. 7p. (Embrapa Hortícolas. Comunicado Técnico, 12).

PERVEEN, A.; QAISER, M. Pollen flora of Pakistan-L VI. Cucurbitaceae. **Pakistan Journal of Botany**, 40(1):9-16, 2008.

PESSANHA, L. **Transgênicos, recursos genéticos e segurança alimentar: o que está em jogo nos debates?** Campinas – SP: Armazém do Ipê, 2005.

POZZOBON, M. T.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). **Cytologia**, 7(3):275–287, 2006.

PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, 143:1-81, 2007.

QUEIRÓZ, M. A. Potencial do germoplasma de cucurbitáceas no Nordeste brasileiro. **Horticultura Brasileira**, 11(1):7-9, 1993.

RODRIGUES, L. R.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences** - Porto Alegre, 2(3,4):159-167, 2004.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sex Plant Reprod.** 12:241-244, 2000.

RUBENSTEIN, K. D.; SMALE, M.; WIDRLECHNER, M. P. Demand for genetic resources and the U. S. National Plant Germplasm System. **Crop Science**, Madison, 46:1021-1031, 2006.

SALGADO - LABOURIAU, M. L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1973.

SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural**, Santa Maria, 32(1):165-173, 2002.

SATO, S.; PEET, M. M.; THOMAS, J. F. Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under chronic, mild heat stress. **Plant Cell Environment**, v. 23, p. 719-726, 2000.

- SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John & Sons, 325-440p., 1995.
- SHIVANNA, K. R.; LINSKENS, H. F.; CRESTI, M. Pollen viability and pollen vigor. **Theoretical and Applied Genetics**, 81:38–42, 1991.
- SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. Pollen biology. A laboratory manual. Berlin/New York: **Springer - Verlag**, Berlin/Heidelberg, 210p., 1992.
- SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. The angiosperm pollen : structure and function. **Wiley Eastern**, New Delhi, 1985.
- SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Boca Raton: CRC Press, 391p., 1993.
- SOUZA, S. A. M. **Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq.** Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 2008, 55p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen: biology, biochemistry and management. New York: **Springer - Verlag**, 172p., 1974.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. A.; PEREIRA, A. V. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Sci. Biol. Sci.**, 28(1):7-12, 2006.
- WEEDEN, N. F. Isozyme studies indicate that the genus Cucurbita is an ancient tetraploid. **Cucurbits Genetics Cooperative Report**, 7: 84-87, 1984.
- WHITAKER, T.W.; ROBINSON, R.W. Squash breeding. In: Basset, M. J. Breeding vegetable crops. **Wetsport: Avi. Rome**, Italy, 209-246p, 1984.
- YOUNG, L. W.; WILEN, R. W.; BONHAM-SMITH, P.C. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. **Journal of Experimental Botany** 55:485-495, 2004.
- ZINN, K. E.; TUNC-OZDEMIR, M.; HARPER, J. F. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. **Journal of Experimental Botany**, 61:1959-1968, 2010.