

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN COMO UMA
ESTRATÉGIA ADICIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DE
ACESSOS DE MAMOEIRO**

Josimare Queiroz da conceição

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2021**

CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN COMO UMA ESTRATÉGIA ADICIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DE ACESSOS DE MAMOEIRO

Josimare Queiroz da conceição

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a. Ronilze Leite da Silva da Conceição

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

C744c

Conceição, Josimare Queiroz da.

Criopreservação de grãos de pólen como uma estratégia adicional para a conservação de acessos de mamoeiro / Josimare Queiroz da Conceição. – Cruz das Almas, Bahia, 2021.

50f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo.

Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Coorientadora: Prof. Dra. Ronilze Leite da Silva da Conceição.

1.Mamão – Criopreservação – Grãos de pólen.
2.Mamão – Conservação – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.651

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.

Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN COMO UMA
ESTRATÉGIA ADICIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DE ACESSOS
DE MAMOEIRO**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Josimare Queiroz da conceição

Aprovada em: 30 de agosto de 2021

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a. Hellen Cristina da Paixão Moura
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Examinador Externo)

Prof.^a Dr.^a. Eva Maria Rodrigues Costa
Faculdade Maria Milza - FAMAM
(Examinador Externo)

DEDICATÓRIA

À Deus, “Àquele que só faz maravilhas, porque sua benignidade é para sempre”
(Salmos 136:4).

À minha família, pelo carinho imensurável.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde, paz, bençãos, por realizar feitos maravilhosos e por sua presença constante em minha vida.

À toda minha família, minha mãe e Leo por toda ajuda, apoio, por estarem ao meu lado me incentivando durante o meu percurso acadêmico.

Ao meu orientador Dr. Carlos A. da Silva Ledo, agradeço por oportunizar minha inserção à pesquisa desde a Graduação, pela disponibilidade em ajudar, pela paciência, confiança, conhecimentos compartilhados.

À Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança depositada no desenvolvimento deste trabalho e pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo. Obrigada pela oportunidade!

À Dra. Ronilze Leite da Silva pela orientação, por ajudar-me em tudo que precisava, por compartilhar seus conhecimentos, disponibilidade, paciência e compreensão, serei sempre grata por toda ajuda.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de realização do Mestrado.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela infraestrutura e recursos materiais necessários que permitiram a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Malena por toda ajuda ao longo desta caminhada; Ana Maria por todo apoio e amizade e toda equipe de pesquisa em mamoeiro: Celeste, Taís, Sr. Pereira e Djalma, por todo apoio durante as atividades em campo.

À equipe do Laboratório Cultura de Tecidos: Helder, Wagner, Prof. Everton Hilo e Helen, e a equipe do Laboratório de Conservação e Tecnologia de Sementes da Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo convívio e conhecimentos compartilhados.

À equipe de funcionários da vigilância da Embrapa que zelam pela nossa segurança: Jefersson, Sr. Benetido, Valdemir, Vando e Júnior, por todo apoio durante as atividades em campo.

A Pós-doutora Karoline Gonçalves pela revisão e sugestões.

Aos professores do programa de Pós-Graduação, em especial a Dr^a Ana Cristina Loyola, por todo conhecimento transmitido durante o estágio docência.

A todos que de alguma forma fizeram parte do desenvolvimento desta dissertação.

MUITO OBRIGADA!

CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN COMO UMA ESTRATÉGIA ADICIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DE ACESSOS DE MAMOEIRO

RESUMO: A criopreservação é uma técnica que permite a conservação em longo prazo e tem potencial como duplicata de segurança, sem necessidade de intervenção humana constante, uma vez que, em temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (-196°C) as atividades biológicas das células são significativamente reduzidas e dificilmente o material biológico sofre alterações. Sementes, brotos inativos *in vivo*, brotos *in vitro*, pólen ou qualquer parte da estrutura da planta, podem ser conservados de forma eficiente. A criopreservação de pólen tem sido empregada em várias espécies de importância econômica e pode ser utilizada como uma estratégia alternativa para conservação de genes de interesse econômico do gênero *Carica*. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para realizar a criopreservação de grãos de pólen em acessos de mamoeiro para preservar alelos importantes da espécie *Carica papaya* L. Com esta finalidade, 17 acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram utilizados para realizar o ensaio de criopreservação. As anteras com os grãos de pólen foram desidratadas e preservadas em nitrogênio líquido a -196°C por 24 horas. Após o congelamento avaliou-se a viabilidade *in vitro* e o comprimento do tubo polínico. Para realização dos testes de viabilidade *in vivo* foram realizadas três polinizações entre os acessos estudados. Os resultados mostraram que é possível criopreservar grãos de pólen de mamão dos acessos estudados, nas condições estabelecidas, após um tratamento de desidratação por 2 h em sílica gel e estes apresentaram altos percentuais de germinação *in vitro* variando de (26,31% a 89,24%), com comprimento do tubo polínico superior a 0,24 mm. Os frutos obtidos a partir das polinizações *in vivo* com grãos de pólen criopreservados apresentaram sementes viáveis, 80% das sementes germinaram, nas diferentes combinações.

Palavras-chave: *Carica papaya* L.; Conservação; Nitrogênio líquido.

CRYOPRESERVATION OF POLLEN GRAINS AS AN ADDITIONAL STRATEGY FOR CONSERVATION OF PAPAYA ACCESSIONS

ABSTRACT: Cryopreservation is a technique that enables long-term conservation and has potential as a safety duplicate, without the need for constant human intervention, since at ultra-low temperatures in liquid nitrogen (-196 °C) the biological activities of cells are significantly reduced and the biological material hardly changes. Seeds, inactive *in vivo* shoots, *in vitro* shoots, pollen or any part of the plant structure can be conserved efficiently. Pollen cryopreservation has been employed in several species of economic importance and can be used as an alternative strategy for the conservation of genes of economic interest of the genus *Carica*. The objective of this study was to establish a protocol to perform cryopreservation of pollen grains in papaya accessions to preserve important alleles of the species *Carica papaya* L. For this purpose, 17 accessions belonging to the Active Germplasm Bank of Papaya of Embrapa Cassava & Fruits were used to conduct the cryopreservation test. Anthers with pollen grains were dehydrated and preserved in liquid nitrogen at -196 °C for 24 hours. After freezing, *in vitro* viability and pollen tube length were evaluated. To conduct the *in vivo* viability tests, three pollinations were performed between the studied accessions. The results showed that it is possible to cryopreserve pollen grains of the papaya accessions studied, under the established conditions, after a treatment of dehydration for 2 h in silica gel and these showed high percentages of *in vitro* germination, ranging from 26.31% to 89.24%, with pollen tube length greater than 0.24 mm. Fruits obtained from *in vivo* pollination with cryopreserved pollen grains contained viable seeds; 80% of the seeds germinated under the different combinations.

Keywords: *Carica papaya* L.; Conservation; Liquid nitrogen.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A cultura do mamoeiro	12
2.2 Biologia floral de <i>Carica papaya</i> L.	14
2.3 Conservação de recursos genéticos vegetais	16
2.4 Criopreservação	18
2.5 Conservação de grãos de pólen.....	20
2.6 Germinação <i>in vitro</i>	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 1: Criopreservação de grãos de pólen de acessos do Banco de Germoplasma de mamão	29
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Desidratação dos grãos de pólen	34
2.2 Criopreservação de grãos de pólen.....	35
2.3 Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen	35
2.4 Teste de viabilidade <i>in vivo</i> dos grãos de pólen	36
2.5 Análise estatística dos dados	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 Desidratação dos grãos de pólen	37
3.2 Criopreservação de grãos de pólen.....	40
3.3. Polinização <i>in vivo</i>	43
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

O mamoeiro pertence à classe Dicotyledonae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae e gênero *Carica* (COSTA; PACOVA, 2003). A família Caricaceae é formada por 35 espécies subdivididas em seis gêneros: *Carica* (1 sp.), *Vasconcellea* (21 spp.), *Cylicomorpha* (2 spp.), *Horovitzia* (1 sp.), *Jarilla* (3 spp.) e *Jacaratia* (7 spp.) (VAN DROOGENBROECK et al., 2004; MING et al., 2007; YOGIRAJ et al., 2014). *Carica papaya* L. é o único membro do gênero *Carica* na família Caricaceae que apresenta valor econômico, as demais espécies são reconhecidas com potencial de genes úteis para serem utilizadas nos programas de melhoramento genético da espécie *Carica papaya* L. (COSTA; PACOVA, 2003).

A cultura é de suma importância no Brasil, que se destaca por ser o terceiro maior produtor mundial da fruteira com produção de aproximadamente 1,06 milhões de toneladas (FAO, 2021), concentrada, principalmente, nos estados do Espírito Santo (403.278 t), Bahia (390.075 t) e Ceará (118.717 t) (IBGE, 2021).

O fruto é rico em fibras, carboidratos, cálcio, ferro, potássio, vitamina A, B, C, K e antioxidantes (carotenos e flavonóides) (MING et al., 2008; YOGIRAJ et al., 2014; SILVA et al., 2015; EVANS; BALLEEN, 2015). A planta também é cultivada por possuir látex leitoso, constituído pela enzima proteolítica papaína utilizada em produtos farmacêuticos, cosméticos, cerveja e para amaciar carnes (MING et al., 2007; MING et al., 2008; YOGIRAJ et al., 2014; EVANS; BALLEEN, 2015).

Carica papaya L. é uma espécie poligâmica com três tipos de sexo, masculino, feminino e hermafrodita (MING et al., 2007; YOGIRAJ et al., 2014). Os frutos com ampla aceitação no mercado são provenientes de plantas hermafroditas devido ao formato piriforme a oblongo, cavidade interna pequena e espessura da polpa maior diferente de frutos esféricos de plantas femininas com cavidade interna grande em relação à espessura da polpa. Plantas masculinas não são utilizadas para fins econômicos porque geralmente não produzem frutos (URASAQUI et al., 2002; COSTA; PACOVA, 2003; MING et al., 2007).

A cultura do mamoeiro, apresentar uma estreita base genética e suscetibilidade a uma gama de pragas e doenças (LIMA et al., 2001; DALTRO et al., 2014; SILVA et al., 2016). Sendo assim, a conservação do pool genético é importante para assegurar a preservação de alelos para desenvolvimento futuro de novas cultivares resistentes

pelos programas de melhoramento genético da cultura (RAJASEKHARAN et al., 2013).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura possui um Banco Ativo de Germoplasma de mamão (BAG-Mamão) com quatro espécies (*C. papaya* L., *V. cauliflora*, *V. quercifolia* e *J. spinosa*), distribuídas em 115 acessos de *C. papaya* L., 1 acesso de *V. cauliflora*, 1 acesso de *V. quercifolia* e 4 acessos de *J. spinosa*.

Neste trabalho, foram estudados 17 acessos pertencentes à espécie *Carica papaya* L., e aos grupos Solo e Formosa, assim distribuídos: 1) Grupo Formosa - CMF 003 (DCG423-5), CMF 004 (DCG424-4), CMF 008 (DCG593-10), CMF 020 (DCG424-4 x 439-1), CMF 028 (DCG439), CMF 076 (Manga Mourão), CMF 060 (Sunrise Cross 2), CMF 115 (SEED1250), CMF 129, CMF 188 (FRF1436) e 2) Grupo Solo - CMF 005 (Solo Linha IX), CMF 050 (S7), CMF 082 (Hortus Gold), CMF 087 (Waimanalo), CMF 114 (SEED1216), CMF 123 (Vermelho Thai), CMF 235 (JTA).

Estudos envolvendo a conservação de pólen são importantes para manter a diversidade genética de espécies de importância econômica, possibilitando também superar impasses como a assincronia de florescimento (RAJASEKHARAN et al., 2013; SANTONIERI; BUSTAMANTE, 2016). A conservação do germoplasma vegetal em temperaturas ultrabaixas (-196°C), conhecida como criopreservação, possibilita preservar o material biológico em longo prazo com custo de armazenamento relativamente baixo, já que demanda pouca intervenção humana e com potencial reduzido de variações somaclonais, sendo uma excelente alternativa como duplicata de segurança do germoplasma conservado. Desta forma, o pólen ou qualquer parte da estrutura da planta, estará protegido de contaminações, riscos bióticos e abióticos (KELLER; PANIS; ENGELMANN, 2012; LI et al., 2017; PANIS; NAGEL; HOUWE, 2020).

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo a conservação de grãos de pólen de acessos do BAG-Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura por meio da técnica de criopreservação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma árvore frutífera cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Seu principal ponto de referência como centro de origem e diversidade é o México, mais precisamente na vertente oriental dos Andes, na Bacia Amazônica superior (MING et al., 2007; MING et al., 2008; FARIA et al., 2009; DALTRO et al., 2014).

A cultura é de suma importância no Brasil, que se destaca por ser o terceiro maior produtor mundial da fruteira, respondeu com 8,5 % da produção mundial, no ano de 2019, com produção de aproximadamente 1,16 milhões de toneladas (FAO, 2021), concentrada, principalmente, nos estados do Espírito Santo (403.278 t), Bahia (390.075 t) e Ceará (118.717 t) (IBGE, 2021).

O maior produtor é a Índia com 6,05 milhões de toneladas, o que representou 44% da produção mundial de mamão. Visando atingir o sucesso atual as principais medidas adotadas para atingir este patamar se apoia por boas práticas agrícolas, demanda doméstica robusta e fornecimento adequado de sementes (SHARMA; MITRA; SARAN, 2016).

Além disso, o Brasil se destaca como o segundo maior exportador, atrás apenas do México. À vista disso, é nítido a importância do Brasil no mercado internacional, tanto da produção como da exportação do mamão (FAO, 2021). O Espírito Santo foi o maior exportador do fruto, em 2019, produziu 403.278 toneladas, com uma área plantada de aproximadamente 6.874 hectare (INCAPER 2018). A Bahia é o segundo maior exportador com produção de 390.075 toneladas.

É cultivado quase em todos os estados do Brasil, mas são nas regiões Sudeste e Nordeste que se concentram os principais polos de produção da fruta no Brasil, sendo a Bahia e o Espírito Santo responsáveis por aproximadamente 70% da área e da produção de mamão no país (INCAPER 2018). A eficiência produtiva nessas regiões é devido as condições edafoclimáticas favoráveis que garante sua exploração como atividade agrícola de alta rentabilidade e de grande relevância econômica e social (INCAPER 2018).

O mamoeiro pertence à classe Dicotyledonae, subclasse Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricineae, família Caricaceae e gênero *Carica* (COSTA;

PACOVA, 2003). A família Caricaceae é formada por 35 espécies, subdivididas em seis gêneros: *Carica* (1 sp.), *Vasconcellea* (21 spp.), *Cylicomorpha* (2 spp.), *Horovitzia* (1 sp.), *Jarilla* (3 spp.) e *Jacaratia* (7 spp.) (VAN DROOGENBROECK et al., 2004; MING et al., 2007; YOGIRAJ et al., 2014), sendo que somente a espécie *Carica papaya* L. apresenta valor econômico. Outras espécies são reconhecidas com potencial de genes úteis para serem utilizadas nos programas de melhoramento genético da espécie *Carica papaya* L. visando, principalmente resistência a doenças (COSTA; PACOVA, 2003).

O mamoeiro é considerado uma planta de crescimento rápido, semilenhosa e que pode chegar a 20 m de altura com fase juvenil curta (3 a 8 meses). A partir do período em que inicia seu florescimento, continua a florescer e gerar frutos o ano inteiro (MING et al., 2007; MING et al., 2008; YOGIRAJ et al., 2014).

A espécie (*Carica papaya* L.) possui sistema radicular pivotante, com raiz principal desenvolvida e ramificações laterais, sendo capaz de penetrar profundamente no solo. O caule é herbáceo, ereto, fistuloso com 10 a 30 cm de diâmetro, apresentando uma coroa de folhas na região apical. As folhas são grandes, alternadas, glabras, com 20 a 60 cm, apresentando pecíolos longos, fistulosos, com 50 a 70 cm (YOGIRAJ et al., 2014; DANTAS; CASTRO NETO, 2000). Seus frutos são do tipo baga e seu formato varia dependendo do sexo da flor podendo ser arredondado, oblongo, alongada, cilíndrico ou piriforme. Sua casca é fina e lisa com coloração amarelo-clara a alaranjada, preservando uma polpa de 2,5 a 5 cm de espessura, com coloração que varia de amarela a avermelhada. As sementes são pequenas, arredondadas, rugosas e envolvidas por mucilagem (DANTAS; CASTRO NETO, 2000).

O mamoeiro produz frutos de boa qualidade em locais com grande insolação, a temperaturas entre 22 a 26°C, com pluviosidade entre 1.800 a 2.000 mm anuais e altitude de até 200 m acima do nível do mar. Embora se adapte a regiões com altitudes mais elevadas e temperaturas mais baixas, o desenvolvimento da planta e a qualidade dos frutos é menor em comparação aos mamoeiros cultivados em locais mais quentes (FARIA et al., 2009, SERRANO; CATTANEO, 2010).

O avanço do agronegócio do mamoeiro no mercado brasileiro no decorrer dos anos tem sido beneficiado por um progressivo desenvolvimento tecnológico elevando a potencialidade de exportação da fruteira (OLIVEIRA, 2015).

Existem duas principais variedades de mamão produzidas no Brasil que pertencem aos grupos Solo e Formosa. Os mamões do tipo Solo (Golden e Sunrise Solo), conhecidos como mamão Havaí, Papaya e que tem como características frutos com tamanho pequeno, geralmente pesando entre 300 a 650g e polpa avermelhada (FARIA et al., 2009; DIAS; OLIVEIRA; DANTAS, 2011; DANTAS; JUNGHANS; LIMA, 2013; EVANS; BALLEEN, 2015). As variedades do grupo Formosa compreendem híbridos F₁ (Tainung nº1, Tainung nº2 e Calimosa 01) caracterizados pelo tamanho maior do fruto, que pesam entre 1.000 a 1.300 g e coloração da polpa avermelhada (FARIA et al., 2009; SERRANO; CATTANEO, 2010; DIAS; OLIVEIRA; DANTAS, 2011; DANTAS; JUNGHANS; LIMA, 2013; EVANS; BALLEEN, 2015).

Devido ao número restrito de cultivares para plantio que implica em uma base genética estreita, a vulnerabilidade a doenças e pragas constituem fatores limitantes à expansão da cultura. As viroses causam sérios prejuízos na produção (LIMA et al., 2001; DALTRO, et al., 2014; SILVA et al., 2016) a exemplo do vírus da mancha anelar (*Papaya ringspot virus* - PRSV) e o vírus da meleira (*Papaya meleira virus*-PSDVPMéV). Além disso, destacam-se também, doenças causadas por pragas, como ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*), ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), ácaros vermelhos (*Tetranychus desertorum*, *Tetranychus bastosi*, *Tetranychus mexicanus*, *Tetranychus neocaledonicus*), os fungos são doenças também muito limitantes para a cultura, como tombamento ou damping-off causado por um complexo de fungos (*Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Fusarium*), podridões-de-*Phytophthora* (*Phytophthora palmivora* e *Phytophthora parasitica*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), varíola ou pinta-preta (*Asperisporium caricae*), oídio (*Oidium caricae*), (FARIA et al., 2009; DANTAS; JUNGHANS; LIMA, 2013; EVANS; BALLEEN, 2015).

2.2 Biologia floral de *Carica papaya* L.

O sistema reprodutivo do mamoeiro é autógamo e apresentam uma pequena taxa de cleistogamia e apresenta dois tipos distintos de plantas, as dióicas e as ginodióicas. As dióicas com flores unisexuais, são plantas com flores masculinas e femininas e as ginodióicas têm flores bissexuais e unisexuais, hermafroditas e femininas (OECD, 2005; MING et al., 2007). Desta forma, apresentam três formas

sexuais: feminino, masculino e hermafrodita, e o tipo de inflorescência depende do sexo da planta (MING et al., 2007; YOGIRAJ et al., 2014).

As plantas masculinas apresentam inflorescências com flores masculinas, delgadas, geralmente constituídas pelo tubo da corola estreito e longo, com dez estames, sem pistilo (DANTAS; CASTRO NETO, 2000; MING et al., 2007). As plantas femininas apresentam inflorescência curta, com poucas flores, pistilo grande e funcional, com cinco estigmas soldados na base e sem estames (DANTAS; CASTRO NETO, 2000; MING et al., 2007). As plantas hermafroditas apresentam inflorescências curtas, com flores bissexuais, pistilo constituído por um ovário, estilete, cinco estigmas soldados na base e livres no ápice em forma de leque, com dez estames diadelfos, cinco maiores e cinco menores (DANTAS; CASTRO NETO, 2000; FIGUEREDO, 2011) e são as plantas que produzem frutos mais desejáveis pelo mercado consumidor (MING et al., 2007; YU et al., 2008; YOGIRAJ et al., 2014).

A expressão sexual da espécie (*Carica papaya* L.) é controlada por apenas um gene, com três formas alélicas (m, M1 e M2), em que m determina a feminilidade, M1 a masculinidade e M2 o hermafroditismo. As formas M1M1 e M2M2 são combinações inexistentes porque são letais zigóticos (HOFMEYER, 1967). Diante disso, é possível prever quatro tipos de cruzamentos entre os três tipos de flores: a flor feminina X flor masculina que geralmente produzirão sementes que poderão originar 50% de plantas femininas e 50% de plantas masculinas; a flor hermafrodita X flor feminina, podendo originar 50% de plantas hermafroditas e 50% de plantas femininas. O cruzamento entre flor masculina X flor hermafrodita normalmente produzirá 33% de plantas hermafroditas, 33% de plantas femininas e 33% de plantas masculinas. Apenas no cruzamento entre flores hermafroditas é possível prever que as sementes oriundas desta combinação produzirão 66% de plantas hermafroditas e 33% de plantas femininas, proporção 2:1, sendo este tipo de cruzamento o desejável pelo mercado consumidor (OLIVEIRA, 2015).

Pesquisas sobre a fisiologia das flores relatam que mamoeiros hermafroditas podem sofrer influência marcante de fatores ambientais, como temperatura e umidade do ar e do solo resultando em presença de flores anormais, como as carpeloides, pentândricas e estaminadas (MARTELLETO et al., 2011).

Flores hermafroditas normais, podem, se transformar em estéreis apresentando ovário atrofiado, não havendo formação de fruto, anomalia chamada de esterilidade de verão ou esterilidade feminina, ocorre durante os meses mais quentes do ano,

sendo agravado por déficit hídrico nas regiões produtoras, resultante de causas genéticas e ambientais (MARTELLETO et al., 2011; COSTA; PACOVA, 2003; DANTAS et al., 1998).

Um outro tipo de anomalia são as flores hermafroditas carpelóides, resultam da transformação dos estames em carpelos, de forma que carpelos normais ficam suprimidos ou em diferentes graus de desenvolvimento e originam frutos deformados, conhecidos popularmente por “cara-de-gato”. O aparecimento desses frutos está associado a fatores genéticos, os quais são também afetados por condições do ambiente, como baixas temperaturas (COSTA; PACOVA, 2003; DANTAS; JUNGHANS; LIMA, 2013).

As flores hermafroditas podem ainda sofrer outro tipo de anomalia, pentândria, diferindo por apresentar cinco estames curtos, os quais se alternam às pétalas. Os frutos desenvolvidos por este tipo de flor são de formato arredondado ou globular e com cinco sulcos longitudinais profundos na casca dos frutos (COSTA; PACOVA, 2003; DANTAS; JUNGHANS; LIMA, 2013).

A compreensão sobre a biologia da floração é importante para a coleta de grãos de pólen viáveis para estudos envolvendo conservação (BASTOS et al., 2017; VISHWAKARMA et al., 2020).

2.3 Conservação de recursos genéticos vegetais

A conservação dos recursos genéticos é fundamental para manter a diversidade genética, a sustentabilidade da produção agrícola garantindo o contínuo uso das espécies essenciais para a alimentação humana e programas de melhoramento, pois pode fornecer opções de ampliação da base genética das culturas, melhorar sua produtividade, desenvolver espécies resistentes a patologias e melhor adaptadas às mudanças climáticas (RAO, 2004; KAITY et al., 2008; SANTONIERI; BUSTAMANTEII, 2016; ALVES; AZEVEDO, 2018).

Existem duas estratégias principais para preservar a diversidade genética de plantas: *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* consiste na manutenção dos ecossistemas e das espécies em seu habitat natural, ela permite a continuidade de seu processo evolutivo natural, possibilita a sobrevivência dos polinizadores de sementes e colabora para a preservação de espécies silvestres. No entanto, devido a

destruição dos habitats, esta forma de conservação necessita de constantes monitoramentos e manejo, além de todo aspecto político que existe em torno das áreas de conservação. A conservação de espécies fora de seu habitat natural é chamada de conservação *ex situ* e permite preservar o germoplasma de cultivo que são comercialmente importantes, garantindo a manutenção de genes com potencial uso no melhoramento genético da espécie e em alguns casos de espécies que podem estar em risco de extinção (TOWILL, 2002; DAS et al., 2017).

As diferentes estratégias de conservação são complementares (KULUS, 2019) e dispõem de uma variedade de opções metodológicas para a sua implementação. Apesar disso, a seleção da estratégia adequada deve considerar uma série de fatores, inclusive a natureza biológica das espécies, a praticidade e a possibilidade de adotar o tipo de conservação estabelecido com segurança (ENGELMANN, 2012).

As diferentes estratégias de conservação de germoplasma *ex situ*, podem ser na forma de bancos de sementes, coleções *in vitro*, criobancos e bancos de germoplasma em campo. O critério para se decidir sobre a melhor estratégia de conservação deve considerar primeiramente o sistema reprodutivo da planta, além das atividades que deverão estar ligadas ao banco. As coleções de base têm a finalidade de conservar o germoplasma por longo prazo e como precaução contra possíveis perdas, além de não possuir atividades de distribuição ou intercâmbio, de forma geral. Já, as coleções ativas, coleções nucleares ou coleções de trabalho estão diretamente ligadas à estas ações e ainda às atividades de avaliação, caracterização, documentação e intercâmbio de material genético. São bancos de germoplasma de curto e médio prazo e objetivam evitar a perda de recursos genéticos ligados às espécies de importância agrícola. As coleções nucleares, por outro lado, reúnem a maior variabilidade genética de uma espécie no menor número possível de acessos (PAIVA et al., 2019).

Uma importante ação para todo banco de germoplasma é o estabelecimento de uma duplicata de segurança, ou seja, uma cópia de todos os acessos conservados, que seja mantida, de preferência, em outra condição / localidade de conservação, garantindo, dessa forma o material conservado contra a ocorrência de eventuais acidentes. Bancos *in vitro* e criobancos são alternativas interessantes como duplicatas de segurança de espécies de propagação vegetativa, como abacaxi, banana, cana de açúcar e outros (SILVA et al., 2017).

Grandes pesquisas na área da criobiologia, ou seja, o efeito das temperaturas ultrabaixas em organismos vivos, projetam novas alternativas para preservação dos recursos genéticos e garantem a diversidade de culturas (KULUS, 2019; PANIS; NAGEL; HOUWE, 2020). Entre todas as estratégias de conservação, a criopreservação até o presente momento é o único método para a conservação em longo prazo (BENITO; RAMÍREZ; ARANDA, 2004; ENGELMANN, 2012).

2.4 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica promissora de armazenamento de material biológico em nitrogênio líquido (-196°C), sendo uma estratégia de conservação viável para diferentes espécies de plantas, apesar de demandar protocolo específico para cada espécie, levando também em conta outros aspectos como logística de fornecimento de nitrogênio líquido e custos, dentre outros (RAJASEKHARAN; GANESHAN, 2019). Em temperatura ultrabaixa, as atividades fisiológicas, metabólicas e químicas das células são bastante reduzidas, quase nula, ou seja, dificilmente o explante sofre alterações (KULUS; ZALEWSKA, 2014; RAJASEKHARAN; GANESHAN 2019; PANIS; NAGEL; HOUWE, 2020).

Esta estratégia apresenta vantagens como risco mais baixo de variação somaclonal, baixo custo para armazenamento, já que requer pouca intervenção e, portanto, pouca mão de obra. Por outro lado, exige uma infraestrutura a ser montada e uma mão de obra especializada. Assim, sementes, brotos inativos *in vivo*, brotos *in vitro*, pólen, qualquer parte da estrutura da planta, pode estar protegida de contaminações, riscos bióticos e abióticos como as mudanças climáticas e erosão genética em nitrogênio líquido (KELLER; PANIS; ENGELMANN, 2012; LI et al., 2017; PANIS; NAGEL; HOUWE, 2020; CRUZ-CRUZ et al., 2013).

Silva et al. (2017) relataram a criopreservação de grãos de pólen de acessos silvestres e cultivados de abacaxizeiros, anteras com grãos de pólen foram previamente desidratadas e imersas em nitrogênio líquido. Os resultados demonstraram que a criopreservação de grãos de pólen foi eficiente e nas polinizações realizadas *in vivo* com grãos de pólen criopreservados, houve a formação de sementes nas diferentes combinações.

Outros tecidos vegetais podem ser usados na criopreservação tais como as sementes. Ferreira (2020) desenvolveu um protocolo para criopreservação de sementes de oito espécies de *Passiflora*. A técnica consistiu na desidratação das sementes em sílica gel por 24 horas e conservação em nitrogênio líquido por um ano. Os resultados mostraram a germinação das sementes, acima de 80% com uso de reguladores vegetais.

Para poder criopreservar alguns explantes algumas técnicas são adotadas e a criopreservação por meio da técnica de vitrificação em gotas diversos explantes vem sendo criopreservados com sucesso (SOUZA et al., 2018; LÉDO et al., 2020; PANIS; SWENNEN, 2005).

Souza et al. (2018) descreveu um protocolo para criopreservar ápices caulinares de genótipos de abacaxi selvagens e cultivados pela técnica de vitrificação em gotas. O uso de soluções crioprotetoras é fundamental para que explantes como pontas de brotos tolerem as temperaturas ultrabaixas ao serem conservadas em nitrogênio líquido. Método consiste na extração de ápices caulinares de plantas cultivadas *in vitro*, desidratação em meio de pré-cultivo suplementado com alta concentração de sacarose, tratamento em solução de vitrificação de planta (PVS2) e imersão em nitrogênio líquido e posterior regeneração. Os resultados produziram índices de sobrevivência e regeneração de cerca de 70%, dos explantes iniciais.

Outro método muito utilizado na criopreservação é por encapsulamento-desidratação, os explantes são encapsulados em grânulos de alginato, seguido de cultivo destas cápsulas em meio nutritivo contendo elevados níveis de sacarose, desidratação e imersão direta em nitrogênio líquido (SAKAI; ENGELMAN, 2007). Como exemplo de encapsulamento-desidratação, ápices caulinares de *Genipa americana* apresentaram potenciais para trabalhos de criopreservação. Os explantes foram submetidos a diferentes tempos de imersão em solução crioprotetora e diferentes tempos de desidratação. O protocolo mostrou resultados promissores após a imersão por 24 horas em solução crioprotetora e desidratação em câmara de fluxo laminar por 2 horas (SÁ et al., 2015).

Existem diversas técnicas de criopreservação, e fazer a escolha de qual é a mais adequada dependem do explante para ser conservado (SAKAI; ENGELMANN, 2007).

2.5 Conservação de grãos de pólen

O grão de pólen é um explante importante para ser conservado, por conter todas as informações do genoma haplóide das espécies (REN et al., 2019) e a criopreservação é a melhor estratégia para sua conservação. É considerado uma fonte útil de diversos alelos dentro de um pool genético e, portanto, pode ser uma estrutura eficaz para conservar diversidade genética em bancos de germoplasma. A facilidade de armazenamento e transporte do pólen são um enorme atrativo para ampliar as opções a pesquisadores em programas de melhoramento genético (VOLK, 2011). A disponibilidade de pólen viável em um criobanco possibilitará o fornecimento constante em longo prazo a programas de melhoramento para necessidades de polinização artificiais ou hibridações interespecíficas e intergenéricas, garantindo a diversidade da espécie com intuito de desenvolver novas linhagens, variedades ou híbridos (GANESHAM et al., 2008; RAJASEKHARAN et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

Além da aplicação na conservação de germoplasma, pode também ser utilizada para superar impasses como o florescimento assíncrono entre parentais de interesse em um programa de melhoramento genético. Na maioria dos casos, parentes selvagens apresentam incompatibilidade no tempo de florescimento de outras plantas ou não se adaptam bem em diferentes condições climáticas em consequência de fatores bióticos e abióticos, resultando numa produção pobre de pólen. Assim, o pólen pode ser coletado no período do florescimento e criopreservado para ser utilizado quando a polinização materna for possível (GANESHAM et al., 2008; RAJASEKHARAN et al., 2013).

O pólen armazenado em criobancos, possui “valor agregado” em função de sua viabilidade prolongada, por se manter viável em longo prazo para realizar sua função natural de fertilização, levando a formação de frutos e sementes que pode também ter relevância para a realização de pesquisas relacionadas à biologia do pólen (GANESHAM et al., 2008; RAJASEKHARAN et al., 2013; CHAUDHURY; MALIK, 2017).

No Instituto de Pesquisa Hortícola (IIHR, Bangalore), são mantidos grãos de pólen criopreservados de 600 acessos pertencentes a 40 espécies de 15 famílias, enquanto no NBPGR (Índia), são mantidos aproximadamente 65 acessos de

diferentes espécies e nos Estados Unidos, o NCGRP conserva grãos de pólen de 13 cultivares de pera e 24 espécies do gênero *Pyrus* (ALBA et al., 2011).

Na conservação de grãos de pólen o principal objetivo é a manutenção da sua viabilidade (DAMASCENO JUNIOR et al., 2008). Assim, é importante observá-la antes, durante e após o congelamento, analisando o tempo máximo em que este deve ficar armazenado sem prejuízos (VIEIRA, 2013).

Segundo Scorza e Sherman (1995), o grão de pólen vigoroso deve apresentar viabilidade em torno de 50 a 80% com comprimento do tubo polínico bem desenvolvido. Para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen fresco e armazenado, os testes *in vitro* são mais frequentemente usados, mas a fertilização *in vivo* é um método mais eficaz e conclusivo (SOUZA et al., 2015; BATOS; MILJKOVIC, 2019).

A conservação de grãos de pólen bem sucedida, para a maioria das espécies, está associada a vários fatores, dentre estes o efeito do genótipo, estágio fisiológico do pólen e da planta, temperatura, umidade, tolerância à dessecação e ao protocolo utilizado (GANESHAN et al., 2008; BORGHEZAN et al., 2011; KULUS; ZALEWSKA, 2014; VISHWAKARMA et al., 2020).

Alguns tipos de explante apresentam processos de desidratação natural e podem ser conservados sem nenhum tratamento prévio. Porém, para a maioria das espécies e das estruturas a serem congeladas, o grande conteúdo de água intracelular, demanda tratamentos prévios para evitar danos à célula durante o processo do congelamento que pode levar à formação de cristais de gelo intracelular com ruptura e morte celular (KULUS; ZALEWSKA, 2014; BALLESTEROS; PRITCHARD, 2020, PANIS; NAGEL; HOUWE, 2020).

A desidratação é uma etapa importante e imprescindível para se obter resultados bem sucedidos na criopreservação, já que consiste em remover a água congelável das células (COSTA; SPEHAR; SERENO; 2012; ZHANG et al., 2017). A sílica gel, soluções de sal saturadas, camaras de fluxo, e estufas, são agentes normalmente utilizados para o processo de desidratação dos grãos de pólen antes do congelamento (DINATO et al., 2020).

2.6 Germinação *in vitro*

A germinação *in vitro* é uma das técnicas mais utilizadas em estudos envolvendo viabilidade do pólen, pois fornece respostas mais próximas daquelas que ocorre *in vivo* (SOARES et al., 2008; ZHANG et al., 2017). O meio de cultura adicionado diferentes substâncias químicas, como sacarose, boro, nitrato de cálcio e ágar pode influenciar positivamente a germinação *in vitro* dos grãos de pólen. Essas substâncias desempenham papel fundamental na germinação e crescimento do tubo polínico (DÍAZ; GARAY 2008; NOGUEIRA et al., 2016).

A sacarose promove equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio, além de atuar como fonte de energia para crescimento do tubo (SARKAR et al., 2018). Boro melhora a absorção da sacarose e melhora a produção de pectina (WANG et al., 2003; ZHENG et al., 2019). Nitrato de cálcio está envolvido com a rigidez da membrana (ZHENG et al., 2019). O ágar é conhecido por dar consistência desejada ao meio. Meios líquidos levam o desprendimento do tubo, inviabilizando a avaliação uma vez que os pólenes sem tubo são considerados como não germinados (ALMEIDA et al., 2011; ZHANG et al., 2017). Outro aspecto importante no meio é o Ph que influencia na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e solidificação do ágar. Quando o Ph é ajustado pode levar o pólen aproveitar mais os nutrientes (PASQUAL et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- ALBA, V.; BISIGNANO, V.; ALBA, E.; STRADIS, A.; POLIGNANO, G. B. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 7, p. 977-982, 2011.
- ALMEIDA, C.; AMARAL, A.L.; BARBOSA, J.F.; NETO, J.F.B.; SERENO, M.J.C.M. Conservation and in vitro germination of pollen of maize (*Zeamays* subsp. *mays*). **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 4, p. 493-497, 2011.
- ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. Embrapa Network for Brazilian Plant Genetic Resources Conservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 5, p. 35-360, 2018.
- BALLESTEROS, D.; PRITCHARD, H. W. The cryobiotechnology of Oaks: A Integration of approaches for the long-term ex situ conservation of *Quercus* species. **Forests**, v. 11, n. 12, p. 1281, 2020.
- BASTOS, M. J. S. M.; BASTOS, L. P.; SOUZA, E. H.; SOARES, T. L.; MORAIS, D. V.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C. Floral and reproductive biology of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), a vulnerable endemic species of the Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, v. 31, n. 4, p. 665-676, 2017.
- BATOS, B.; MILJKOVIC, D. The vitality of the Serbian spruce (*Picea omorica*) pollen during the long-term cryopreservation. **Journal Grana**, v. 58, n. 6, p. 433-446, 2019.
- BENITO, M. E.G.; RAMÍREZ, I.C.; ARANDA, J. M. L. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 341-351, 2004.
- BORGHEZAN, M.; CLAUMAN, A. D.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; ORTH, A. I. In vitro viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. chev). **Crop breeding and applied biotechnology**, v. 11, p. 338-344, 2011.
- CHAUDHURY, R.; MALIK, S. K. **Cryopreservation of plant species: Practical approaches from handling to cryobanking**. Indian council of agricultural research (ICAR) National bureal of plant genetic resouces, Pusa campus, New Delhi – 110012. p. 52, 2017.
- COSTA, A. F. S.; PACOVA, B. E. V. **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Vitória, Es: Incaper, p. 59-102, 2003.
- COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. (Ed.). **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2012. 628 p.
- CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, Switzerland, v. 2, p. 73-95, 2013.
- DALTRO, C. B.; ABREU, E. F. M.; ARAGÃO, F. J. L.; ANDRADE, E. C. Genetic diversity studies of papaya meleira virus. **Tropical plant pathology**, v. 39, n. 1, p. 104-108, 2014.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C; PEREIRA, T. N. S; PEREIRA, M. G; SILVA, F. F. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 433-438, 2008.

DANTAS, J. L. L.; CASTRO NETO, M. T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, A. V. (Org.). **Mamão, Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 11-14, 2000.

DANTAS, J. L. L.; JUNGHANS, D. T.; LIMA, J. F. de (Ed.). **Mamão: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2013. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

DANTAS, J.L.L.; SOUZA, J.S.; PIINTO R.M.S.; LIMA, J.F. 1998. **Variabilidade genética e melhoramento do mamoeiro**. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livror/mamao.pdf>. Acesso em: 12 de setembro 2021.

DAS, A; VARMA, A.; PANDEY, R.; CHAUDHURY, R. Ex Situ Conservation Strategies in Litchi Germplasm. IN: KUMAR M., KUMAR V., PRASAD R., VARMA A. (eds) **The Lychee Biotechnology**. Springer, Cingapura, p. 381-393, 2017.

DIAS, N. L. P.; OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L. Avaliação de genótipos de mamoeiro com uso de descritores agronômicos e estimação de parâmetros genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1471-1479, 2011.

DÍAZ S.L.; GARAY, B.R. "Simple methods for in vitro pollen germination and pollen preservation of selected species of the genus Agave". **e-Gnosis [online]**, v. 6, p. 1-7, 2008.

DINATO, N. B.; SANTOS, I. R. I.; VIGNA, B. B. Z.; PAULA, A. F; FÁVERO, A. P. Pollen cryopreservation for plant breeding and genetic resources conservation. **Cryoletters**, v. 41, n. 3, p. 115-127, 2020.

ENGELMANN, F. Germplasm Collection, Storage and Conservation. In: ALTMAN, A.; HASEGAWA, P.M. (Eds.). **Plant Biotechnology and Agriculture**. Academic Press: Oxford, 2012, p. 255–268.

EVANS, E.A.; BALLEEN, F.H. **An overview of Global Papaya Production, Trade, and Consumption**. University of Florida. IFAS Ext. 2015; FE913:1–6. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FE/FE91300.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2021.

FAO. Food and agriculture organization of the United Nations for a world without hunger. FaoStat: agriculture date. 2018. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: jun. 2021.

FARIA, A.R.N.; NORONHA, A.C.S.; OLIVEIRA, A.A.R.; OLIVEIRA, A.M.G.; CARDOSO, C.E.L.; RITZINGER C.H.S.P.; OLIVEIRA, E.J.; COELHO, E.F.; SANTOS FILHO, H.P.; CRUZ, J.P.; OLIVEIRA, J.R.P.; DANTAS, J.L.L.; SOUZA, L.D.S.; OLIVEIRA, M.A.; COELHO FILHO, M.A.; SANCHES, N.F.; MEISSNER FILHO, P.E.M.; MEDINA, V.M.; COROLEIRO, Z.M. **A cultura do mamão**. 3.ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 119 p. (Coleção Plantar, 65).

FERREIRA, M.S. **Conservação de sementes e viabilidade polínica de Passiflora spp.** 2020. p.1-83. Dissertação (Mestrado em Recursos genéticos vegetais). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

FIGUEREDO, M. **Morfologia floral e análise de genes envolvidos na reversão sexual em mamoeiro (*Carica papaya* Linnaeus)**. 2011, p. 1-64. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of Pollen, In: REED, B. M. (Eds.). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York: Springer, p. 443-464, 2008.

HOFMEYR, J. D. J. Some genetic breeding aspects of *Carica papaya* L. **Agronomia Tropical**, v. 17, p. 345-351, 1967.

IBGE. Produção Agrícola Municipal, 2018. Disponível em: <www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/mamao/b1_mamao.pdf>. Acesso em: jun. 2021.

INCAPER. Polos de Fruticultura – Mamão, 2018. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/fruticultura-mamao>. Acesso em: 29 de setembro 2021.

KAITY, A.; ASHMORE, S.; DREW, R.; DULLOO, M. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p.1529-1539, 2008.

KELLER, E. R. J.; PANIS, B.; ENGELMANN, F. In vitro storage and Cryopreservation as substantial complements in concerted actions to better maintain and use crop germplasm. **Acta Horticulturae**, v. 961, p. 35-50, 2012.

KULUS, D. Managing plant genetic resources using low and ultra-low temperature storage: a case study of tomato. **Biodiversity and Conservation**, v. 28, p. 1003-1027, 2019.

KULUS, D.; ZALEWSKA M. Cryopreservation as a tool used in longterm storage of ornamental species – a review. **Scientia Horticulturae**. v. 168, p. 88-107, 2014.

LÉDO, A.S.; SANTANA, F.V.; OLIVEIRA, A.C.A.; OLIVEIRA, L.A.R.; SILVA, A.V.C. Cryopreservation of Brazilian green dwarf coconut plumules by droplet-vitrification. **Ciência Rural**, v. 50, n. 1, 2020.

LI, J.W.; OZUDOGRU, E.A.; LI, J.; WANG, M.R.; BI, W.H.; LAMBARDI, M. WANG, Q.C. Cryobiotechnology of forest trees: recent advances and future prospects. **Biodiversity Conservation**, v. 27, p. 795-814, 2017.

LIMA, R. C. A.; LIMA, J. A. A.; SOUZA JUNIOR, M. T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 689-702, 2001.

MARTELLETO, L.A.P.; RIBEIRO, R.L.D.; SUDOMARTELLETO, M.; VASCONCELOS, M.A.S.; PEREIRA, M.B. Expressão da esterilidade feminina e da carpeloidia em mamoeiro sob diferentes ambientes de cultivo protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 33, n. 4, p. 1185- 1193, 2011.

MEDINA, V.M.; COROLEIRO, Z.M. **A cultura do mamão**. 3.ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 119 p. (Coleção Plantar, 65).

MING, R.; HOU, S.; FENG, Y.; YU, Q.; DIONNE-LAPORTE, A.; SAW, J.H.; SENIN, P.; WANG, W.; LY, B. V.; LEWIS, K. L.; SALZBERG, S. L.; FENG, L.; JONES, M. R.; SKELTON, R. L.; MURRAY, J. E.; CHEN, C.; QIAN, W.; SHEN, J.; DU, P.; EUSTICE, M.; TONG, E.; TANG, H.; LYONS, E.; PAULL, R. E.; MICHAEL, T. P.; WALL, K.; RICE, D. W.; ALBERT, H.; WANG, M. L.; ZHU, Y. J.; SCHATZ, M.; NAGARAJAN, N.; ACOB, R. A.; GUAN, P.; BLAS, .; WAI, C. M.; ACKERMAN, C. M.; REN, Y.; LIU, C.; WANG, J.; WANG, J.; NA, J. K.; SHAKIROV, E. V.; HAAS, B.; THIMMAPURAM, J.; NELSON, D.; WANG, X.; BOWERS, J. E.; GSCHWEND, A. R.; DELCHER, A. L.; SINGH, R.;

SUZUKI, J. Y.; TRIPATHI, S.; NEUPANE, K.; WEI, H.; IRIKURA, B.; PAIDI, M.; JIANG, N.; ZHANG, W.; PRESTING, G.; WINDSOR, A.; NAVAJAS-PÉREZ, R.; TORRES, M. J.; FELTUS, F. A.; PORTER, B.; LI, Y.; BURROUGHS, A. M.; LUO, M. C.; LIU, L.; CHRISTOPHER, D. A.; MOUNT, S. M.; MOORE, P. H.; SUGIMURA, T.; JIANG, J.; SCHULER, M. A.; FRIEDMAN, V.; MITCHELL-OLDS, T.; SHIPPEN, D. E.; DEPAMPHILIS, C. W.; PALMER, J. D.; FREELING, M.; PATERSON, A. H.; GONSALVES, D.; WANG, L.; ALAM, M. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). **Nature**, v. 24, n. 452, p. 991-996, 2008.

MING, R.; YU, Q.; MOORE, P. H. Sex determination in papaya. **Seminars in Cell Developmental Biology**, v. 18, p. 401-408, 2007.

NOGUEIRA, P.V.; COUTINHO, G.; PIO, R.; SILVA, D.F.; ZAMBON, C.R. Establishment of growth medium and quantification of pollen grains and germination of pear tree cultivars. **Revista Ciência Agronômica [online]**, v. 47, n. 2, p. 380-386, 2016.

OECD. Organisation for the Economic Cooperation and Development. **Consensus document on the biology of papaya (*Carica papaya*)**. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, OECD Environment Directorate, Paris, p. 33. 2005.

OLIVEIRA, G. A. F. **Identificação, caracterização e validação de marcadores minissatélites para o mamoeiro**. 2015, p.1-88. Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; SALOMÃO, A. N.; JOSÉ, S.C.B.R.; MOREIRA, J.R. **Recursos genéticos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

PANIS, B.; NAGEL, M.; HOUWE, I. V. D. Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in vitro collections and/or in liquid nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1634, 2020.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant science**, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira Poncã em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrocência**, v. 8, p. 199-202, 2002.

RAJASEKHARAN, P. E.; RAVISH, B. S.; KUMAR, T. V.; GANESHAN, S. Pollen cryobanking for tropical plant species. In: NORMAH M.N, CHIN H.F, REED B.M (eds) **Conservation of tropical plant species**. Springer, Nova York, p 65-75, 2013.

RAJASEKHARAN, P. E.; GANESHAN, S. Current perspective on pollencryopreservation in horticultural species. **Acta Horticulturae**, v. 1234, p. 47-56, 2019.

RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 136-145, 2004.

REN, R.; LI, Z.; LI, B.; XU, J.; JIANG, X.; LIU, Y.; ZHANG, K. Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. **Elsevier**, v. 89, p. 14-20, 2019.

SÁ, F.P.; SOUZA, F.V.D.; SILVA, A.V.C; LEDO, A.S. Encapsulamento crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de apices caulinares de genipa americana. **Ciencia rural**, v. 45, n. 11, 2015.

SAKAI A.; ENGELMANN F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryo Letters**, v. 28, n. 3, p.151-172, 2007.

SANTONIERI, L.; BUSTAMANTEI, P. G. Conservação ex situ e on farm de recursos genéticos: desafios para promover sinergias e complementaridades. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 11, n. 3, p. 677-690, 2016.

SARKAR, T.; SARKAR, S.K.; VANGARU, S. Effect of sucrose and boric acid on in-vitro pollen germination of guava (*Psidium guajava*) varieties. **Advances in Research**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2018.

SERRANO, L. A. L.; CATTANEO, L. F. O cultivo do mamoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 657-959, 2010.

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

SHARMA, S.K.; MITRA S.K.; SARAN S. Papaya production in India – history, present status and future prospects, **Acta horticulturae**, v. 1111, p. 87-94, 2016.

SILVA, R.L.; SOUZA, E.H.; VIEIRA L.J.; PELACANI, C.R.; SOUZA, F.V.D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple acessions. **Scientia horticulturae**, v. 219, p. 326-334, 2017.

SILVA, C. A.; SCHMILDT, E. R.; SCHMILDT, O.; ALEXANDRE, R. S.; CATTANEO, L. F.; FERREIRA, J. P.; NASCIMENTO, A. L. Correlações fenotípicas e análise de trilha em caracteres morfoagronômicos de mamoeiro. **Revista Agro@ambiente On line**, v. 10, n. 3, p. 217-227, 2016.

SILVA, P.A; SILVA, J.A.C.; COELHO, P.O; SILVA, J.M.; ASSUNÇÃO, L.S. Avaliação da qualidade de mamões (*Carica papaya* L.). **Revista da Universidade do Rio Verde, Três Corações**, v. 13, n. 2, p. 465-474, 2015.

SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. Germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de pólen de diplóides de bananeira. **Crop Breeding and applied biotechnology**, v. 8, p. 111-118, 2008.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEÃO, N.; LEDO, C. A. S.; MAERTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea biocolor* (Bromeliaceae) pollen grains, na endemic species to the Atlantic Forest. **Euphytica**, v. 204, p. 13-28, 2015.

SOUZA F.V.D., SOUZA E.H., KAYA, E., VIEIRA L.J., SILVA R.L. Cryopreservation of Pineapple Shoot Tips by the Droplet Vitrification Technique. **Methods Mol Biol**. v. 1815, p. 269-277, 2018.

TOWIL, L. E. Cryopreservation of Plant Germplasm: Introduction and Some Observations. In: TOWILL, L. E., BAJAJ, Y. P. S. (Eds.). **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Berlib, Heidelberg: Springer, v. 50, 2002.

URASAKI, N.; TOKUMOTO, M.; TARORA, K.; BAN, T.; KAYANO, T.; TANAKA, H.; OKU, H.; CHINEN, I.; TERAUCHI, R. A male and hermaphrodite specific RAPD marker

for papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.281-285, 2002.

VAN DROOGENBROECK, B.; KYNDT, T.; MAERTENS, I.; ROMEIJN-PEETERS, E.; SCHELDEMAN, X.; ROMERO-MOTOCHI, J. P.; VAN DAMME, P.; GOETGHEBEUR, P.; GHEYSEN, G. Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (*Caricaceae*) using PCR-RFLP. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1473-1486, 2004.

VIEIRA, L. J. **Conservação *in vitro* e criopreservação de espécie de Manihot**. 2013. 1-103. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

VISHWAKARMA, P. K.; VASUGI, C.; VINCENT, L.; RAJASEKHARAN, P. Effect of cryopreservation on pollen viability, fertility and morphology of different *Psidium* species. **Cryobiology**, v. 98, p. 112-118, 2020.

VOLK, G.M. Collecting pollen for genetic resources conservation. In: GUARINO, L.; RAMANATHA, V.R.; GOLDBERG, E. (Eds) **Collecting plant genetic diversity: technical guidelines**. Bioversity International, Rome, pp 1–10, 2011. Disponível em: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=654. Acesso: Jun-2021.

WANG Q, LU L, WU X, LI Y, LIN J. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. **Tree Physiol**, v. 23, n. 5, p. 345-51, 2003.

YOGIRAJ, V.; GOYAL P. K.; CHAUHAN, C. S.; GOYAL, A.; VYAS, B. *Carica papaya* Linn: An Overview. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 5, p. 01-08, 2014.

YU, Q.; HOU, S.; FELTUS, F. A.; JONES, M. R.; MURRAY, J. E.; VEATCH, O.; LEMKE, C.; SAW, J. H.; MOORE, R. C.; THIMMAPURAM, J.; LIU, L.; MOORE, P. H.; ALAM, M.; JIANG, J.; PATERSON, A. H.; MING, R. Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, v. 53, p. 124-132, 2008.

ZHANG, J. M.; LU, X. X.; XIN, X.; YIN, G. K.; HE, J. J.; HUANG, B.; JIANG, D.; CHEN X. L. Cryopreservation of citrus anthers in the national crop genebank of China. **In Vitro Cellular e Developmental Biology**, v. 53, n. 4, p. 318-327, 2017.

ZHENG RH, SU SD, XIAO H, TIAN HQ. Calcium: a critical factor in pollen germination and tube elongation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 1-12, 2019.

CAPÍTULO I

Criopreservação de grãos de pólen de acessos do Banco de Germoplasma de mamão

¹Artigo a ser submetido à Revista Scientia Horticulturae

Criopreservação de grãos de pólen de acessos do Banco de Germoplasma de mamão

RESUMO: A conservação de grãos de pólen é importante para preservação de alelos, superar impasses como o florescimento assíncrono, hibridação e intercâmbio de germoplasma. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para realizar a criopreservação de grãos de pólen em acessos de mamoeiro para preservar alelos importantes da espécie *Carica papaya* L. que têm potencial para uso no programa de melhoramento genético. Foram coletadas anteras com grãos de pólen de flores hermafroditas, na antese, de 17 acessos do banco ativo de germoplasma de mamão. Para ensaios de desidratação, anteras inteiras foram desidratadas em três intervalos de tempo (1, 2 e 4 horas). O conteúdo de água do pólen foi determinado por meio da equação $U = [(Pu - Ps) / (Pu - Pt)] \times 100$, U= conteúdo de água presente nas amostras, Pu= peso úmido, Ps= peso seco (g), Pt= peso da tara (g). Para os ensaios de criopreservação, após a desidratação, as anteras com grãos de pólen foram embaladas em papel alumínio e colocadas em tubos criogênicos, que foram diretamente inseridos em nitrogênio líquido a -196°C por 24 horas. Para o teste de viabilidade *in vitro*, as anteras com grãos de pólen foram inoculadas em meio de cultura (BK 10% sacarose) à temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas quando foi medido o comprimento do tubo polínico. Além disso, foram realizados testes de viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen. Os resultados revelaram que o tratamento de desidratação mais adequado foi o de duas horas, com altos percentuais de germinação para a maioria dos acessos (CMF020 - 93,85%; CMF050 - 92,44%; CMF 123 - 90,67%; CMF 076 - 84,59%; CMF 060 - 82,32%; CMF 003 - 81,15%; CMF 129 - 76,97%; CMF 008 - 74,62%; CMF 005 - 73,46%; CMF 235 - 72,79%; CMF 115 - 71,42%; CMF 114 - 71,19%; CMF 028 - 66,83%; CMF 004 - 60,48%). O maior crescimento de tubos polínicos foi obtido com os acessos CMF 005 (0,64 mm); CMF 020 (0,64 mm); CMF 087 (0,65 mm); CMF 129 (0,77 mm); CMF 60 (0,78 mm); CMF 50 (1,03 mm); CMF 76 (1,11 mm). Os resultados da criopreservação demonstram que a técnica é eficiente para conservação do germoplasma, com altos percentuais de germinação *in vitro*, após o congelamento, dos seguintes acessos: CMF 020 (89,24%), CMF 123 (81,42%), CMF 050 (78,68%), CMF 003 (77,08%), CMF004 (75,92%), CMF 114 (73,94%), CMF 060 (72,73%), CMF008 (70,29%), CMF 115 (67,98%), CMF 076 (65,00%), CMF 028 (59,80%) e CMF 005 (52,71%) e CMF 235 (52,69%). Os testes *in vivo* mostraram uma taxa de pegamento efetiva após polinização em campo com o pólen criopreservado, considerando as três combinações de parentais realizadas, sendo observada a produção de frutos, sementes por fruto e viabilidade das mesmas acima de 80% de germinação. Os resultados deste trabalho subsidiam a formação de um criobanco de pólen de acessos de mamoeiro visando tanto a conservação de alelos, quanto seu uso no melhoramento genético.

Palavras-chave: *Carica papaya* L.; Conservação; Nitrogênio líquido

Cryopreservation of pollen grains of accessions from the Papaya Germplasm Bank

ABSTRACT: The conservation of pollen grains is important for the preservation of alleles and is an interesting alternative to overcome obstacles such as asynchronous flowering, hybridization and germplasm exchange. The objective of this work was to establish a protocol to perform the cryopreservation of pollen grains in papaya accessions to preserve important alleles of the species *Carica papaya* L. that have potential for use in the genetic improvement program. Anthers with pollen grains from hermaphrodite flowers were collected at the anthesis of 17 accessions from the active papaya germplasm bank. For the dehydration tests, the whole anthers were dehydrated in three time intervals (1, 2 and 4 hours). The pollen water content was determined using the equation $U = [(Pu - Ps) / (Pu - Pt)] \times 100$, U = water content present in the samples, Pu = wet weight, Ps = dry weight (g), Pt = tare weight (g). For the cryopreservation tests, after dehydration, the anthers with pollen grains were wrapped in aluminum foil and placed in cryogenic tubes, which were inserted directly into liquid nitrogen at -196 °C for 24 hours. For the *in vitro* viability test, the anthers with pollen grains were inoculated in culture medium (BK 10% sucrose) at a temperature of 27 ± 1 °C for 24 hours when the pollen tube length was measured. In addition, *in vivo* pollen grain viability tests were performed. The results showed that the most suitable dehydration treatment was two hours, with high percentages of germination for most accessions (CMF020 - 93.85%; CMF050 - 92.44%; CMF 123 - 90.67%; CMF 076 - 84.59%; CMF 060 - 82.32%; CMF 003 - 81.15%; CMF 129 - 76.97%; CMF 008 - 74.62%; CMF 005 - 73.46%; CMF 235 - 72.79%; CMF 115 - 71.42%; CMF 114 - 71.19%; CMF 028 - 66.83%; CMF 004 - 60.48%). The greatest growth of pollen tubes was obtained with accessions CMF 005 (0.64 mm); CMF 020 (0.64 mm); CMF 087 (0.65 mm); CMF 129 (0.77 mm); CMF 060 (0.78 mm); CMF 050 (1.03 mm); CMF 076 (1.11 mm). The cryopreservation results demonstrate that the technique is efficient for the conservation of germplasm, with high percentages of *in vitro* germination, after freezing, of the following accessions: CMF 020 (89.24%), CMF 123 (81.42%), CMF 050 (78.68%), CMF 003 (77.08%), CMF004 (75.92%), CMF 114 (73.94%), CMF 060 (72.73%), CMF008 (70.29%), CMF 115 (67.98%), CMF 076 (65.00%), CMF 028 (59.80%) and CMF 005 (52.71%) and CMF 235 (52.69%). The *in vivo* tests showed an effective rate of fruit formation, seeds per fruit and seed viability, after pollination with cryopreserved pollen, considering the three combinations of parentals performed. The results of this work support the formation of a cryobank of papaya accessions pollen aiming both the conservation of alleles and their use in genetic improvement.

Keywords: *Carica papaya* L.; Conservation; Liquid nitrogen.

1 INTRODUÇÃO

A base genética estreita e a suscetibilidade a pragas e doenças são desafios que impedem a expansão da cultura do mamoeiro (MOURA, 2012; OLIVEIRA, 2015) e demandam ações para tentar minimizar os impactos causados por esses fatores. A conservação e a caracterização de um germoplasma que tenha uma variabilidade representativa do gênero *Carica* é de extrema relevância para a sustentabilidade do cultivo e para a busca de soluções que podem variar ao longo do tempo, considerando, principalmente, as mudanças climáticas.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura conta com coleções em campo e banco de sementes estruturados para conservar o germoplasma do mamoeiro. Na conservação em campo, o Banco Ativo de Germoplasma de Mamão (BAG-Mamão) possui 121 acessos, com diferentes espécies: *Carica papaya* L., *Vasconcellea cauliflora*, *Vasconcellea quercifolia* e *Jaracatia spinosa*, e a conservação de sementes (classificadas como intermediárias), é feita por meio da estocagem de sementes em câmara fria (10°C) que são usadas a cada dois anos para a renovação do BAG-Mamão, funcionando como se fosse uma duplicata de segurança e que garante a manutenção da variabilidade genética.

Dentre as estratégias de conservação, a criopreservação é uma técnica promissora de armazenamento de material biológico em nitrogênio líquido (-196°C) que vem sendo bastante utilizada para conservação em longo prazo dos recursos genéticos vegetais (WANG et al., 2018; REN et al., 2019). Explantes como sementes, brotos inativos *in vivo*, brotos e outras estruturas *in vitro*, assim como grãos de pólen têm sido criopreservados com sucesso (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2017; WANG et al., 2018).

A conservação de grãos de pólen de mamoeiro é uma alternativa que deve ser considerada como estratégia complementar à conservação do germoplasma, já que se constitui em fonte útil de diversos alelos dentro do conjunto genético da espécie e, portanto, pode ser uma possibilidade eficaz para conservar a diversidade genética (VOLK, 2011). Além disso, o grão de pólen congelado pode ser usado em qualquer época do ano tornando-se uma ferramenta interessante para o melhoramento genético (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2017; REN et al., 2019; JIA et al., 2017).

A criopreservação de grãos de pólen tem sido adotada para várias espécies de importância econômica, como plantas ornamentais, espécies frutíferas, como em abacaxi (SILVA et al., 2017), abeto sérvio (BATOS; MILJKOVIC, 2019), bromélias (SOUZA et al., 2015), maçã (WANG et al., 2018), peônia (REN, 2019), azeitona (ELHOMOSANY; SAYED, 2015), Lichia (WANG et al., 2015), dentre outros.

Em mamoeiro, o primeiro relato de criopreservação de pólen foi em 1986 por Ganeshan que preservou o pólen de *Carica papaya* L. e *Carica cauliflora* L. A germinação foi obtida em meio de cultura contendo apenas sacarose e ágar por 7, 30, 60, 90, 180, 365 e 485 dias e descobriu-se após o congelamento que é possível conservar grãos de pólen das espécies estudadas por períodos prolongados, quanto as polinizações em campo do pólen criopreservado, o autor também relatou a presença de frutos e sementes bem sucedidas. Esses estudos, apesar de promissores foram conduzidos com poucos materiais, não permitindo uma aplicação mais ampla para a cultura.

Segundo Ren et al. (2019) e Souza et al. (2015), para desenvolver um protocolo eficiente em estudos envolvendo a criopreservação, o grau de umidade (conteúdo de água) é um fator fundamental. Assim, reduzir o conteúdo de água congelável do pólen em um nível possível para expor ao nitrogênio líquido, assegura a integridade do explante no momento do congelamento e evita a formação de cristais de gelo e a ruptura celular (SOUZA et al., 2015).

É necessário ressaltar, que a criopreservação de grãos de pólen não deve substituir outras estratégias de conservação já existentes, mas pode ser empregada como uma estratégia alternativa para conservação de características de interesse econômico. Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para realizar a criopreservação de grãos de pólen em acessos de mamoeiro para preservar alelos importantes da espécie *Carica papaya* L. e assegurar uma forma complementar de conservação de germoplasma do gênero.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, durante os meses de maio de 2019 a março de 2020. Os acessos utilizados pertencem ao BAG-Mamão da Embrapa.

Para realizar o trabalho de criopreservação foram coletadas flores hermafroditas que estavam no período da antese, de 17 acessos do BAG-Mamão (Tabela 1), por volta de 7:30 horas.

Tabela 1. Descrição dos acessos estudados do Banco ativo de germoplasma de Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Cód. Local	Nome científico	Nome comum	Origem	Grupo
CMF003	<i>C. papaya</i> ¹ L.	DCG423-5	Taiwan	Formosa
CMF004	<i>C. papaya</i> L.	DCG424-4	Havaí	Formosa
CMF005	<i>C. papaya</i> L.	Solo Linha IX	Havaí	Solo
CMF008	<i>C. papaya</i> L.	DCG593-10	Malasia	Formosa
CMF020	<i>C. papaya</i> L.	DCG424-4 x 439	x	Formosa
CMF028	<i>C. papaya</i> L.	DCG439	Costa Rica	Formosa
CMF050	<i>C. papaya</i> L.	S7	Brasil	Solo
CMF060	<i>C. papaya</i> L.	Sunrise Cross 2	Havaí	Formosa
CMF076	<i>C. papaya</i> L.	Manga-Mourão	x	Formosa
CMF082	<i>C. papaya</i> L.	Hortus Gold	África do Sul	Solo
CMF087	<i>C. papaya</i> L.	Waimanalo	x	Solo
CMF114	<i>C. papaya</i> L.	SEED1216	África do Sul	Solo
CMF115	<i>C. papaya</i> L.	SEED1250	África do Sul	Formosa
CMF123	<i>C. papaya</i> L.	Vermelho Thai	Tailândia	Solo
CMF129	<i>C. papaya</i> L.		Brasil	Formosa
CMF188	<i>C. papaya</i> L.	FRF1436	Brasil	Formosa
CMF235	<i>C. papaya</i> L.	-JTA	Brasil	Solo

¹ *Carica papaya* L.

2.1 Desidratação dos grãos de pólen

Para os ensaios de desidratação foram utilizadas anteras inteiras. Para a tolerância à desidratação do pólen dos acessos de mamão foi utilizada a desidratação em sílica gel. As anteras foram desidratadas em envelopes abertos de papel alumínio e foram submetidas à exposição por diferentes períodos (1,2 e 4 horas).

Determinou-se a umidade do grão de pólen para todos os tratamentos, adotando a mesma metodologia utilizada para determinação do grau de umidade de sementes (BRASIL, 2009).

As anteras com os grãos de pólen foram colocadas para germinar em meio de cultura após a desidratação.

O delineamento experimental utilizado para o ensaio de desidratação foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 17 (intervalos de desidratação x

acessos) com três repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

2.2 Criopreservação de grãos de pólen

Após a desidratação nos diferentes períodos, as anteras com os grãos de pólen foram envelopadas pelos recortes de papel alumínio, e colocadas em tubos criogênicos (3 mL) que foram diretamente preservados em nitrogênio líquido a -196°C por 24 horas. Após este tempo, as anteras foram novamente distribuídas em meio de cultura para testar sua viabilidade *in vitro* após congelamento.

A percentagem de germinação foi estabelecida pela contagem de todos os grãos de pólen presentes na placa de Petri, germinados e não germinados. Foi também avaliado o comprimento dos tubos polínicos, a partir da medida aleatória de vinte tubos em cada placa, totalizando 60 tubos polínicos em cada acesso avaliado, sendo identificados como germinados os grãos de pólen que apresentaram o tubo polínico com tamanho semelhante ou superior aos grãos de pólen.

O delineamento experimental utilizado para o ensaio de criopreservação foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3×17 (intervalos de desidratação x acessos) com três repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri.

2.3 Germinação *in vitro* dos grãos de pólen

Foi utilizado o meio de cultura BK (BREWBACKER; KWACK, 1963) com 10% de sacarose e contendo: H_3BO_3 (0,01%); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,03%); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%); KNO_3 (0,01%); sacarose (10%); ágar (0,5%); pH 6,5. Este meio de cultura foi escolhido com base no estudo de Ferreira (2018) que concluiu sua eficiência para a germinação *in vitro* de grãos de pólen em acessos de mamoeiro.

Os grãos de pólen foram inoculados no meio de cultura com auxílio de um pincel, cobertos com papel alumínio e armazenados em câmara climatizada em temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Depois desta etapa o experimento foi microfotografado em estereomicroscópio Leica EZDA (Leica, Wetzlar, Alemanha). Corados com azul de

toluidina (0,05%), o uso deste corante mancha a parede celular das células vegetais. (O'BRIEN, FEDER, MCCULLY, 1964).

A percentagem de germinação foi estabelecida pela contagem de todos os grãos de pólen presentes na placa de Petri, germinados e não germinados. Foi também avaliado o comprimento dos tubos polínicos, a partir da medida aleatória de vinte tubos em cada placa, totalizando 60 tubos polínicos em cada acesso avaliado, sendo identificados como germinados os grãos de pólen que apresentaram o tubo polínico com tamanho semelhante ou superior aos grãos de pólen.

2.4 Teste de viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen

Para realização de estudos de viabilidade *in vivo* foram realizadas três polinizações entre os acessos estudados do BAG-Mamão. Os grãos de pólen dos acessos CMF 115, CMF 235 e CMF 082, conservados em nitrogênio líquido foram usados como parental masculino. Como parental feminino, foram selecionados no BAG-Mamão os acessos descritos a seguir: CMF 256, CMF 188 e CMF 128.

No período de floração, as flores das plantas receptoras foram protegidas na pré-antese, sendo depois emasculadas, isto é, suas anteras foram retiradas e logo em seguida foram inseridas no estigma da flor, com auxílio de um pincel as anteras com os grãos de pólen descongelados que foram preservados em nitrogênio líquido. O descongelamento ocorreu no momento em que as anteras foram retiradas do nitrogênio líquido e levadas em placa de petri até o BAG-Mamão.

Depois das polinizações, as flores foram novamente protegidas para evitar que ocorressem polinizações por insetos. Para concluir esta etapa, as flores foram identificadas com o número do tratamento e a data de realização da polinização. Após a realização dos cruzamentos esperou-se um período de 4 a 5 meses para colher os frutos maduros. No período de amadurecimento dos frutos foi realizado o teste de germinação com suas sementes, colocadas em caixa Gerbox sobre papel germitest umedecido com água destilada.

2.5 Análise estatística dos dados

Os dados do ensaio de desidratação e de criopreservação foram submetidos ao teste F da análise de variância considerando o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. As médias dos acessos foram agrupados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e as médias dos intervalos de desidratação foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desidratação dos grãos de pólen

Para todos os acessos foi registrada uma redução significativa do conteúdo de água à medida que se aumentou o tempo de desidratação. No tempo de desidratação de 1 hora, o conteúdo de água variou de 79,82 a 87,82%, em 2 horas a amplitude foi de 24,23% a 30,76% e para 4 horas variou de 11,07 a 13,72 %. Dentro de cada tempo de desidratação os acessos mostraram diferenças significativas entre si em relação a capacidade de perder água (Tabela 2). O tempo de desidratação considerado mais adequado foi o de 2 horas, já que associado aos conteúdos de água registrados para este tratamento observou-se também os mais altos percentuais de germinação *in vitro*, após 24 horas em meio de cultura, para a maioria dos acessos (Tabela 2). Mais de 70% dos acessos avaliados, deste tratamento, tiveram taxas de germinação acima de 70% com valores que variaram de 35% a 92% entre os acessos. Alguns autores relatam que o conteúdo de água de grãos de pólen para criopreservação deve estar em torno de 30%, a semelhança do que foi encontrado neste trabalho, com 2 horas de desidratação, e próximo ao que foi obtido para bromélias e abacaxi (Souza et al., 2015; Silva et al., 2017) e Jia et al. (2017), em espécies ornamentais como rosas, xantoceras e glícinia reduziram o conteúdo de água a 20,56%, 28,34%, 26,55%, respectivamente.

As diferenças observadas na germinação *in vitro* são mais marcantes ao se comparar os tratamentos de 1h e 2h com a desidratação de 4 horas, onde o baixo conteúdo de água acaba por comprometer a viabilidade polínica.

Em relação ao comprimento de tubo polínico os maiores valores observados foram para os acessos CMF 050 e CMF 076 no tempo de 2 horas de desidratação, com 1,03 mm e 1,11 mm, respectivamente, enquanto o valor mais baixo foi registrado para o acesso CMF 114 com a desidratação de 1 hora (0,12 mm). Comparando-se os 3 tempos de desidratação, os maiores comprimento de tubos polínicos para a maioria dos acessos, foram registrados em 2 horas de desidratação. Os valores registrados para essa variável confirmam que o tempo de 4 horas de desidratação influencia de forma negativa no crescimento do tubo polínico, a semelhança do que ocorre com a germinação, mas valores muito baixos foram obtidos também nos outros tratamentos, a depender do acesso, reforçando a influência do genótipo na resposta aos tratamentos.

A retirada de água de um tecido a ser criopreservado é uma das etapas iniciais que deve ser avaliada e por isso, os ensaios de desidratação para o pólen e sua posterior viabilidade são tão relevantes (ALBA et al., 2011; SOUZA et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Saber até onde se pode retirar água congelável sem comprometer a estrutura que deverá ser funcional após a criopreservação é fundamental para o sucesso da metodologia. A maioria das espécies tem grande quantidade de água intracelular e são muito sensíveis a danos no momento do congelamento (KULUS; ZALEWSKA, 2014).

A formação de cristais de gelo por excesso de água no tecido causa a morte celular por injúrias físicas e mecânicas (BENSON, 2008). Souza et al. (2015) em análises microscópicas, reforçam que a desidratação é uma etapa importante, sendo imprescindível para se obter resultados bem sucedidos. Em grãos de pólen de *Aechmea biocolor* estes autores observaram que sem a etapa da desidratação, o armazenamento em nitrogênio líquido causa formação de cristais de gelo e degradação do conteúdo citoplasmático.

O tempo de desidratação ideal vai variar de acordo com o método, com a espécie e a estrutura a ser desidratada. Para a criopreservação de pólen do abacaxi é necessário um tempo de 6 horas em sílica gel para se atingir as condições ideais (SILVA et al., 2017). Já para algumas bromélias o tempo de 3 horas, também em sílica, é suficiente (SOUZA et al., 2015). Essas diferenças marcantes entre espécies da mesma família, como o exemplo citado acima, podem estar relacionadas com o tamanho e a morfologia polínica (SOARES et al., 2015). Em mamão, um trabalho

realizado por Ferreira (2018) não mostrou variações significativas no tamanho e quantidade de pólen por antera de 10 acessos de mamoeiro.

Tabela 2. Conteúdo de água, porcentagem de germinação *in vitro* e comprimento de tubo polínico dos grãos de pólen de diferentes acessos de *Carica papaya* L. oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Acessos	Tempo		
	1h	2h	4h
Conteúdo de água (%)			
CMF003	83,27 cA	27,49 bB	11,82 bC
CMF004	81,46 dA	24,54 cB	11,21 bC
CMF005	80,62 dA	24,53 cB	12,77 aC
CMF008	85,40 bA	24,26 cB	12,82 aC
CMF020	79,82 dA	26,82 bB	11,92 bC
CMF028	86,32 bA	28,37 aB	12,65 aC
CMF050	82,91 cA	26,87 bB	13,19 aC
CMF060	82,42 cA	24,23 cB	11,03 bC
CMF076	81,05 dA	25,92 bB	11,76 bC
CMF082	85,48 bA	30,76 aB	12,93 aC
CMF087	86,18 bA	30,47 aB	12,93 aC
CMF114	87,82 aA	29,91 aB	12,92 aC
CMF115	85,38 bA	30,55 aB	13,72 aC
CMF123	80,44 dA	31,95 aB	11,77 bC
CMF129	82,47 cA	30,69 aB	11,07 bC
CMF188	-	-	-
CMF235	-	-	-
CV(%)			2,36
Germinação <i>in vitro</i> (%)			
CMF003	79,89 aA	81,15 bA	25,69 aB
CMF004	48,24 cA	60,48 cA	19,51 aB
CMF005	65,56 bA	73,46 bA	20,46 aB
CMF008	61,53 bB	74,62 bA	15,67 aC
CMF020	84,28 aB	93,85 aA	18,24 aC
CMF028	71,23 bA	66,83 bA	21,18 aB
CMF050	69,55 bB	92,44 aA	18,50 aC
CMF060	71,78 bA	82,32 bA	18,94 aB
CMF076	68,91 bB	84,59 aA	21,81 aC
CMF082	10,70 dB	34,83 dA	16,10 aB
CMF087	36,85 cA	45,36 dA	11,16 aB
CMF114	55,59 bA	71,19 bA	17,27 aB
CMF115	72,90 bA	71,42 bA	11,39 aB
CMF123	83,60 aA	90,67 aA	17,83 aB
CMF129	70,00 bA	76,97 bA	17,09 aB
CMF188	37,33 cB	51,63 cA	17,92 aC
CMF235	61,57 bA	72,79 bA	11,69 aB
CV(%)			9,85

Comprimento do tubo polínico (mm)			
CMF003	0,47 dA	0,50 eA	0,53 bA
CMF004	0,23 gB	0,30 gB	0,40 cA
CMF005	0,85 aA	0,64 dC	0,74 aB
CMF008	0,51 dA	0,39 fB	0,57 bA
CMF020	0,80 aA	0,64 dB	0,70 aB
CMF028	0,35 eA	0,32 gA	0,19 eB
CMF050	0,25 fB	1,03 aA	0,18 eB
CMF060	0,68 bB	0,78 bA	0,64 aB
CMF076	0,76 bB	1,11 aA	0,67 aB
CMF082	0,28 fB	0,36 fA	0,23 dB
CMF087	0,55 cA	0,65 dA	0,61 aA
CMF114	0,12 gC	0,48 eA	0,27 dB
CMF115	0,18 gB	0,31 gA	0,26 dA
CMF123	0,27 fB	0,52 eA	0,28 dB
CMF129	0,59 cB	0,77 cA	0,48 bC
CMF188	0,37 eA	0,29 gA	0,27 dA
CMF235	0,19 gC	0,32 gB	0,65 aA
CV(%)			32,12

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Criopreservação de grãos de pólen

Os resultados de criopreservação mostraram que os grãos de pólen de mamão dos acessos estudados, nas condições estabelecidas, toleraram o congelamento, desde que desidratados adequadamente. Foram obtidos altos percentuais de germinação *in vitro* após 24 horas em nitrogênio líquido (-196°C), (Tabela 4; Fig. 1 A, B, C e D) no tratamento de 2 horas de desidratação, confirmando os resultados obtidos no ensaio anterior.

Os valores obtidos no tratamento de 1 hora e no de 4 h, mostram que tanto o excesso de água, quanto sua falta nos tecidos, afetam de forma significativa e negativa a viabilidade do grão de pólen para todos os acessos avaliados. Em ambos os tratamentos, os baixos valores obtidos de germinação para todos os acessos, que se comportaram de forma igual, deixam evidente que não devem ser recomendados como tratamentos prévios ao congelamento. Uma diferença que chama atenção é no tratamento de 1 hora, que mostra valores muito inferiores ao que foi registrado no ensaio de desidratação (Tabela 4), mostrando o quanto a presença de água congelável é danosa para o tecido pela formação de cristais de gelo. Por outro lado,

o excesso de desidratação pode dificultar a atividade fisiológica do pólen e fazer com que as células sofram danos e reduzam a viabilidade, como evidenciado através do tratamento de 4 horas (BENSON, 2008).

O tratamento de 2 h foi o que mostrou resultados que podem ser considerados satisfatórios para a criopreservação de grãos de pólen de mamoeiros, com apenas 1 acesso, CMF 188, com germinação abaixo de 40%. Dentro deste tempo de desidratação, as maiores taxas de germinação foram obtidas nos acessos CMF 003, CMF 004, CMF 008, CMF 020, CMF 050, CMF 060, CMF 076, CMF 114, CMF 115, CMF 123 (valores entre 65% a 89%). Esses valores são similares aos que foram encontrados por Aseef et al. (2021) com uma variação de 68,45% a 92,31% entre as cinco variedades avaliadas: Co 7, TNAU Papaya Co 8, Pusa Nanh, *Vasconcellea cauliflora* e *Vasconcellea candamarcensis*. A mais baixa taxa de germinação, neste tratamento, foi registrada para o acesso CMF188, com 26,31% (Tabela 4).

Em relação a viabilidade, Moura (2012) relata alta, média e baixa viabilidade para três genótipos elite de mamoeiro - Sunrise Solo 72/12, JS 12, e o híbrido UENF/CALIMAN, (Tabela 3).

Tabela 3. Viabilidade alta, média e baixa em três genótipos elite de mamoeiro.

Genótipos	Tamanhos		
	Alta	Média	Baixa
Uenf/Caliman 01	> 89	73 a 89	<26
JS 12	>87	74 a 87	<39
SS 72/12	>91	78 a 91	<42

A medida de viabilidade polínica *in vitro* vem sendo usada para subsidiar e aferir vários tipos de pesquisa, que vão desde a conservação de grãos de pólen (SOUZA et al., 2015; AHMED et al., 2017; SILVA et al., 2017; SOARES et al., 2015) até estudos voltados para fenologia de florescimento e melhoramento genético (SALVATIERRA-GONZALES; JANA-AYALA, 2016; ASEEF et al., 2021). Esses trabalhos deixam evidente que essa viabilidade depende de uma série de fatores, como os componentes do meio de cultivo, mas também das condições da planta doadora, que por sua vez têm forte influência devido as condições de cultivo em campo e as condições edafo-climáticas. No caso dos ensaios de criopreservação de grãos de pólen é preciso ir além dessa medida e sem a comprovação da fertilização *in vivo* os

resultados obtidos podem não ser conclusivos e direcionar para uma conclusão equivocada comprometendo o objetivo de conservação daqueles alelos.

A medição do comprimento do tubo polínico é uma forma complementar de avaliar o comportamento do grão de pólen frente a determinado tratamento. Os resultados apresentados desta variável mostram um comportamento similar quando se compara os três tempos de desidratação, ou seja, o tempo de 2 horas apresenta tubos polínicos significativamente maiores, para todos os acessos avaliados, quando comparado aos outros tratamentos (Tabela 4). No entanto, uma variação grande é observada dentro do tratamento de 2 h, em relação ao comportamento dos acessos, com 9 grupos separados por diferenças significativas, mostrando um forte efeito dos genótipos em relação a esse aspecto. Os maiores valores foram encontrados para os acessos CMF 050 (0,85 mm) e CMF 076 (0,82 mm) enquanto o menor valor foi registrado em CMF 235 (0,24 mm). Os estudos de Ren et al. (2019) supõem que esta diferença entre os genótipos pode ser resultado de variações no conteúdo de água que cada genótipo obteve após desidratação.

O tubo polínico atua como um canal para transportar as células do gameta masculino do grão de pólen - do estigma (nas plantas com flores) para os óvulos na base do pistilo ou diretamente através do tecido do óvulo em algumas gimnospermas e por isso, sua importância na eficiência da fecundação. O comportamento dessa estrutura *in vitro* não permite fazer inferências conclusivas sobre o êxito de uma hibridação, mas pode ser um indicador do quanto o grão de pólen pode ser afetado pelo congelamento em NL.

A germinação *in vitro*, embora forneça um sistema experimental controlado, não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*, ocorrendo interações entre a composição do meio de cultura e diferentes tipos de diferentes materiais vegetais. No entanto, de acordo com Soares et al. (2008), a técnica de germinação *in vitro* produz resultados que podem se aproximar do crescimento que ocorre durante a germinação *in vivo*, demonstrando assim a importância de se ter condições adequadas para cada espécie em estudo.

Tabela 4. Porcentagem de germinação *in vitro* e comprimento do tubo polínico de grãos de pólen criopreservados de diferentes acessos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) em diferentes tempos de desidratação.

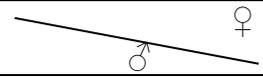
Acessos	Tempo		
	1h	2h	4h
<i>Germinação in vitro (%)</i>			
CMF003	17,60 aB	77,08 aA	14,73 aB
CMF004	16,32 aB	75,92 aA	14,76 aB
CMF005	11,38 aB	52,71 bA	15,37 aB
CMF008	12,31 aB	70,29 aA	15,29 aB
CMF020	10,95 aB	89,24 aA	16,40 aB
CMF028	15,83 aB	59,80 bA	22,72 aB
CMF050	11,56 aB	78,68 aA	17,65 aB
CMF060	13,37 aB	72,73 aA	21,05 aB
CMF076	14,91 aB	65,00 aA	21,90 aB
CMF082	10,20 aA	40,81 bA	25,60 aA
CMF087	12,03 aC	46,79 bA	28,14 aB
CMF114	15,72 aB	73,94 aA	15,25 aB
CMF115	12,51 aB	67,98 aA	20,65 aB
CMF123	11,59 aB	81,42 aA	25,49 aB
CMF129	13,43 aB	47,30 bA	20,43 aB
CMF188	13,66 aA	26,31 cA	17,37 aA
CMF235	12,08 aB	52,69 bA	18,77aB
CV (%)			18,46
<i>Comprimento do tubo polínico (mm)</i>			
CMF003	0,22 bB	0,54 eA	0,12 aC
CMF004	0,20 cB	0,37 hA	0,13 aC
CMF005	0,18 cB	0,33 iA	0,08 aC
CMF008	0,22 bB	0,45 fA	0,08 aC
CMF020	0,27 aB	0,65 cA	0,09 aC
CMF028	0,17 cB	0,47 fA	0,08 aC
CMF050	0,25 aB	0,85 aA	0,07 aC
CMF060	0,23 bB	0,63 cA	0,08 aC
CMF076	0,24 aB	0,82 aA	0,08 aC
CMF082	0,17 cB	0,44 fA	0,08 aC
CMF087	0,26 aB	0,58 dA	0,11 aC
CMF114	0,10 dB	0,41 gA	0,10 aB
CMF115	0,10 dB	0,31 iA	0,09 aB
CMF123	0,17 cB	0,44 fA	0,13 aB
CMF129	0,21 bB	0,76 bA	0,09 aC
CMF188	0,19 cB	0,40 gA	0,10 aC
CMF235	0,09 dB	0,24 jA	0,10 aB
CV (%)			24,69

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Crio-Criopreservação

3.3. Polinização *in vivo*

Os resultados obtidos com as polinizações *in vivo* realizadas com grãos de pólen criopreservados mostram êxito nas três combinações realizadas, com a produção de frutos e de sementes viáveis nos frutos obtidos (Tabela 5, Figura 1 E). Aproximadamente 80% das sementes germinaram, nas diferentes combinações (Figura 1 F). O maior número de sementes foi registrado na polinização entre os acessos CMF 115 como parental masculino e o CMF 256 como parental feminino, com 600 sementes. Os acessos CMF 082, CMF 115 e CMF 235 como parentais masculinos formaram sementes em todas polinizações realizadas (Tabela 5).

Tabela 5. Frutos e sementes geradas após polinizações com *Carica papaya* L. com grãos de pólen criopreservados.

	CMF 115	CMF 235	CMF 082
CMF 256	1/600	-	-
CMF 188	-	1/100	-
CMF 128	-	-	1/500

Número de polinizações/ Número de sementes geradas.

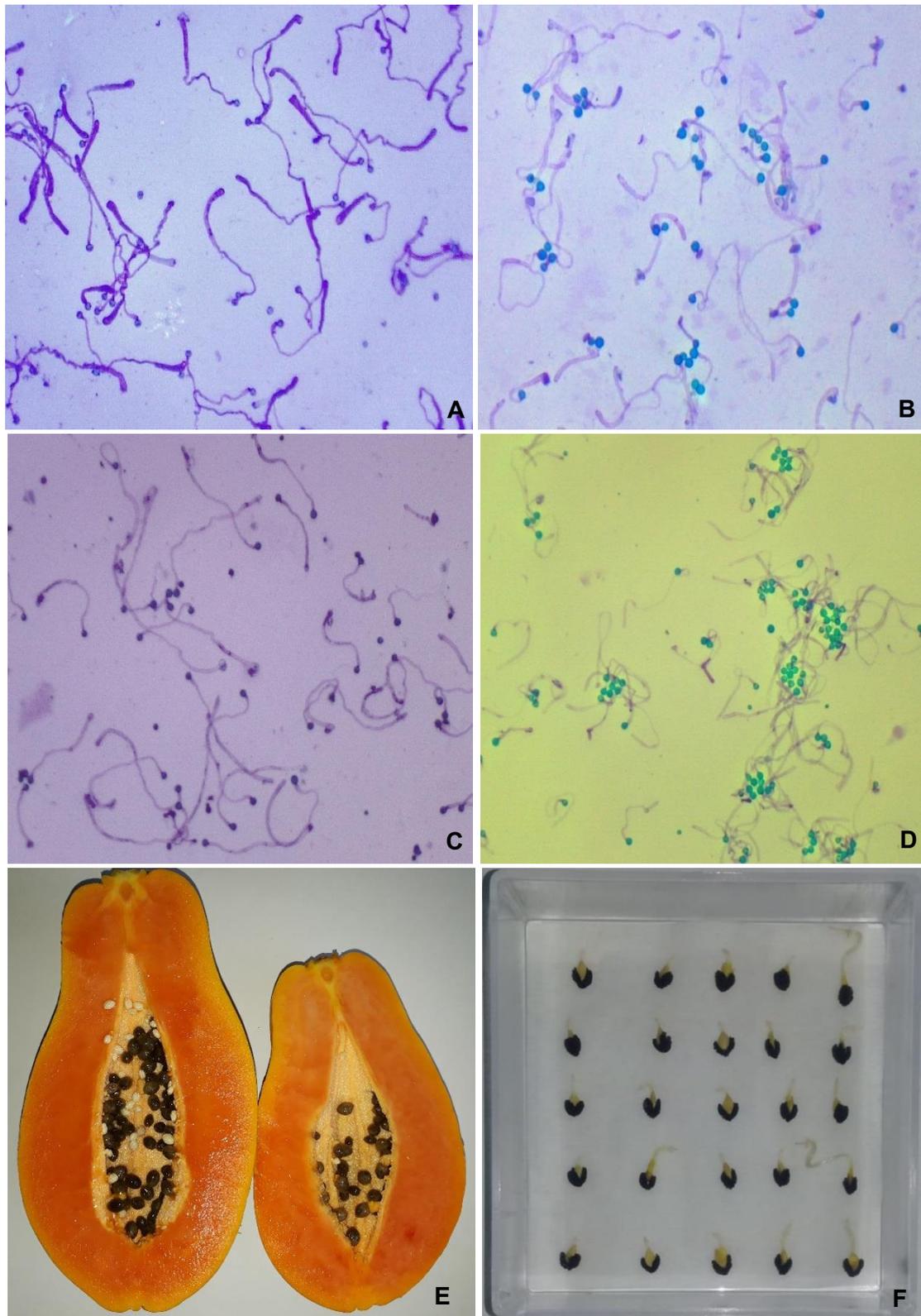


Figura 1. Germinação de grãos de pólen *in vitro* cultivados em meio de cultura BK (BREWBAKER; KWACK, 1963) com 10% de sacarose nos acessos CMF-060 (A), CMF-115 (B), CMF- 003 (C) e CMF- 114 (D) do Banco Ativo de Germoplasma de Mamão da Embrapa Mandioca e Fruticultura. E) Frutos com sementes provenientes de polinizações com grãos de pólen criopreservados. F) Germinação de sementes

provenientes do cruzamento com grãos de pólen criopreservados do acesso CMF-128 com o acesso CMF-082.

O teste de viabilidade *in vivo* é o que permite fazer inferências mais conclusivas sobre a metodologia empregada e os resultados mostram que os grãos de pólen criopreservados de acessos de mamoeiro mantêm sua viabilidade quando criopreservados. A formação de sementes e o teste de viabilidade das mesmas é crucial para tirar conclusões sobre a eficiência do protocolo e sua utilidade para o melhoramento genético.

A criopreservação de grãos de pólen foi bem sucedida em várias espécies de importância econômica. Silva et al. (2017) descobriram que após 4 meses o pólen de abacaxi manteve sua viabilidade acima de 40% para alguns acessos. Souza et al. (2015) observaram que a viabilidade do pólen de bromélias foi mantida a 87% por um ano. Batos e Miljkovic (2019) descobriram que após 14 anos de conservação espécies de abeto sêrvio (*Picea omorika*) mantinham 40% dos grãos de pólen viáveis. Elhomosany e Sayed (2015) aplicaram a técnica em azeitona (*Olea europaea* L.) obtendo a viabilidade de 91,87% após 3 meses de armazenamento. Tendência semelhante foi observada por Araújo et al. (2020) em espécies de Tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) por 9 meses o pólen permaneceu estável e obtiveram resultados satisfatórios.

O tempo de imersão em nitrogênio líquido (NL) testado neste trabalho foi de 24 h e parece suficiente para fazer inferências no que se refere à conservação dos grãos de pólen. Ganeshan (1986) testou 7 tempos de imersão diferentes em grãos de pólen de duas cultivares de mamoeiro e não encontrou diferenças significativas na viabilidade polínica, nem entre as cultivares, nem entre os tempos de conservação. Outros trabalhos testaram diferentes tempos de imersão em NL a fim de avaliar se existe perda de viabilidade ao longo do tempo de criopreservação. Silva et al. (2017) preservou grãos de pólen de abacaxi por 24h, 60 dias e 120 dias em NL e não observou diferenças significativas na viabilidade entre os três períodos de conservação. Souza et al. (2015) conservaram pólen por 1h, 24h, 8 dias, 30 dias, 6 meses e 1 ano e os grãos de pólen se mantiveram estáveis, sem diferenças significativas nos diferentes tempos de conservação. Dinato et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes quando conservaram pólen do capim-bahia (*Paspalum notatum* Flüggé) por 24h, 10, 60, 120 e 180 dias e confirmam que a conservação do

pólen por apenas 24h apresenta respostas similares da viabilidade do pólen conservados a longo prazo. Essa estabilidade ao longo do tempo confirmam a teoria da parada do metabolismo poucas horas após a conservação em nitrogênio líquido (LAMBARDI et al., 2008)

As polinizações *in vivo* foram realizadas para consolidação da viabilidade do pólen após a conservação em NL. Os resultados registraram a frutificação e formação de sementes viáveis. Esses resultados validam que a estratégia de conservação manteve a viabilidade e integridade dos grãos de pólen. Eles foram similares aos estudos de Souza et al. (2015) com espécies de bromélias com produção de frutos em 100% das flores polinizadas e 88% das sementes germinaram. Silva et al. (2017) em espécies de abacaxi que obtiveram 75% das polinizações realizadas com sementes viáveis. Vendrame et al. (2008) em espécies de orquídeas obtiveram 80% das polinizações realizadas com sementes viáveis. Dinato et al. (2018) realizaram polinizações com pólen de capim-bahia, gênero *Paspalum*, e alcançaram sucessos nas hibridações, afirmando ser um método confiável para avaliar a viabilidade, além de proporcionar a melhoristas de plantas, uma maneira para superar impasses como o florescimento assíncrono.

São escassos os trabalhos sobre a criopreservação de grãos de pólen em mamoeiro e contemplam poucas cultivares (GANESHAN, 1986). Os resultados desta pesquisa foram obtidos a partir da avaliação de 17 acessos do gênero *Carica* que são acessos de um banco de germoplasma que é a base de um programa de melhoramento genético de mamoeiro.

Os resultados deste estudo indicam que a criopreservação de grãos de pólen pode ser uma estratégia complementar promissora de conservação de alelos de germoplasma de mamoeiros. A técnica pode ser de grande valia tanto para o melhoramento genético, quanto para superar barreiras de assincronia de florescimento.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.; RATTANPAL, H.S.; AHMAD E.; SINGH G. 2017. Influence of Storage Duration and Storage Temperature on In- Vitro Pollen Germination of Citrus Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 5, p. 892-902, 2017.
- ALBA, V.; BISIGNANO, V.; ALBA, E.; STRADIS, A.; POLIGNANO, G. B. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 7, p. 977-982, 2011.
- ALMEIDA, C.; AMARAL, A.L.; BARBOSA, J.F.; NETO, J.F.B.; SERENO, M.J.C.M. Conservation and in vitro germination of pollen of maize (*Zeamays* subsp. *mays*). **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 4, p. 493-497, 2011.
- ARAÚJO, A. C.; LÉDO, A. S.; POLEK, M.; KRUEGER, R.; SHEPHERD, A.; VOLK, G. M. Optimization of in vitro germination and cryopreservation conditions for preserving date palm pollen in the USDA national plant germplasm system. **Plant cell, tissue, and organ culture**, v. 144, p. 223-232, 2020.
- ASEEF, R.M., SOORIANATHASUNDARAM, K., PARAMAGURU, P., MUTHULAKSHMI, P., JOEL, A. J.; CHANDRASEKHAR, C. N. An Analysis of Pollen Parameters, Fruit Set and Fruit Development During Attempts on Intergeneric Hybridization of Papaya (*Carica papaya* L.). **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 74-86, 2021.
- BATOS, B.; MILJKOVIC, D. The vitality of the Serbian spruce (*Picea omorica*) pollen during the long-term cryopreservation. **Journal Grana**, v. 58, n. 6, p. 433-446, 2019.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed). **Plant cryopreservation**. A practical guide. New York: Springer, 2008, p. 15-32.
- BRASIL, **Regras Para Análises De Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília-DF, Brasil. 2009.
- BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, v. 50, p. 859-865, 1963.
- DINATO, N. B.; SANTOS, I. R. I.; LEONARDECZ, E.; BURSON, B. L.; QUARIN, C. L.; PAULA, F.; FAVERO, A. P. Storage of Bahiagrass pollen at different temperatures. **Crop Science**, v. 58, p. 2391-2398, 2018.
- ELHOMOSANY, A. A.; SAYED, H. A. E. Effect of low temperature and cryopreservation on in vitro pollen germination of some Olive cultivares. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 15, n. 9, p. 1803-1808, 2015.
- FERREIRA, J. A. B. **Aspectos da biologia floral e reprodutiva de diferentes acessos de mamoeiro**. 2018. p. 1-91. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- GANESHAN S. Criogenic preservation of papaya pollen. **Scientia Horticulturae**, v. 28, p. 65-70, 1986.
- JIA, M. X.; SHI, Y.; DI, W.; JIANG, X. R.; XU, J.; LIU, Y. ROS-induced oxidative stress is closely related to pollen deterioration following cryopreservation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 433-439, 2017.

- KULUS, D.; ZALEWSKA M. Cryopreservation as a tool used in longterm storage of ornamental species – a review. **Scientia Horticulturae**. v. 168, p. 88-107. 2014
- LAMBARDI M, OZUDOGRU A, BENELLI C. Cryopreservation of Embryogenic cultures. In: REED, B.M (ed). **Plant Cryopreservation, a practical guide**. Springer, New York, p 177-194, 2008.
- MOURA, H. C. P. **Caracterização da fenologia reprodutiva e da viabilidade gamética associada ao tamanho do botão floral em genótipos elite de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2012. p1-50. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**. v. 59, p. 368-373, 1964.
- OLIVEIRA, G. A. F. **Identificação, caracterização e validação de marcadores minissatélites para o mamoeiro**. 2015. p. 1-88. Dissertação (Mestrado em Recursos genéticos vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.
- REN, R.; LI, Z.; LI, B.; XU, J.; JIANG, X.; LIU, Y.; ZHANG, K. Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. **Elsevier**, v. 89, p. 14-20, 2019.
- SALVATIERRA-GOZÁLEZ, M.A.; JANA-AYALA, C. Floral expression and pollen germination ability in productive mountain papaya (*Vascocellea pubescens* A.DC.) orchards. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 2, p. 136-142, 2016.
- SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; VIEIRA L. J.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. **Scientia horticulturae**, v. 219, p. 326-334, 2017.
- SOARES, T. L.; SOUZA, E. H.; CARVALHO, M. A. P.; OLIVEIRA, S.; SANTOS SEREJO, J. A. Viability of pollen grains of tetraploide banana. **Bragantia**, v. 75, p. 145-151, 2015.
- SOARES, T. L.; SILVA, S. O.; COSTA, M. A. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; LINO, L. S. M.; SOUZA, E. H.; JESUS, O. N. Germinação *in vitro* e viabilidade de grãos de pólen de diplóides de bananeira. **Crop Breeding and applied biotechnology**, v. 8, p. 111-118, 2008.
- SOUZA, E. H., SOUZA, F.V.D., ROSSI, M. L., BRANCALLEÃO, N., LEDO, C. A. S., MAERTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea biocolor* (Bromeliaceae) pollen grains, na endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, p. 13-28, 2015.
- VOLK, G.M. Collecting pollen for genetic resources conservation. In: GUARINO, L.; RAMANATHA, V.R.; GOLDBERG, E. (Eds) **Collecting plant genetic diversity: technical guidelines**. Bioversity International, Rome, pp 1–10, 2011. Disponível em: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=654. Acesso: Jun-2021.
- VENDRAME, W.; CARVALHO, V. S.; DIAS, J. M. M.; MAGUIRE, I. Pollination of *Dendroium* hybrids using cryopreserved pollen. **HortScience**, v. 43, p. 264-267, 2008.

WANG, L.; WU, J.; CHEN, J.; FU, D.; ZHANG, C.; CAI, C.; OU, L. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 78-83, 2015.

WANG, M. R.; LONGO, C.; SILVA, J. A. T.; VOLK, G.M.; WANG, Q. C. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 689-709, 2018.

ZHANG, J. M.; LU, X. X.; XIN, X.; YIN, G. K.; HE, J. J.; HUANG, B.; JIANG, D.; CHEN, X. L. Cryopreservation of citrus anthers in the national crop genebank of China. **In Vitro Cellular e Developmental Biology**, v. 53, n. 4, p. 318-327, 2017.