

ESTUDO DA LETALIDADE GAMÉTICA E ZIGÓTICA ASSOCIADA À
LETALIDADE OBSERVADA NO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

NEUMA DE OLIVEIRA PAGOTTO GABURRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ESTUDO DA LETALIDADE GAMÉTICA E ZIGÓTICA ASSOCIADA À
LETALIDADE OBSERVADA NO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

NEUMA DE OLIVEIRA PAGOTTO GABURRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientadora: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
SETEMBRO 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 006/2008

Gaburro, Neuma de Oliveira Pagotto

Estudo da letalidade gamética e zigótica associada a letalidade observada no mamoeiro (*Carica papaya* L.) / Neuma de Oliveira Pagotto Gaburro. - 2007.

47 f. : il.

Orientador: Teima Nair Santana Pereira

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

Bibliografia: f. 42 - 47.

1. Viabilidade gamética 2. Viabilidade zigótica 3. Letalidade 4. Mamão 5. *Carica papaya* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD - 634.651

ESTUDO DA LETALIDADE GAMÉTICA E ZIGÓTICA ASSOCIADA À
LETALIDADE OBSERVADA NO MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

NEUMA DE OLIVEIRA PAGOTTO GABURRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 25 de Setembro de 2007.

Comissão examinadora:

Prof^o. Messias Gonzaga Pereira (Ph. D. Melhoramento de Plantas) - UENF

Dr. Laercio Francisco Cattaneo (D. Sc. Produção Vegetal) - INCAPER

Prof^a. Maura Da Cunha (D. Sc. Ciências) – CBB/UENF

Prof^a. Telma N.S. Pereira (Ph.D. Melhoramento de Plantas) - UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTO

À UENF, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Produção Vegetal e pela concessão da bolsa.

A professora Telma Nair Santana Pereira, pelos ensinamentos, pelo incentivo e pela orientação.

Aos professores(as) Messias Gonzaga Pereira e Maura Da Cunha, por valiosas contribuições para com o trabalho.

Ao prof. Rogério Figueiredo Daher, pelas sugestões e disposição em compartilhar seus conhecimentos.

À Caliman Agrícola S. A, por todo apoio e infra-estrutura oferecidos para o desenvolvimento do trabalho.

A minha mãe, Ereni; minhas irmãs, Noeli, Noeci, Noerlene, Dilcéa; aos meus sobrinhos(as), pela amizade e incentivo; ao meu esposo, Adimilson e filhos, Henrique e Tamara, pela confiança, respeito e orgulho.

À Giovana, técnica de laboratório do PAM/LBCT/CBB (Preparo de amostra) e a todos do laboratório de citogenética, pela colaboração nas etapas do trabalho e pela amizade.

Aos meus amigos(as) Robsom, Alessandra, Francisco, Pedro, Sérgio, Lílian, Elaine, Yaska, Leandro, Kaleandra, Luciléia, que tanto torceram por mim.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Classificação botânica	4
2.2. Biologia floral.....	5
2.3. Genética do sexo em mamoeiro	6
2.4. Letalidade.....	8
2.4.1. Formação dos gametas	9
2.4.1.1. Gameta masculino	9
2.4.1.2 Gameta feminino	9
2.4.2. Formação do embrião	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Condições Experimentais.....	14
3.2. Metodologias.....	15
3.2.1. Estudos sobre a Viabilidade Gamética	15
3.2.1.1. Viabilidade polínica	15
3.2.1.2. Viabilidade do saco embrionário	16
3.2.2. Análise do saco embrionário.....	16
3.2.3. Determinação do número de óvulos por ovário	17

3.2.4. Porcentagem de sementes viáveis/fruto	17
3.2.5. Formação do embrião.....	18
3.2.6. Análise estatística dos dados	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Viabilidade polínica	20
4.2. Viabilidade do saco embrionário.....	23
4.3. Formação do saco embrionário.....	27
4.4. Número de óvulos por ovário	30
4.5. Porcentagem de sementes viáveis/fruto	33
4.6. Análise da formação do embrião.....	38
5. 5. RESUMO E CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

GABURRO, Neuma de O. P.; M. S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; setembro, 2007; Estudo da letalidade gamética e zigótica associada à letalidade observada em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Orientadora: Prof^ª. Telma Nair Santana Pereira; Membros do Comitê: Prof^º. Messias Gonzaga Pereira e Prof^ª. Maura Da Cunha.

Objetivou-se com este trabalho estudar a viabilidade gamética e zigótica e buscar associa-la com a letalidade observada no mamoeiro (*Carica papaya* L.). O estudo foi realizado em plantas das variedades *Golden* (Grupo Solo) e *Tainung 01* (Grupo Formosa) cultivadas na Fazenda Romana (Empresa Caliman Agrícola S/A), município de Linhares, Estado do Espírito Santo e na área de convênio da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO/ Estação Experimental de Campos dos Goytacazes. Para tal estudo foram avaliadas a viabilidade polínica e a viabilidade do saco embrionário; contados o número de óvulos/ovário e o número de sementes viáveis e inviáveis/fruto, analisado o saco embrionário maduro e a formação do embrião. Estudos referentes à viabilidade polínica mostraram que a variedade *Tainung 01* apresenta percentual superior (91,68%) ao percentual da variedade *Golden* (84,17%) e também se observou que a viabilidade polínica percentual é superior no verão (92,49%) do que no inverno (83,36%). A viabilidade do saco embrionário foi baixa para ambas as variedades do sexo hermafrodita, sendo estimado em 49,60% para a *Tainung 01* e 32,48% para *Golden*, enquanto que em plantas do sexo feminino

esses valores foram de 83,70% para *Tainung 01* e de 64,25% para a *Golden*. Esses resultados não eram esperados para as plantas femininas, já que nessas não há ocorrência de letalidade. Os dados observados para as plantas hermafroditas não corresponderam aos dados esperados caso a letalidade fosse do tipo gamética feminina (1:1). Assim, supõe-se ser de possível restauração ao receber o alelo *m*. O número de óvulos/ovário/feminina variou de 1383,75 no *Tainung 01* e 619 no *Golden*, enquanto esses valores são de 927,40 no *Tainung 01* e 569,3 no *Golden*. Esses resultados estão em conformidade com o esperado, já que as flores femininas apresentam uma cavidade ovariana maior do que as flores hermafroditas e o *Tainung 01* apresenta flores e frutos maiores do que o *Golden*. Essa mesma tendência foi observada no número de sementes por fruto no sexo hermafrodita. A porcentagem de semente viável no *Tainung 01* do sexo feminino foi de 93,80% e a porcentagem de sementes viáveis no sexo hermafrodita foi de 82,13% no *Tainung 01* e de 73,54% no *Golden*. Os valores apresentados não correspondem aos esperados, supondo-se uma segregação de 3 viáveis: 1 inviável no caso do sexo hermafrodita; talvez pelo fato de que no fruto maduro as diferentes formas consideradas inviáveis não foram todas computadas na contagem. Para a análise do saco embrionário maduro, tanto em flores femininas quanto hermafroditas, concluí-se que o óvulo do mamoeiro é do tipo bitegumentar, anátropo e crassinucelado, apresentando quando maduro dois núcleos polares, as antípodas e duas sinérgides, além da oosfera. A formação do saco embrionário segue o padrão do tipo *Polygonum*, que é o tipo mais observado nas Angiospermas. Óvulos, de plantas femininas e hermafrodita, polinizados e coletados após 96 horas apresentaram o embrião na fase globular, sendo necessário mais tempo após a polinização para se estudar a formação da semente do mamoeiro.

ABSTRACT

GABURRO, Neuma, O. P.; M. S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, September, 2007; Study of the gametic and zygotic lethality associated to the lethality observed in papaya (*Carica papaya* L.). Advisor: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira; Committee Members: Messias Gonzaga Pereira and Prof^a. Maura Da Cunha.

The objective of this work was to study the gametic and zygotic viability and associate it to the lethality observed in papaya (*Carica papaya* L.). The study was conducted on plants of the *Golden* (Solo Group) and *Tainung 01* (Formosa Group) varieties. For this study were evaluated pollen grain and embryonic sac viability; counted the number of ovules/ovary and the number of viable seeds and unviable/fruit, examined the mature embryonic sac and the embryo formation. Studies regarding to the pollen grain viability showed that the *Tainung 01* presents higher percent (91.68%) to the percentage of the *Golden* variety (84.17%) and also noted that the pollinic viability percentage is higher in the summer (92.49%) than in winter (83.36%). The viability of the embryonic sac was low for both varieties of hermaphrodite sex, being estimated at 49.60% for the *Tainung 01* and 32.48% for *Golden*, while in female plants these values were 83.70% for *Tainung 01* and 64.25% for *Golden*. These results were not expected for the female plants, since in those there isn't occurrence of lethality. The observed data for hermaphrodite plants don't correspond to the expected data if the lethality was the

female gametic type (1:1). Thus, it is supposed to be of possible restoration to receive the **m** allele. The number of ovule/ovarian/female ranged from 1383.75 in the *Tainung 01* and 619 in *Golden*, while these values are of 927.40 in the *Tainung 01* and 569.3 in *Golden*. These results are in accordance with the expected, as the female flowers have an ovarian cavity greater than the hermaphrodite flowers and the *Tainung 01* presents flowers and fruits larger than the *Golden*. This same tendency was observed in the number of seeds per fruit on hermaphrodite sex. The percentage of viable seed in the *Tainung 01* of the female sex was 93.80% and the percentage of viable seeds on hermaphrodite sex was 82.13% in the *Tainung 01* and from 73.54% in *Golden*. The presented values do not correspond to the expected, presuming a segregation of 3 viable: 1 impracticable in the case of hermaphrodite sex, perhaps by the fact that in the mature fruit the different forms considered impracticable haven't been all computed on the counts. For the analysis of the mature embryonic sac, both in female flowers as hermaphrodites, it was concluded that the papaya ovule is bitegument type, anatropous and crassinucellate, presenting when mature two polar nucleus, the antipodes and two synergids, beyond oosphere. The formation of the embryonic sac follows the pattern of the *Polygonum* type, which is the most found type in Angiosperms. Ovule of female and hermaphrodite plants pollinated and collected after 96 hours showed the embryo at the globular stage, and needed more time after pollination to study the formation of the papaya seed.

1. INTRODUÇÃO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), apesar de ter sua origem na América Central, encontrou no Brasil condições edafo-climáticas apropriadas à sua exploração econômica, assim, o Brasil é o principal produtor, produzindo em 2003, 1.600.000 t, o que corresponde a 25 % da produção mundial (Agrianual, 2005). A cultura está difundida em regiões que apresentam pluviosidade elevada e solos férteis (Corandie, 1992; Marin, 2004).

No Brasil, as principais cultivares de mamoeiro atualmente são classificadas em dois grupos: Solo e Formosa. Antes da introdução das variedades do grupo Solo, praticamente não existia variedades comerciais para o plantio e as variedades cultivadas apresentavam um elevado grau de segregação. Somente a partir de 1976/77, com a introdução das variedades Solo e híbridos do grupo "Formosa" (Marin *et al.*, 1994), o problema da segregação nos campos de produção foi reduzido. As variedades do grupo Solo são materiais geneticamente uniformes e amplamente utilizados. As variedades do grupo Formosa abrangem híbridos F₁, como o 'Tainung 01' e 'Tainung 02' (Oliveira *et al.*, 1994; Farias *et al.*, 1998).

O mamoeiro é uma planta que apresenta um polimorfismo muito grande com relação à sua biologia floral, apresentando três formas básicas de flores: a feminina, a masculina e a hermafrodita (Marin e Gomes, 1994). No Brasil prevalece os plantios com plantas hermafroditas já que as femininas são descartadas por ocasião da sexagem.

Há várias teorias que explicam a determinação do sexo em plantas de mamoeiro; uma delas, a mais aceita, é que o sexo das plantas é determinado por um gene com três formas alélicas, onde m é o símbolo para o alelo que determina a feminilidade, M_1 para o alelo que determina a masculinidade e M_2 para hermafroditismo. Os genótipos mm , M_1m , M_2m são determinantes dos indivíduos ginóicos, andróicos e andromonóicos, respectivamente, sendo que o primeiro produz flores femininas, o segundo flores masculinas e o terceiro flores hermafroditas (Hofmeyr, 1938).

De acordo com Storey (1941), as combinações M_1M_1 , M_1M_2 , M_2M_2 são letais zigóticas, sendo mm a única forma homozigota viável. O mesmo autor reporta que em frutos resultantes da autofecundação de plantas hermafroditas ou mesmo do cruzamento entre plantas hermafroditas com plantas masculinas, se espera um aborto de óvulo/sementes de 25%, devido à letalidade do genótipo M_2M_2 ou M_1M_2 . A literatura relata a existência de vários genes letais que se manifestam nos gametas e/ou no zigoto em várias culturas importantes. A letalidade é gamética quando ocorre nos gametas masculinos ou femininos e zigótica, quando ocorre no embrião ou zigoto.

Geralmente, quando a letalidade é devida ao gameta masculino, é fácil de ser detectada, uma vez que o órgão masculino é sensível à anomalias e a viabilidade dos grãos de pólen pode ser determinada via testes de viabilidade polínica. Em mamoeiro, a formação do gameta masculino, microesporogênese e microgametogênese, segue o padrão normal descrito para angiospermas. Nenhuma anormalidade foi observada durante o processo de formação do grão de pólen nesta cultura (Santos, 2004), entretanto, há poucas informações em mamoeiro sobre a formação do gameta feminino e sobre a embriogênese, existindo assim uma lacuna nessas áreas de conhecimento, que são etapas importantes para a formação de semente.

Neste trabalho, objetivou-se, principalmente estudar a viabilidade gamética e zigótica e buscar associá-la com a letalidade observada no mamoeiro (*Carica papaya* L.). Para tal foram estimadas a viabilidade polínica e do saco embrionário; contados o número de óvulos/ovário, sementes/fruto e porcentagem de sementes viáveis, além de ter sido analisado o saco embrionário maduro e acompanhada a formação do embrião visando, assim gerar conhecimentos básicos sobre a

cultura. Esses estudos foram realizados em plantas hermafroditas e/ou femininas e em duas estações, verão e inverno do ano de 2006.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação botânica

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) pertence à classe Dicotyledoneae, sub-classe Archichlamydeae, ordem Violales, subordem Caricíneae, família Caricaceae. Segundo Badillo (2000), a família *Caricaceae* é composta por 35 espécies, agrupadas em 5 gêneros, sendo eles: *Vasconcellea* com 21 espécies, *Jacaratia* (7), *Jarilla* (3), *Horovitzia* (1), *Carica* com uma única espécie (*Carica papaya* L.) e *Cylicomorpha* (2). Badillo (2000, 2001) propôs que algumas espécies anteriormente classificadas como *Carica* estejam mais apropriadamente classificadas no gênero *Vasconcellea*.

O gênero *Cylicomorpha* é considerado nativo da África equatorial, *Carica* e *Jacaratia* são predominantes da América do Sul, apesar de os registros de materiais nativos na América Central e os gêneros *Horovitzia* e *Jarilla* serem restritos à América Central (Badillo, 1971 e 1993). A origem do gênero *Carica* ainda está em discussão, pois a maioria dos membros do gênero ocorre ao longo da Cordilheira dos Andes desde o sul da Bolívia e Peru até a Venezuela, em uma área que forma o centro primário de diversidade do gênero (Aradhya *et al.*, 1999). *C. microcarpa* (atualmente *Vasconcellea microcarpa*) e *C. pubescens* (*Vasconcellea cundinamarcensis*) são encontradas desde o norte do Panamá ao sul do México (Badillo, 1971).

Carica papaya na sua forma mais silvestre parece ter uma distribuição na América Central e alguns pesquisadores defendem a América Central como sendo o

centro de domesticação do mamoeiro (Candolle, 1908; Purseglove, 1974; Storey 1976, citados por Aradhya *et al.*, 1999). Outros sugerem a América do Sul como centro de origem, porém há relatos de que o mamoeiro parece ter sido introduzido na América do Sul já domesticado (Morshidi, 1996, citado por Aradhya *et al.*, 1999).

A família *Caricaceae* é composta por arvoretas, com caules suculentos, as folhas, em geral, são alternadas, palminérveas, lobadas e digitadas, as inflorescências são normalmente axilares e, por vezes, algumas flores solitárias (Corandie, 1992). O formato do fruto depende do tipo de flor que o originou, podendo ser de formato esférico a ovalado.

2.2. Biologia floral

Segundo Horovitz *et al.* (1953), o mamoeiro pode apresentar flores femininas, masculinas e hermafroditas.

Flor masculina, andróica ou estaminada: ocorre em inflorescências com pedúnculos longos, inseridos nas axilas das folhas da parte superior da planta. As flores apresentam o tubo da corola estreito e muito longo que termina em cinco pétalas livres em sua extremidade. O órgão masculino é constituído por cinco pares de estames funcionais, soldados às pétalas, e dispostos em duas séries de verticilos, sendo cinco superiores e cinco inferiores; algumas vezes é comum se observar flores masculinas com o ovário rudimentar e estéril. Eventualmente, plantas do sexo masculino, sob a influência do ambiente, podem produzir algumas flores hermafroditas, o que possibilita o desenvolvimento de frutos, denominados de mamões-de-corda, mamões-de-cabo ou mamões-machos; fenômeno este conhecido como reversão sexual (Figura 1A).

Flor feminina, ginóica, pistilada ou unissexual feminina: é do tipo pentâmero, com cálice gamossépalo e corola dialipétala e ocorre quase que exclusivamente nas axilas foliares das plantas. Internamente, só apresenta o órgão feminino, que é constituído de um ovário grande e arredondado, que se afunila para o ápice, onde se inserem cinco estigmas em forma de leque (Figura 1C). Origina frutos arredondados, oblongos ou ligeiramente obovados, apresentando cavidade interna grande em relação à espessura da polpa. A planta que apresenta flor feminina é denominada mamoeiro feminino e, apesar de ser mais produtivas do que as plantas hermafroditas, produzem frutos de menor valor comercial devido à menor espessura de sua polpa (Marin & Gomes, 1986).

Flor hermafrodita ou *elongata*: ocorre normalmente em pedicelos ou pedúnculos curtos, nas axilas foliares de mamoeiros hermafroditas ou, ocasionalmente, em pedúnculos longos originários das axilas de mamoeiro masculino. O órgão feminino é constituído por um ovário, geralmente alongado, podendo-se encontrar variações de piriforme a cilíndrico, e possui cinco estigmas em forma de leque no ápice. O órgão masculino apresenta dez estames funcionais, cinco superiores e cinco inferiores, com anteras de cor amarela (Figura 1C). Produzem frutos com formato alongados ou periforme-alongados. Os frutos apresentam cavidade interna pequena, maior espessura de polpa e, portanto, maior valor comercial (Storey, 1953).

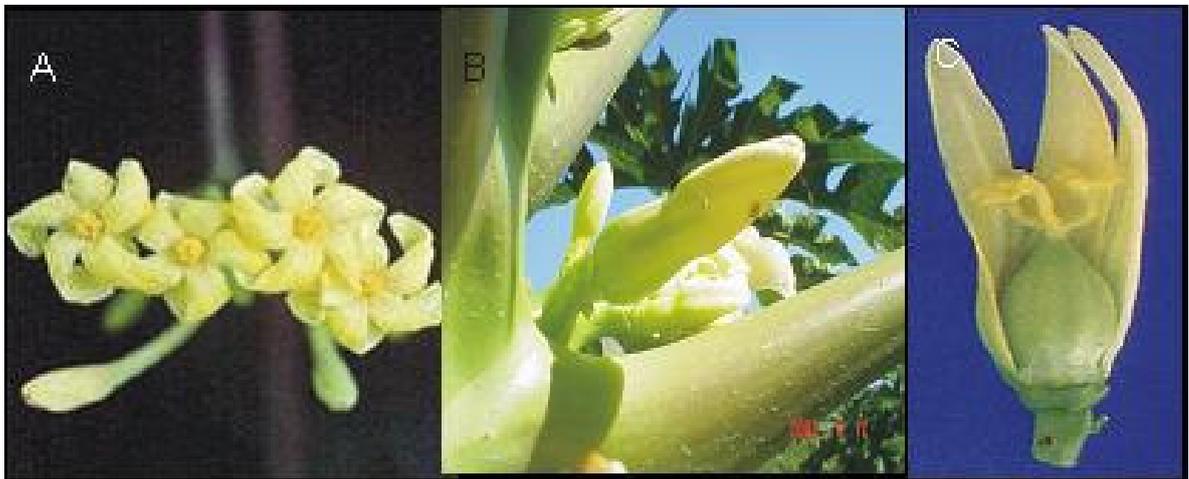


Figura 1. Flores e botões florais de mamoeiro A: flor masculina, B: botão floral hermafrodita, C: flor feminina.

2.3. Genética do sexo em mamoeiro

Poucas são as espécies cujo sexo da planta é devido à presença de cromossomo sexual ou devido a um balanço entre cromossomos autossomais e alossomais (Hofmeyr, 1938). Em mamoeiro, a teoria mais aceita é de que o mecanismo de determinação sexual é governado por um gene com três formas alélicas (Hofmeyr, 1938; Storey, 1938).

Hofmeyr (1938), baseado em suas pesquisas, designou os símbolos m , M_1 , e M_2 para os alelos que determinam a feminilidade, a masculidade e o hermafroditismo, respectivamente, e os genótipos mm , M_1m e M_2m produzem

flores femininas, masculinas e hermafroditas, respectivamente. O autor supracitado também sugere que o loco é herdado, na realidade, como um complexo de muitos genes muito próximos ou ligados, afetando caracteres sexuais secundários, como número de flores, comprimento do pedúnculo, supressão do *crossing – over* e letalidade.

Posteriormente, Hofmeyr (1939) sugeriu que o mecanismo de determinação do sexo em plantas de mamoeiro envolvia um balanço gênico. Os alelos M_1 e M_2 representam regiões inertes ou inativadas, de tamanho variado, encontradas nos cromossomos sexuais. Por esta razão, os genótipos M_1M_1 , M_2M_2 e M_1M_2 não são encontrados na natureza, provavelmente, devido à letalidade zigótica.

A região homóloga m é normal e os genótipos viáveis são M_1m (planta masculina), M_2m (planta hermafrodita) e mm (planta feminina). Portanto, o genótipo mm é pistilado e a sua condição homozigota confere estabilidade fenotípica. Uma vez que M_1 é uma região inerte e longa, ela se expressa fenotipicamente como estaminada, em função de sofrer uma grande influência dos genes autossomais. A região M_2 , menor que M_1 , sofre menor influência dos genes autossomais; assim sendo, a heterozigosidade dos genótipos M_1m (planta masculina) e M_2m (planta hermafrodita) torna-os vulneráveis a alterações na expressão fenotípica ou reversão sexual, devido a fatores ambientais (Hofmyer, 1967).

Sondur *et al.* (1996), utilizando marcadores moleculares com base em RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), mapearam a marca que determina o sexo da flor, SEX1, ligada a 14 cM de uma região do grupo de ligação 1, região essa flanqueada por marcadores RAPD na fase de repulsão. De acordo com esses autores o SEX1-M codifica um fator regulador com ação em *trans*, que induz a formação das partes florais enquanto inibe o desenvolvimento dos carpelos. O alelo dominante SEX1-H é intermediário e tem a capacidade de induzir as estruturas florais masculinas reduzindo o tamanho dos carpelos; plantas SEX1-H/sex1-f apresentam carpelos funcionais. O alelo sex1-f é incapaz de induzir a formação das estruturas masculinas e pode ser considerado alelo nulo. Além da presença de um gene com três alelos há também a possibilidade de uma

aberração cromossômica do tipo deleção, que inativa a função requerida do gene que pode estar ligado muito próximo dos alelos SEX1-M e SEX1-H.

Pesquisas também foram feitas objetivando determinar estudos de cromossomos em mamoeiro, entretanto, nenhum resultado foi satisfatório (Khan *et al.*, 2002). O mamoeiro é diplóide com $2n = 2x = 18$, sendo os cromossomos pequenos e metacêntricos (Datta, 1971; Damasceno Junior *et al.*, 2007), não tendo sido observado pelos autores citados nenhum par de cromossomo heteromórfico ou não pareado. Liu *et al.* (2004), trabalhando com marcadores moleculares relata a presença de um cromossomo Y primitivo com uma região masculina específica que corresponde à 10% do cromossomo e que sofre supressão de *crossing over* e degeneração da seqüência de DNA. Sendo assim, o sexo das plantas em mamoeiro pode ser determinado também pela presença de cromossomos sexuais do tipo homomórficos, ou seja, não diferenciados.

2.4. Letalidade

A letalidade, quer seja gamética ou zigótica, é devida à presença de um gene letal mutante, que pode acarretar a não ocorrência da formação de sementes ou a ocorrência de sementes chochas e não viáveis. A letalidade se caracteriza pelo aborto ou dos gametas, grãos de pólen, ou dos óvulos, ou pelo aborto do zigoto, ou da semente em formação, ou ainda das sementes já formadas. Entretanto nem todo aborto de óvulo ou semente é devido à letalidade.

Hossaert & Valero (1988) conceituam o aborto como o processo que pode ocorrer em vários estádios do desenvolvimento e até mesmo quando os frutos estão maduros. Os fatores que afetam a formação da semente poderiam agir antes ou depois da fertilização e podem ser determinados analisando as características dos óvulos nas frutas que atingem a maturidade. O aborto de óvulos pode também ser devido à fatores de polinizações, ou seja, a limitação do grão de pólen e é um dos fatores importantes que agem na fase de pré-fertilização (McDade, 1983).

Considerando que a letalidade pode ocorrer durante a formação dos gametas (letalidade gamética) ou durante a formação do embrião (letalidade zigótica) é importante se conhecer os mecanismos de formação dessas estruturas.

2.4.1. Formação de gametas

A formação de gametas, gametogênese, ocorre em células especiais que, após sofrerem divisão celular, meiose e mitose, dão origem aos grãos de pólen (gameta masculino) e ao saco embrionário (gameta feminino). A formação de gametas obedece a uma seqüência de eventos e qualquer anormalidade pode resultar em gametas estéreis (Horner e Palmer, 1995; Robinson – Beers *et al.*, 1992).

2.4.1. 1. Gameta masculino

A formação do gameta masculino ocorre no saco polínico durante o desenvolvimento da antera e apresenta duas fases: a microesporogênese e a microgametogênese. Na microesporogênese, as células esporogênicas primárias se diferenciam até alcançarem o estágio de células-mãe de micrósporo (CMM). Cada CMM sofre meiose gerando, assim, quatro núcleos haplóides denominados micrósporos (Maheswari, 1950; Santos, 2004).

Cada micrósporo apresenta citoplasma denso e um núcleo centralizado. Posteriormente, com a formação de um grande vacúolo, o núcleo é deslocado para as extremidades da célula e a mesma aumenta seu volume, e sofre uma mitose originando dois núcleos, um vegetativo e outro reprodutivo ou generativo. O núcleo generativo passa por uma mitose e gera os dois núcleos espermáticos que irão participar da dupla fertilização por ocasião da polinização. Santos (2004), trabalhando com a formação do gameta masculino em mamoeiro, descreve dez estádios, indo desde a célula mãe de micrósporos até grão de pólen maduro, e conclui que o grão de pólen é binucleado ou bicelular, não observando nenhuma anormalidade durante o processo de formação do gameta masculino.

2.4.1. 2. Gameta feminino

Na reprodução em angiospermas a formação do saco embrionário é fundamental importância já que nele se encontra o gameta feminino (oosfera) que irá juntamente com os núcleos polares participar da dupla fertilização e conseqüentemente da formação da semente. O saco embrionário se desenvolve na região central do óvulo conhecida como nucela. O desenvolvimento do saco embrionário pode ser dividido em dois estádios: megasporogênese e

megagametogênese. No primeiro estágio, uma célula da nucela, o megasporócito, situada logo abaixo da epiderme, torna-se mais conspícua que as demais, aumentando de tamanho e apresentando citoplasma mais denso e núcleo proeminente (Maheswari, 1950).

O megasporócito passa por uma divisão meiótica, gerando no final da divisão quatro núcleos haplóides ou tétrades de megásporos. Em um grande número de famílias, as tétrades são lineares, com um dos megásporos próximo à calaza, dois intermediários, e um próximo à micrópila. O número de núcleos do megásporo pode variar como consequência de variação na meiose, citocinese, tempo e número de divisões mitóticas (Maheswari, 1950; Reiser e Fischer, 1993; Cameron e Prakash, 1994)

Dependendo do número de núcleos que participam do desenvolvimento do gametófito, o saco embrionário pode ser classificado em monospórico, bispórico e tetraspórico (Maheswari, 1950; Reiser e Fischer, 1993; Cameron e Prakash, 1994). No tipo monospórico apenas um dos quatro megásporos participa do desenvolvimento do gametófito, no tipo bispórico, dois núcleos do megásporo têm participação, e no tipo tetraspórico, todos os quatro núcleos participam (Maheswari, 1950).

O tipo de saco embrionário mais comum nas Angiospermas é o do tipo *Polygonum* (Maheswari, 1950). Neste, o gametófito funcional é o próximo a calaza já que os três restantes degeneram. Após a degeneração dos três núcleos, o gametófito funcional passa por três divisões mitóticas sucessivas gerando no final uma célula com oito núcleos ou sete células, o saco embrionário (Maheswari, 1950; Reiser e Fischer, 1993).

A primeira divisão mitótica do megásporo funcional dá origem a dois núcleos: o micropilar primário e o calazal primário. Após a primeira mitose, os núcleos migram para pólos opostos, onde são envolvidos por citoplasma. Pequenos vacúolos fundem-se e migram para a região entre os dois núcleos, resultando em um grande vacúolo central (Kapil e Bhatnagar, 1981). A segunda divisão produz um par de núcleos no final da micrópila e um par na calaza. A terceira divisão resulta em dois grupos de quatro núcleos, situados em pólos opostos do saco embrionário alongado. Os quatro núcleos próximos à região micropilar diferenciam-se em três células chamadas aparato do ovo e em um núcleo polar superior. Os quatro núcleos próximos à calaza diferenciam-se em um

grupo de três células ou antípodas e em um núcleo polar inferior. Os dois núcleos polares migram para o centro do megagametófito e fundem-se, originando um núcleo secundário ou núcleos polares. Ao final dessa diferenciação celular, da formação da parede e da migração nuclear, o saco embrionário é considerado maduro (Maheswari, 1950; Reiser e Fischer, 1993).

O aparato do ovo é formado pela oosfera e duas sinérgides, arranjadas uma configuração triangular. Sua diferenciação ocorre na região final próximo da micrópila. O termo *aparato do ovo* pode ser considerado apropriado para esse grupo de células, devido a sua independência nutricional e funcional. Em contato com o saco embrionário fica a oosfera que partilha as faces de sua parede com as sinérgides, considerando que as paredes das células que formam o aparato do ovo são mais espessas quando próximas à base, afinando quando em direção ao ápice (Kapil e Bhatnagar, 1981).

As sinérgides são estruturas efêmeras, que degeneram logo após a fertilização, ou até mesmo antes disso, ocasionando redução do período de viabilidade do saco embrionário (Maheswari, 1950). Sua aparência é triangular e exibem na maioria das vezes, um aparato piriforme. (Maheswari, 1950; Kapil e Bhatnagar 1981; Camerom e Praksh, 1994).

Segundo Maheswari (1950), a degeneração das sinérgides acontece logo após a fertilização, ou até mesmo antes desse processo. Na maioria das plantas, uma das sinérgides se degenera antes mesmo da chegada do grão de pólen, ocasionando o colapso dos vacúolos e a liberação de cálcio (Kapil e Bhatnagar, 1981). A função das sinérgides está relacionada com absorção, síntese, entrada e efusão do tubo polínico, acarretando a disseminação das células espermáticas dentro da célula ovo e da célula central, além do transporte de nutrientes, pois com o aumento da área de superfície da membrana plasmática, aumenta-se assim a mobilidade de soluto por meio da membrana (Maheswari, 1950; Kapil e Bhatnagar, 1981; Cameron e Prakash, 1994).

A fusão dos dois núcleos polares pode ocorrer antes, durante, ou às vezes depois da chegada do tubo polínico no saco embrionário (Maheswari, 1950; Cameron e Prakash, 1994). Após a fusão forma-se o núcleo secundário, agora diplóide, cuja localização pode variar podendo localizar-se próximo da oosfera e

ficando separado das células antipodais por um grande vacúolo ou podendo localizar-se próximo ao centro da célula (Maheswari, 1950).

As antípodas, geralmente em número de três, ficam do lado oposto à oosfera, podendo variar de tamanho e número. Estão relacionadas com a importação de nutrientes até o saco embrionário (Maheswari, 1950; Cameron e Prakash, 1994).

2.4.2. Formação do embrião

A embriogênese é um processo biológico complexo e interessante, que se inicia com o zigoto e culmina com a formação da semente propriamente dita. O desenvolvimento da semente inicia-se a partir da fusão entre um dos núcleos gaméticos masculinos com a oosfera, formando o zigoto, enquanto o outro núcleo gamético masculino funde-se com o núcleo secundário da célula central do saco embrionário, dando origem ao endosperma, tecido triplóide (Taiz e Zeiger, 1998). O endosperma funciona como um tecido de reserva formado por proteínas, carboidratos, lipídeos e minerais. (Desai *et al.*, 1997).

Durante a embriogênese, o zigoto usa todo o seu potencial genético em divisões celulares complexas e consecutivas que resultam no organismo pluricelular (Goldberg *et al.*, 1989). O crescimento, divisão e diferenciação celular durante a embriogênese são aparentemente controlados por mecanismos moleculares evolutivamente conservados tanto em plantas como em animais (Goldberg *et al.*, 1989).

Os dois principais estádios no desenvolvimento do embrião consistem em pró-embrião e em embrião propriamente dito. As primeiras divisões celulares do zigoto dão origem ao pró-embrião, sendo ele quase sempre transversal e resulta na formação de duas células: a mais próxima da micrópila denominada célula basal, e a voltada para o centro do saco embrionário denominada célula terminal. A formação das duas células resultantes da divisão transversal do zigoto indica o estabelecimento precoce da polaridade das plantas, isto é, as duas células participam de maneira diferente na formação das partes do embrião maduro que, por sua vez, originarão a parte aérea e o sistema radicular da futura planta (Malavasi, 1997).

A célula basal sofre uma série de divisões mitóticas para formar um tecido multicelular conhecido como suspensor. Em muitas espécies o suspensor não faz parte do próprio embrião, já em algumas plantas, como alface, contribui para a formação da radícula. Estudos feitos por Marsden e Meinke (1985) indicaram que o papel primário do suspensor é secretar enzimas hidrolíticas que digerem o endosperma para absorver nutrientes e transferir para o embrião. Os autores supracitados relatam que após o amadurecimento do embrião, o suspensor perde sua função e se degenera ou senesce na fase de torpedo. Malavasi (1997) relata que o suspensor tem a função de impulsionar o pró-embrião ao desenvolvimento, além de digerir o endosperma, que é um tecido rico em energia. Segundo Yeung e Meinke (1993), o suspensor funciona como um canal que serve para levar nutrientes ao embrião.

O desenvolvimento do embrião propriamente dito passa por quatro estádios: globular, em forma de clava, torpedo e maduro. O estágio globular é caracterizado por inúmeras divisões mitóticas que produzem uma esfera de células aparentemente não diferenciada. O estágio de clava é marcado por sucessivas divisões, o estágio de torpedo se dá por meio da formação de duas extensões laterais multicelulares que irão formar os cotilédones, característica essa pela qual passa ser denominado esse estágio. O estágio de torpedo é assim chamado porque o eixo embrionário (eixo hipocótilo/radícula) é iniciado e alongado conjuntamente com o desenvolvimento dos cotilédones que se assemelha a um torpedo. Neste estágio as diferenciações vasculares no pró-embrião são aparentes (Malavasi, 1997).

O estágio maduro é quando o embrião, após passar pelos estádios anteriores, adquire a habilidade de resistência, podendo eventualmente entrar em um período de quietude metabólica (Kermode, 1990) até que se encontrem condições propícias para seu desenvolvimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições experimentais

Esse estudo foi realizado em plantas hermafroditas e femininas das variedades '*Golden*' (Grupo Solo) e '*Tainung 01*' (Grupo Formosa), nas épocas de verão e inverno, cultivadas na Fazenda Romana (Empresa Caliman Agrícola S/A), município de Linhares, Estado do Espírito Santo – Brasil e na área de convênio da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO/ Estação Experimental de Campos dos Goytacazes. O clima da região é do tipo Awi de Koppen (tropical úmido), com chuvas no verão e inverno seco. A precipitação pluviométrica média anual foi estimada em 1224,3 mm no período de 1975 a 1995 (Rolim *et al.*, 1999). As temperaturas máxima, mínima e média durante o período de realização do estudo constam no Quadro 1.

O preparo e observações das amostras foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) - Citogenética, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Quadro 1. Temperatura máxima, mínima e média referente aos meses em que o estudo foi realizado no município de Linhares E/S.

Mês/Ano	Média das máximas	Média das mínimas	Média
Dezembro(2005)	30,3°C	21,9 °C	26,1 °C
Janeiro(2006)	31,9 °C	22,1 °C	27,0 °C
Fevereiro(2006)	34,5 °C	23,1 °C	28,8 °C
Média(Verão)	32,23 °C	22,36 °C	27,30 °C
Junho(2006)	27,0 °C	16,0 °C	21,5 °C
Julho(2006)	27,3 °C	15,6 °C	24,4 °C
Agosto(2006)	27,7 °C	17,8 °C	22,7 °C
Média(Inverno)	27,33 °C	14,46 °C	22,86 °C

Fonte: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

3.2. Metodologias

3.2.1. Estudos Sobre a Viabilidade Gamética

3.2.1.1. Viabilidade Polínica

Para a análise da viabilidade polínica, botões na antese foram coletados em plantas hermafroditas e conservados em solução de etanol 70%. A coleta dos botões florais foi realizada nos meses de dezembro 2005/janeiro 2006 (verão) e junho/julho2006 (inverno). Foram coletados ao acaso 10 botões florais de cada variedade em ambas as épocas, coletando-se apenas um botão por planta.

Para o preparo das lâminas três anteras foram retiradas de cada botão floral, maceradas em duas gotas (20µl) de solução tripla de Alexander (Alexander, 1969) para a liberação dos grãos de pólen e reação do mesmo com o corante. Posteriormente, o macerado foi coberto com lamínula e retirado o excesso do corante da lâmina com o auxílio de papel filtro. As lâminas assim montadas foram observadas em microscópio óptico, campo claro (Olympus BX 60). Foram preparadas 10 lâminas variedade/época e foram contados e classificados 500 grãos de pólen por lâmina de cada variedade, totalizando-se 5000 grãos de pólen. Grãos de pólen corados de vermelho púrpuro foram considerados viáveis, e os grãos de pólen corados de verde foram considerados inviáveis (Alexander, 1969).

As imagens dos grãos de pólen viáveis e inviáveis foram capturadas com câmera CCD 12 bits vídeo câmera acoplada ao microscópio óptico *Olympus BX*

60 com objetiva de 60x. As imagens digitalizadas foram capturadas utilizando-se o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

3.2.1. 2. Viabilidade do saco embrionário

A análise da viabilidade do saco embrionário, ou seja, se todas as células estavam intactas, foi realizada de acordo com Rosellini *et al.* (2005) e com Martin (1959). Dez botões florais/variedade/sexo (hermafrodita e feminino) na antese foram coletados ao acaso e fixados em solução de etanol 70% e ácido acético na proporção 3:1. No Laboratório, as peças florais foram retiradas com exceção do ovário que foi colocado em uma nova solução fixadora, submetido a vácuo para melhor penetração da solução nos tecidos, permanecendo nessa solução por pelo menos 24 horas em temperatura ambiente. Os óvulos foram, posteriormente, retirados da parede do ovário e amaciados com 8N NaOH por 24 horas, coloridos com anilina azul 1% em 0,1 M de K_3PO_4 por 12 horas (Martin, 1959).

Lâminas foram montadas e observadas sob microscópio *Olympus* fluorescente apresentando filtros de excitação de 370nm e emissão 509nm para melhor observação da fluorescência. Foram contados e classificados 200 óvulos/lâmina. Óvulos classificados como inviáveis apresentaram algum nível de fluorescência no tecido da nucela ou do funículo ou do saco embrionário e óvulos classificados como viáveis não apresentaram a fluorescência (Rosellini *et al.*, 2005).

As imagens da viabilidade do saco embrionário foram capturadas com câmera CCD 12 bits vídeo câmera acoplada ao microscópio óptico *Olympus BX 60* com objetiva de 60x. As imagens digitalizadas foram capturadas utilizando-se o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

3.2.2. Análise do saco embrionário

Para a análise do conteúdo do saco embrionário foram preparadas lâminas permanentes. Para tal, flores femininas e hermafroditas foram coletadas na variedade *Tainung 01*. Os botões florais na antese foram coletados e lavados em solução tampão fosfato de sódio a 1%. Posteriormente, foram fixados em glutaraldeído 2.5% e formaldeído 4% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 e trazidos ao laboratório.

No laboratório, sob a lupa, os óvulos foram retirados do ovário e fixados na solução anteriormente citada, por duas horas em temperatura ambiente. Após a fixação foram feitas três lavagens em solução tampão cacodilato 0,1M, uma hora cada, e pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora. A desidratação do material foi feita em séries crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 2 vezes 100%) num período de uma hora cada etapa. A inclusão foi feita em resina Epóxi (Epon), numa proporção acetona/resina, 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3 e Epoxi puro (Bechimol *et al.*, 1996), sendo que em cada etapa o material permaneceu na solução por oito horas em temperatura ambiente. Uma vez completada a infiltração o material foi incluído em moldes especiais de silicone, devidamente identificados, cobertos por placa de Petri e submetidos a uma temperatura de 60 °C por 48 h.

Os óvulos incluídos em resina foram seccionados em cortes semifinos (0,5 µm) utilizando ultramicrótomo (LEICA RM2145) com faca de diamante, coletados em lâminas de vidro, corados com o corante azul de toluidina 1% e Borax 1%, durante 10 segundos em placa quente, e lavados cuidadosamente com água destilada. Após a coloração, os cortes foram montados com *entelan* e lamínulas de vidro.

As imagens dos óvulos e saco embrionário foram capturadas com câmera CCD 12 bits vídeo câmera acoplada ao microscópio ótico *Olympus BX 60*. As imagens digitalizadas foram capturadas utilizando o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

3.2.3. Determinação do número de óvulos por ovário

Dez botões florais/variedade/sexo na antese foram coletados em etanol 70%. No Laboratório, cada ovário foi cortado longitudinalmente, os óvulos foram retirados da cavidade ovariana e foram cortados sob microscópio estereoscópio. Essa avaliação foi realizada em duas épocas do ano, tanto no verão (dezembro/fevereiro) quanto no inverno (junho/agosto).

3.2.4. Porcentagem de sementes viáveis/fruto

Dez frutos/variedade/sexo foram coletados no ponto de colheita, aproximadamente 140 dias após a polinização. No Laboratório, os frutos foram cortados e suas sementes retiradas e colocadas em placas de *Petri*. As sementes

foram contadas e classificadas em viáveis e inviáveis. Sementes chochas ou mal formadas ou de cor branca foram consideradas inviáveis e as sementes completamente íntegras de cor preta foram consideradas viáveis. Essa avaliação foi realizada no verão (dezembro a fevereiro) e no inverno (junho a agosto).

3.2.5. Formação do embrião

Para a avaliação da formação do embrião foram utilizados os botões florais de plantas femininas e hermafroditas da variedade '*Tainung 01*' oriundas da área de convênio da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO/ Estação Experimental de Campos dos Goytacazes. Flores de ambos os sexos, foram identificadas no momento de antese. Suas anteras contendo pólen foram coletadas com auxílio de pincel e placas de Petri. Flores femininas receberam pólen das anteras das flores hermafroditas e as flores hermafroditas foram autopolinizadas. Após a polinização, os botões florais foram protegidos com sacos de papel.

As flores polinizadas e as autopolinizadas manualmente foram coletadas 24, 48, 72 e 96 h após a polinização, lavadas em solução tampão de fosfato de sódio a 1%, e posteriormente fixadas em glutaraldeído 2.5% e formaldeído 4% em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2. No laboratório, sob a lupa, os óvulos foram retirados do botão floral e fixados na mesma solução anteriormente citada, por duas horas em temperatura ambiente. Após a fixação foram feitas três lavagens em solução tampão cacodilato de sódio 0,1M, uma hora cada, e pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M, por 1 hora.

A desidratação do material foi feita em séries crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 2 vezes 100%) num período de uma hora cada etapa. A inclusão foi feita em resina Epóxi (Epon), numa proporção acetona/resina, 3:1; 2:1; 1:1; 1:2; 1:3 e Epoxi puro (Bechimol *et al.*, 1996), sendo que em cada etapa o material permaneceu na solução por oito horas em temperatura ambiente. Uma vez completada a infiltração o material foi incluído em moldes especiais de silicone, devidamente identificados, cobertos por placa de Petri e submetidos a uma temperatura de 60 °C por 48 h.

Os óvulos incluídos foram seccionados em cortes semifinos (0,5 μ m) utilizando-se ultramicrótomo (LEICA RM2145) e faca de diamante (Drukker International). Os cortes foram coletados, colocados em lâminas de vidro aquecidas, corados com o corante azul de toluidina 1% e Borax 1%, durante 10 segundos em placa quente (60°C), e lavados cuidadosamente com água destilada. Após a coloração, os cortes foram montados com entelan e lamínulas de vidro.

As imagens foram capturadas com câmera CCD 12 *bits* vídeo câmera acoplada ao microscópio ótico *Olympus BX 60*. As imagens digitalizadas foram capturadas utilizando o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

3.2. 6. Análise estatística dos dados

As análises dos dados numéricos foram realizadas por intervalo de confiança para proporção com auxílio do programa estatístico SAEG, versão 9.0 (Universidade Federal de Viçosa, 1997), empregando-se o método de Amostragem Simples ao Acaso (Cochran, 1995). As amostras foram dimensionadas considerando alfa (α) ao nível de 5%. Os intervalos de confiança foram calculados a partir da porcentagem média para a viabilidade do saco embrionário e média para a determinação do número de óvulos por ovário e número de sementes por fruto. Realizou-se, também, o teste de Qui-quadrado onde a frequência observada foi analisada em relação a frequência esperada, sendo a hipótese (3:1), aceita ou rejeitada. Os dados descritivos foram realizados com base nas imagens capturadas em lâminas preparadas para este fim.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Viabilidade polínica

A solução tripla de Alexander foi eficiente em distinguir grãos de pólen viáveis dos inviáveis em mamoeiro (Figura 2). Esta solução é composta por três corantes: verde malachita, fucsina ácida e laranja G, sendo que o verde malachita reage com a parede do grão de pólen, daí o grão de pólen inviável ou abortado apresentar cor verde, pois ele só apresenta a parede; a fucsina ácida colore o citoplasma e mitocôndrias e nesta solução sua função é colorir o protoplasma dos grãos de pólen viáveis dando a eles uma cor que varia do vermelho ao vermelho púrpuro. O laranja G é usado para acentuar a diferenciação das cores já em destaque, permitindo assim uma melhor distinção entre grãos de pólen abortados dos não abortados (Alexander, 1969).

Nesse trabalho, além dos grãos de pólen verdes e vermelhos púrpuros, também foram observados grãos de pólen com o citoplasma plasmolisado (Figura 2B), que foram considerados abortados ou inviáveis conforme observado e considerado por Souza *et al.* (2004). Grãos de pólen viáveis e bem formados apresentaram formato circular e citoplasma íntegro.

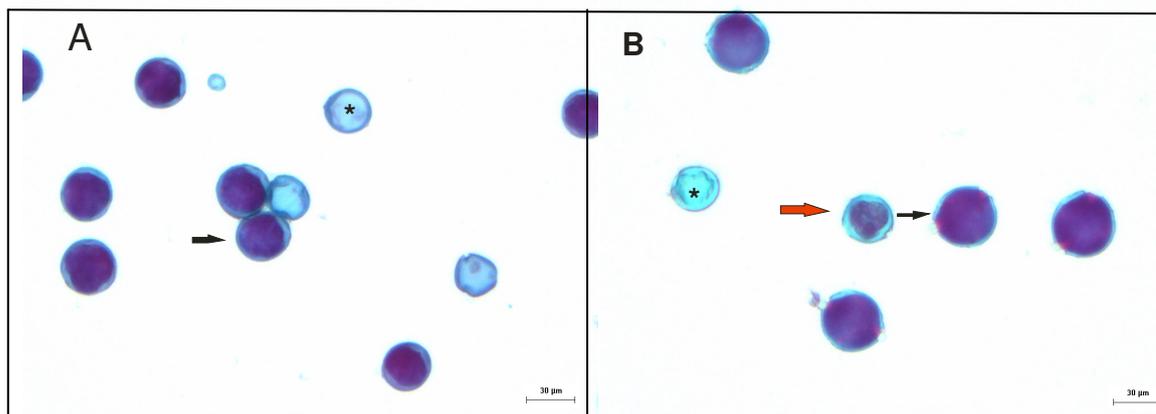


Figura 2. Viabilidade de grãos de pólen do mamoeiro corados com Solução Tripla de Alexander. A) Grão de pólen da variedade Golden onde se observa grãos de pólen viáveis (seta com preenchimento preto) e inviáveis (*). B) Grãos de pólen da variedade *Tainung 01*, onde se observa grãos de pólen viáveis (seta preta), inviáveis (*) e plasmolizado inviável (seta com preenchimento vermelho). Barra 30µm.

De acordo com os dados analisados observaram-se diferenças significativas entre os genótipos, com base nos intervalos de confiança a 5% de probabilidade (Tabela 1). As maiores porcentagens médias de viabilidade polínicas foram observadas na coleta do verão, sendo que o '*Tainung 01*' apresentou uma viabilidade superior ao '*Golden*' com médias de 94% e 91%, respectivamente. No inverno essa tendência se manteve, sendo que as menores médias de viabilidade polínica foram observadas no *Golden*, cuja média foi de 77% de viabilidade, enquanto o *Tainung 01* apresentou uma média de 89% de grãos de pólen viáveis.

Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com os realizados por Damasceno Jr. (2004), que obteve um alto índice de viabilidade polínica para a variedade *Tainung 01* (92,02%) em relação à variedade *Golden*. (87,22%). Segundo McCormick (1993), valores de viabilidade polínica altos podem ser considerados como reflexo de uma divisão meiótica bem sucedida.

Tabela 1. Porcentagem média, limite inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos dados de viabilidade polínica observados nas variedades *Golden* e *Tainung 01*. Dados obtidos em duas épocas distintas, verão e inverno, Campos dos Goytacazes/ RJ. 2007.

Variedades	Média	Intervalos		DP	CV%
		-----LI-----	-----LS-----		
TV	94	93,12	94,44	24,15	25,75
GV	91	90,42	91,98	28,33	31,06
Média	92,5				
TI	89	88,78	90,38	30,55	34,10
GI	77	75,98	78,83	41,99	54,44
Média	83,0				

Intervalo de confiança para as médias a 5% de probabilidade.

TV: *Tainung 01* verão; GV: *Golden* verão; TI: *Tainung 01* inverno; GI: *Golden* inverno.

Os valores para a viabilidade dos grãos de pólen podem diferir entre estações distintas do ano, pois esta variação pode estar relacionada a outros fatores como, por exemplo, variações de temperatura (Miranda, 1993), que podem afetar o processo meiótico causando anormalidades (McCormick, 1993). No presente trabalho observou-se que as médias de viabilidade dos grãos avaliados durante o inverno foram inferiores quando comparadas com a época do verão (Figura 3). Apesar de os resultados observados na coleta do inverno apresentarem-se inferiores aos da coleta do verão, eles provavelmente refletem o efeito da temperatura mais baixa na viabilidade dos grãos de pólen. Esses valores médios (92,5 e 83,0), verão e inverno, respectivamente, não refletem uma anomalia cromossômica, pois quando isso ocorre valores iguais ou inferiores a 50% são esperados (Singh, 1993).

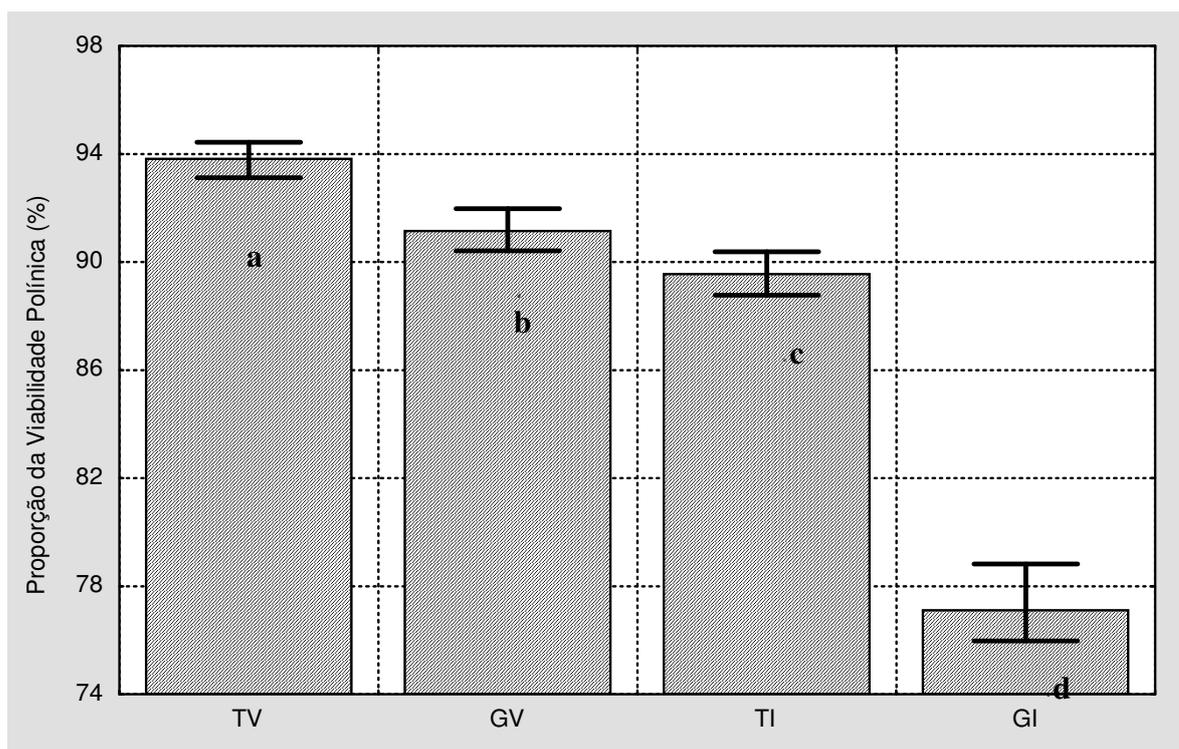


Figura 3. Gráfico representando a proporção média da viabilidade polínica e os intervalos de confiança obtida para as variedades *Tainung 01* e *Golden* no verão e inverno. TV: *Tainung 01*- Verão; GV: *Golden* - Verão (GV); TI: *Tainung 01* – Inverno; GI: *Golden* Inverno (GI). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo teste T.

De acordo com Nakasone e Paul (1998), o mamoeiro é sensível a alterações de temperatura, podendo afetar sua produção do fruto. Resultados apresentados por Magdalita *et al.* (1998) e por Garret (1995) corroboram com os resultados aqui relatados. Os primeiros autores observaram que a viabilidade polínica do mamoeiro é baixa no inverno quando comparada com a viabilidade polínica observada no verão e o segundo autor, também trabalhando com mamoeiro, observou que no verão a viabilidade polínica foi de 90%, enquanto que no inverno, a viabilidade polínica foi de 45%.

4.2. Viabilidade do saco embrionário/óvulos

A metodologia utilizada para distinguir óvulos viáveis de inviáveis permitiu a observação dessas duas classes nos genótipos avaliados com bastante clareza

(Figura 4). De acordo Rosellini *et al.* (2005), a presença de calose nos óvulos é um indicativo de degeneração já que uma das primeiras indicações observáveis de que o óvulo irá abortar é a síntese de calose em torno do saco embrionário (Vishnyakova, 1991). Calose freqüentemente isola células mortas das células vivas (Sun *et al.*, 2004) e sendo um polissacarídeo presente na parede celular atua como um filtro molecular, limitando a difusão de moléculas pequenas de açúcar entre o tegumento e o embrião (Yim e Bradford, 1998). No presente estudo foi possível observar óvulos viáveis (Figura 4A), ausência de calose e óvulos inviáveis (Figura 4B) com a presença de calose. A deposição de calose se concentrou na região do óvulo referente ao saco embrionário (Figura 4), sugerindo que o saco embrionário pode apresentar irregularidades nas células que o compõe.

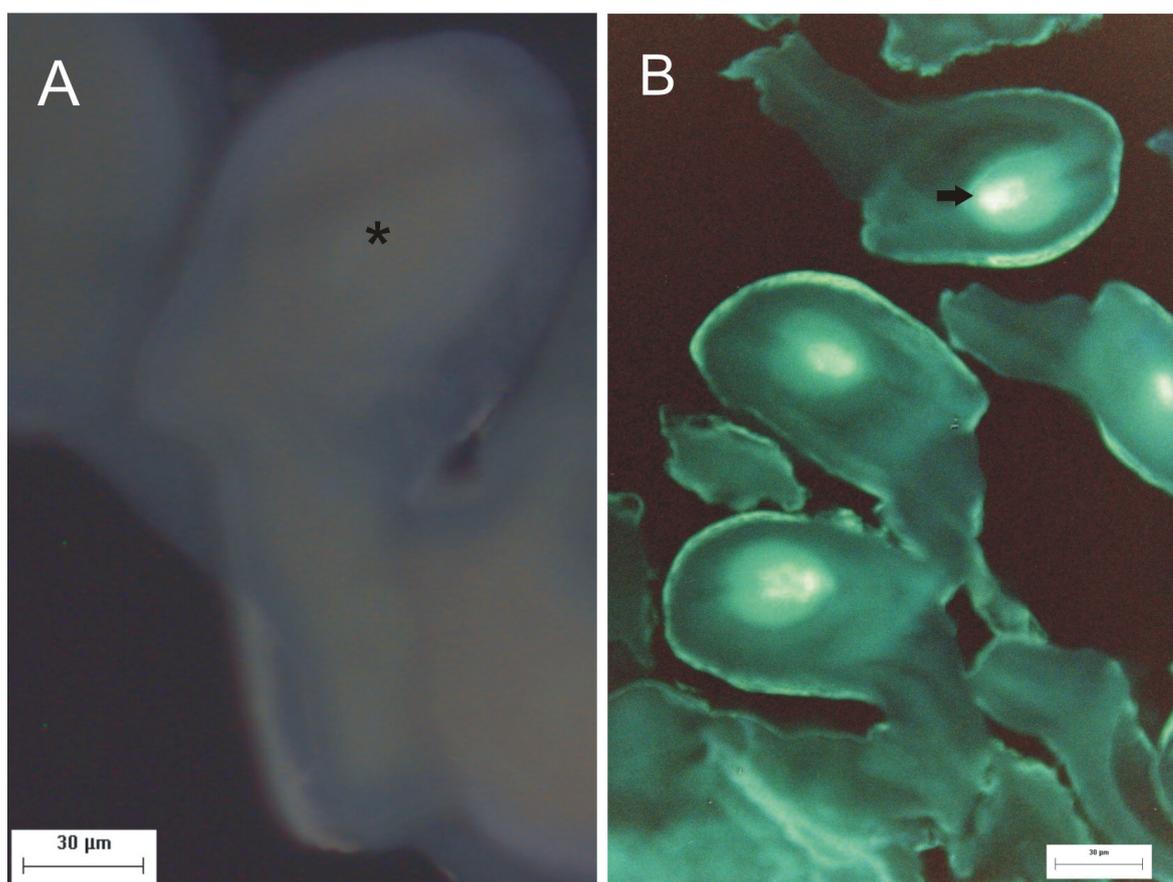


Figura 4. Viabilidade de óvulos em mamoeiro *Golden*. A. Óvulo viável (*) onde se observa ausência de calose, Barra 30 µm; B. Óvulos inviáveis onde se observa a presença de calose detectada pela fluorescência (seta). Barra 10µm.

Observaram-se pelos dados (Tabela 2 e Figura 5), que a proporção da viabilidade dos óvulos foi alta em genótipos do sexo feminino (74%) quando comparada com a proporção da viabilidade dos óvulos em genótipos hermafroditas (41%), sendo que ambos os valores de viabilidade podem ser considerados baixos. A variedade *Tainung 01* apresentou uma proporção de viabilidade de 67%, enquanto que *Golden* apresentou uma proporção de 48%, ambas muito baixas.

Tabela 2. Viabilidade dos óvulos (%), limite inferior (LI) e limite superior (LS) dos intervalos de confiança, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) observados em genótipos de mamoeiro do sexo feminino e hermafrodita

Genótipo	Viabilidade (%)	Intervalos		DP	CV%
		-----LI-----	-----LS-----		
TF	84	82,09	85,31	36,94	44,1407
GF	64	62,15	66,35	47,93	74,6122
Média	74				
TH	50	47,31	51,69	50,01	100,8284
GH	32	30,38	34,58	46,00	144,2000
Média	41				

Intervalo de confiança em torno das médias, ao nível de 5% de probabilidade.

TF: *Tainung 01* feminino; GF: *Golden* feminine; TH: *Tainung 01* hermafrodita; GH: *Golden* hermafrodita.

Esses resultados não foram aqueles esperados, já que retrataram a não integridade do saco embrionário em flores fechadas, próximas da abertura. Considerando-se que em uma planta hermafrodita (M_2m) 50% dos óvulos serão do tipo M_2 e 50% serão do tipo m e considerando-se que a literatura reporta que o alelo M_2 apresenta uma região deletada (Hofmeyr, 1967), poder-se-ia supor que, dependendo do tamanho da deleção, os gametas que carregam o alelo M_2 sejam inviáveis, e assim obter-se um resultado dos dados segregando numa razão de 1:1 (óvulos viáveis): 1 (óvulos inviáveis). Entretanto, o teste de “qui”-quadrado aplicado aos dados foi significativo ($\chi^2 = 44,7$), rejeitando-se assim a hipótese de

segregação 1:1, ou seja, 50% de óvulos viáveis: 50% de óvulos inviáveis. Os dados sugerem que outros fatores podem estar influenciando a viabilidade do saco embrionário, pois até mesmo em óvulos femininos foram verificados índices de inviabilidade.

A literatura reporta a ação de genes causando a inviabilidade dos óvulos conforme relatam Bingham e Hawkins-Pfeiffer (1984), trabalhando com alfafa (*Medicago sativa*). Nessa espécie há um gene recessivo que causa o desenvolvimento retardado dos integumentos dos óvulos, provocando assim a esterilidade desses óvulos. Por meio da análise citológica, os autores supracitados observaram que não houve o desenvolvimento do saco embrionário devido ao depósito de calose após estágio de meiose, ocasionando a expansão dos integumentos e o preenchimento do espaço que seria normalmente ocupado pelo saco embrionário, tornando conseqüentemente seus óvulos inviáveis.

Pereira *et al.* (1997a), trabalhando com quatro mutantes de soja semi-estéreis, observaram que o aborto de óvulos em três deles (PS2, PS3, PS4) era devido à presença de um gene letal que causava a degeneração do saco embrionário enquanto que no mutante PS1 foi observado que os núcleos polares não se aproximavam do aparato do ovo, impedindo então a fertilização dos núcleos polares e, conseqüentemente, impedindo a formação do endosperma, causando assim o aborto do óvulo (Pereira *et al.*, 1997b).

Em mamoeiro, Bautista-Calles *et al.* (1999) observaram que os óvulos abortados apresentaram uma redução no tamanho e uma degeneração dos integumentos do óvulo. Nesse estudo observou-se por intermédio da fluorescência que a deposição de calose se concentra na região central do óvulo (Figura 4B), sugerindo que o problema está nos componentes do saco embrionário, mais especificamente na sua célula central.

Considerando-se a importância dos óvulos, uma vez que os mesmos estão diretamente relacionados com a produção das sementes, e considerando-se os resultados deste estudo, concluiu-se que se faz necessário a continuidade das pesquisas na tentativa de elucidar se as razões desta inviabilidade são devidas a fatores ambientais ou genéticos, ou seja, se há algum gene/alelo se manifestando no óvulo.

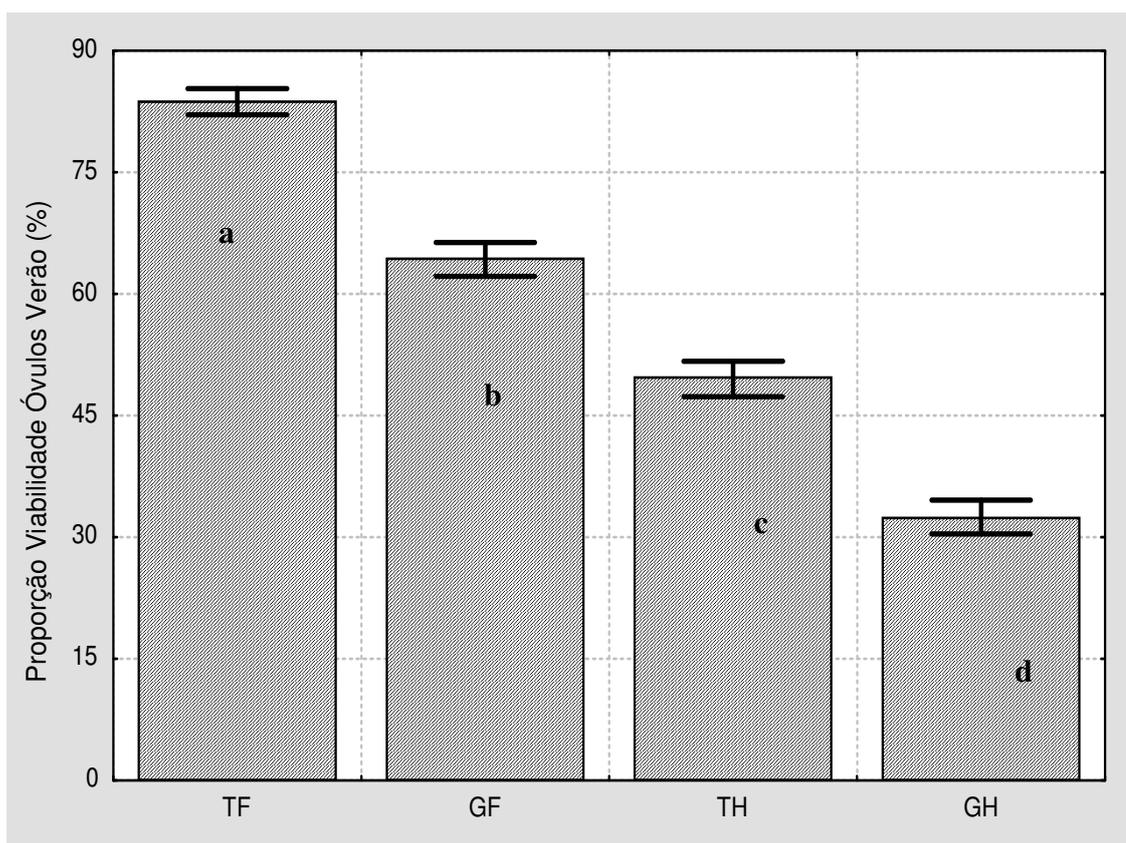


Figura 5. Proporção da viabilidade do saco embrionário e intervalo de confiança em mamoeiro. *Tainung 01* Feminino (TF); *Golden* Feminino (GF); *Tainung 01* Hermafrodita (TH); *Golden* Hermafrodita (GH). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste T.

4.3. Formação do saco embrionário

A análise do saco embrionário maduro permitiu concluir que o óvulo do mamoeiro é do tipo anátropo, bitegumentar e crassinucelado e do tipo *Polygonum* (Figura 6A). Observou-se também que o saco embrionário nos dois sexos apresenta os mesmos componentes, como já era esperado, considerando que se trata de uma mesma espécie, ou seja, apresenta, duas sinérgides, três antípodas e dois núcleos polares (Figura 6).

A macroesporogênese se inicia quando uma célula da nucela se diferencia das demais aumentando de volume celular e tornando-se a célula mãe do megásporo (CMM) que irá sofrer meiose. Ao final da meiose quatro núcleos haplóides se dispõem em forma linear, tetrade linear, sendo que três degeneram e o núcleo próximo a calaza torna-se funcional. Esse núcleo próximo da calaza sofre

três divisões mitóticas sucessivas dando origem ao saco embrionário composto por sete células: a oosfera, as duas sinérgides, os dois núcleos polares, e as três antípodas (Maheshwari, 1950).

O óvulo pode apresentar várias formas e quando maduro é classificado de acordo com a sua forma. Os ortótropos ou átropos são os óvulos que apresentam a micrópila alinhada ao hilo ou acima dele. Os óvulos anátropos são aqueles que apresentam seu corpo invertido fazendo com que a micrópila e o hilo fiquem muito próximos um do outro; é o tipo mais encontrado nas dicotiledôneas e monocotiledôneas. Quando o óvulo apresenta uma curvatura se denomina campilótropo e quando apresenta a aparência de ferradura são os anfítropos (Maheshwari, 1950).

Quanto aos integumentos o óvulo é do tipo bitegumentar (Figura 6A). Integumentos são as estruturas que surgem a partir da base da nucela durante a divisão meiótica das células-mãe de megásporo. O número de integumentos é constante na maioria das famílias, podendo o óvulo apresentar um ou dois integumentos, conhecido como interno ou externo (Maheshwari, 1950). A derme na maioria das vezes é que dá origem ao integumento interno, e o integumento externo é derivado da camada da derme e da hipoderme. Durante o desenvolvimento do megásporo, os integumentos crescem paralelos à nucela até cobrir completamente essa estrutura (Maheshwari, 1950).

No mamoeiro, o integumento externo cobre o interno e acaba por envolver totalmente a nucela e ambos formam a micrópila. A micrópila apresenta-se bem próxima ao funículo, devido ao fato de que o óvulo do mamoeiro é do tipo anátropo. O funículo é uma estrutura que faz com que os óvulos fiquem aderidos à parede da placenta (Dornelas, 2003). Os integumentos correspondem ao tegumento da semente madura e no mamoeiro o integumento interno forma a endotesta, enquanto o externo forma a sarcotesta (transparente e gelatinosa) da futura semente do mamoeiro, portanto estruturas muito importantes na cultura (Lange, 1961). A sarcotesta tem uma função muito importante na germinação das sementes do mamoeiro, pois sua presença reduz a taxa de germinação das sementes (Lange, 1961).

Considerando-se que em mamoeiro há centenas de óvulos por ovário, é esperado que haja uma diferença entre os óvulos quanto ao estágio de desenvolvimento do saco embrionário, porém foi possível realizar as observações

das estruturas que o compõem. A oosfera se caracterizou por apresentar na região micropilar (basal) um vacúolo e na região superior (apical) o citoplasma e núcleo (Figura 6B); as sinérgides (Figura 6D) se caracterizam por apresentar na região micropilar o citoplasma e o núcleo e na região superior um vacúolo. As sinérgides geralmente degeneram antes ou durante a fertilização, liberando assim cálcio, cuja função é estimular o crescimento do tubo polínico (Maheshwari, 1950). São consideradas responsáveis pela absorção, síntese e transportes de nutrientes, devido à grande área de contato com a membrana plasmática proporcionado pelo aparato do ovo (Reiser e Fischer, 1993). Oosfera e sinérgides formam o aparato do zigoto e se mantêm intactas até que o tubo polínico, através de uma das sinérgides, libere os núcleos espermáticos ou generativos. Um desses núcleos irá fertilizar a oosfera e dará origem ao embrião e o outro irá fertilizar os núcleos polares e dará origem ao endosperma. Entre as sinérgides ocorre a formação do aparato filiforme, porém foi possível detectar o mesmo.

Os núcleos polares (Figura 6C) permanecem isolados e próximos ao aparato do ovo ou zigoto. Momento antes da fertilização eles se fundem compartilhando o mesmo citoplasma e tornando-se diplóides. As antípodas localizadas na região da calaza, região oposta à oosfera, variam na forma e no número (Mareshwari, 1950). Nesse estudo observou-se uma antípoda intacta e outra degenerada (Figura 6D). Em algumas espécies as antípodas são efêmeras e em outras são persistentes, ocorrendo a degeneração no ato da polinização (Mareshwari, 1950; Souza *et al.*, 2002). Na maioria das plantas as antípodas apresentam mitocôndrias, dictiossomos, plastídeos e ainda retículo endoplasmático bem desenvolvido em seu citoplasma (Cameron e Prakash, 1994).

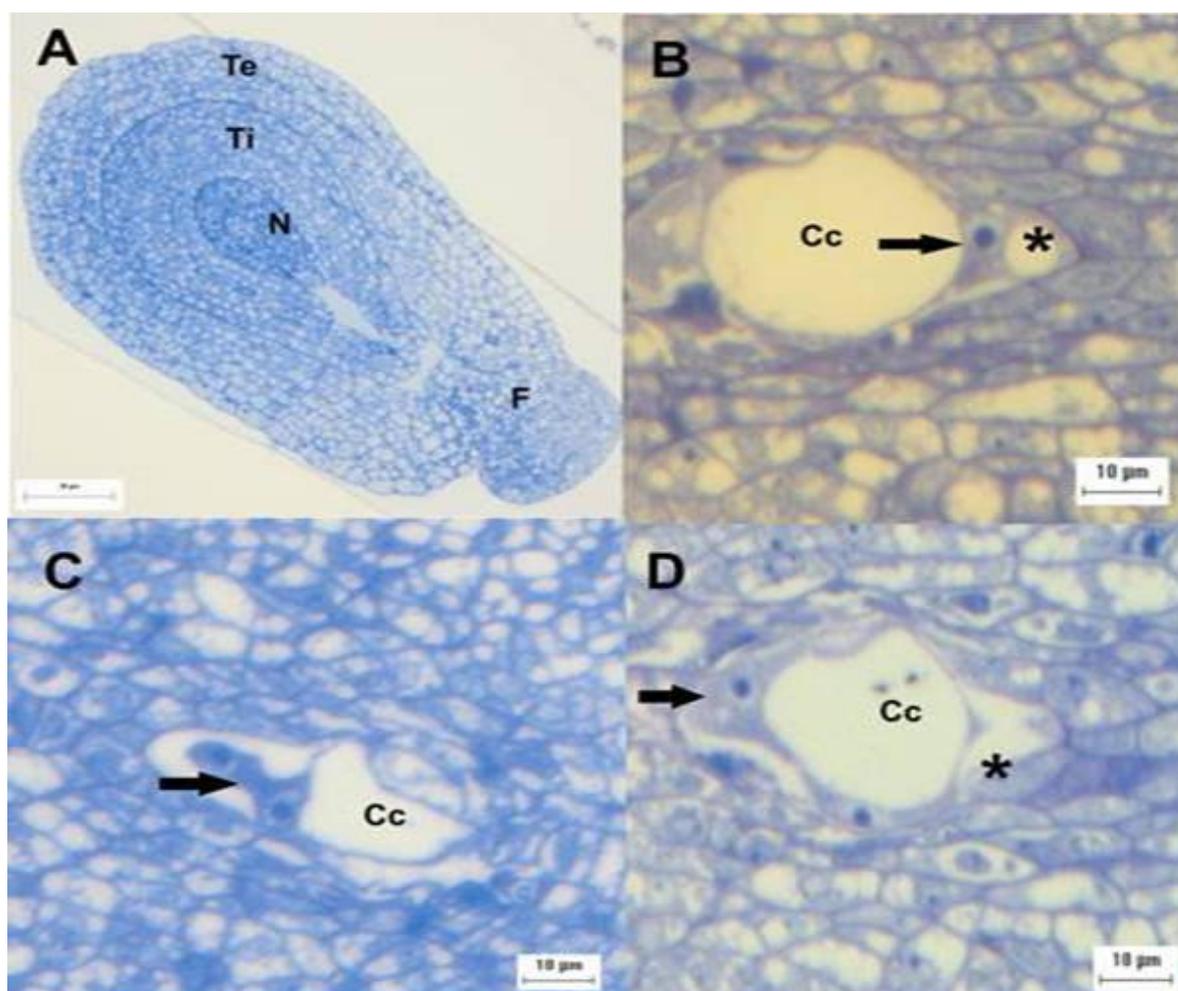


Figura 6. Saco embrionário e seus componentes em mamoeiro. A: Óvulo anátropo onde se observa o tegumentos externo (Te) e interno (Ti), nucela (N), funículo (Fu) (Barra:30 μm); B: Oosfera onde se observa o citoplasma na região superior (seta), vacúolo na região micropilar (*) (Barra:10 μm); C: Núcleos polares compartilhando o mesmo citoplasma porém mantidos isolados (seta) (Barra:10 μm); D: Antípoda onde se observa o núcleo (seta) e uma sinérgide na região inferior (*) (Barra:10 μm). Observa-se nas figuras B,C,D a célula central (Cc) do saco embrionário.

4.4. Número de óvulos por ovário

De acordo com análise dos dados obtidos observou-se diferenças significativas entre as variedades, com base nos intervalos de confiança a 5% de probabilidade (Tabela 3 e Figura 7). A variedade *Tainung 01* sexo feminino apresentou as maiores médias para o número de óvulos, verão e inverno, porém a média no verão (1.457,1) foi superior a média do inverno (1.310,4) apesar de as mesmas não terem diferido estatisticamente. A variedade *Golden* apresentou uma

média de óvulos/ovário no valor de 549,3 para o genótipo feminino e 520,4 para o genótipo hermafrodita, ambos avaliados no inverno. As plantas femininas e hermafroditas dos dois grupos apresentam uma maior média de óvulos por ovário na época do verão em relação ao inverno.

Tabela 3. Média, limite superior (LS) e inferior (LI) do intervalo de confiança, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para os dados da característica número de óvulos por ovário observados nas variedades *Golden* e *Tainung 01*, sexos (feminino e hermafrodita). Dados obtidos em duas épocas (verão e inverno) no ano de 2007, em Campos dos Goytacazes/ RJ.

Genótipo	Média	Intervalos		DP	CV%
		-----LI-----	-----LS-----		
TFV	1457.1	1319,2	1595,0	177,2	12,2
TFI	1310.4	1182,3	1438,5	164,7	12,6
	1.383,8				
THV	954.0	776,9	1131,1	210,8	22,1
THI	900.8	818,4	983,2	106,0	11,8
	927,0				
GFV	688.8	499,6	878,0	264,8	38,5
GFI	549.3	478,3	620,3	99,3	18,1
	619,05				
GHV	618.3	534,1	702,5	108,2	17,5
GHI	520.4	429,6	611,2	116,7	22,4
	569,35				
Média	874.8	754,8	995,0		

Intervalo de confiança para média do número de óvulos a 5% de significância. *Tainung 01* Feminino Verão (TFV), *Tainung 01* Feminino Inverno (TFI), *Tainung 01* Hermafrodita Verão (THV), *Tainung 01* Hermafrodita Inverno (THI), *Golden* Feminino Verão (GFV), *Golden* Feminino Inverno (GFI), *Golden* Hermafrodita Verão (GFV), *Golden* Hermafrodita Inverno (GHI).

Esses resultados eram esperados considerando-se que *Tainung 01*, apresenta botões florais com um espaço ovariano superior em relação aos botões florais da outra variedade, *Golden*. Durante os experimentos foi possível observar que os óvulos da variedade *Tainung 01* se mantinham aderidos à parede da cavidade ovariana, permanecendo um espaço vazio no centro da cavidade. Foi também possível a observação de diferenças nos tamanhos dos óvulos da variedade *Tainung 01*, mostrando um tamanho superior aos óvulos do *Golden*.

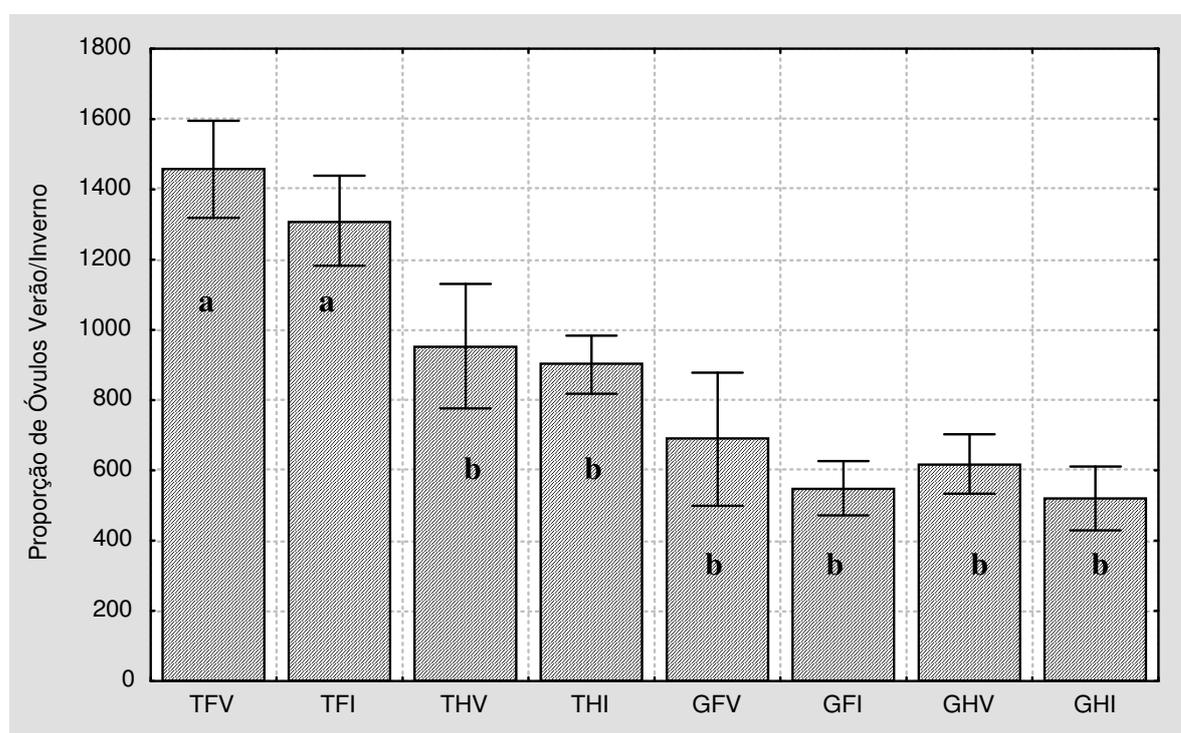


Figura 7. Proporção média de óvulos no mamoeiro observados no verão e inverno: *Tainung 01* Feminino Verão (TFV); *Tainung 01* Feminino Inverno (TFI). *Tainung 01* Hermafrodita Verão (THV); *Tainung 01* Hermafrodita Inverno (THI); *Golden* Feminino Verão (GFV); *Golden* Feminino Inverno (GFI); *Golden* Hermafrodita Verão (GHV); *Golden* Hermafrodita Inverno (GHI). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste “T” a 5% de probabilidade.

Damasceno Júnior *et al* (2007), analisando botões florais de mamoeiro, sexo hermafrodita das variedades *Golden* e *Tainung 01*, observou que há diferença estatística significativa na produção de seus óvulos. O autor encontrou

que o número médio de óvulos da variedade *Golden* (525) se apresentou superior em relação ao número médio de óvulos no *Tainung 01* (461).

4.5. Porcentagem de sementes viáveis/fruto

As sementes do mamoeiro são de coloração acinzentada ou preta, forma esférica medindo cerca de 5 milímetros de diâmetro (Nakasone & Paull, 1998). Neste estudo, as sementes consideradas viáveis apresentaram formato esférico e coloração preta, enquanto que as sementes consideradas inviáveis apresentaram coloração branca ou esbranquiçada e de tamanho pequeno (Figura 8); algumas vezes foram observados vestígios de óvulos não fertilizados. Pode-se também observar que a variedade *Tainung 01* apresenta sementes de tamanho maior que o *Golden*, ficando elas aderidas à parede da cavidade ovariana.

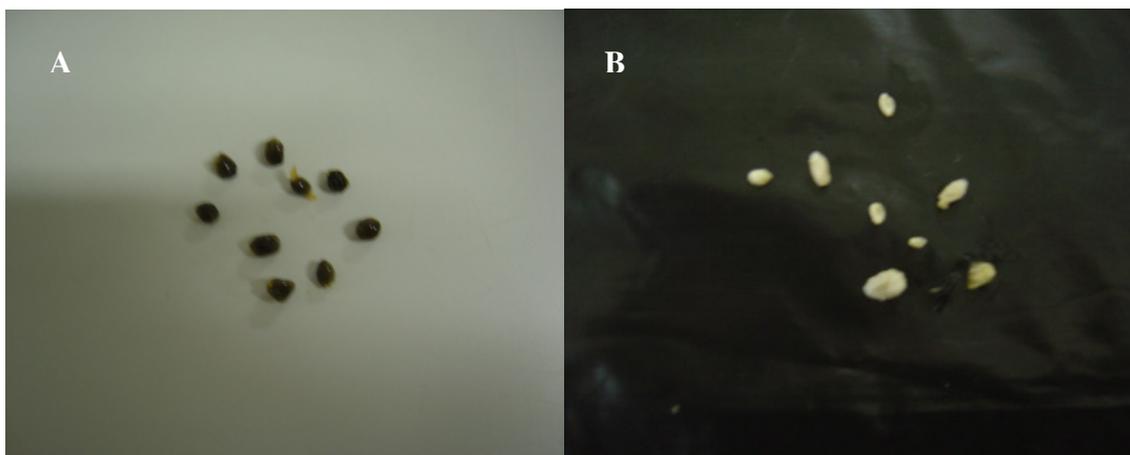


Figura 8. Sementes classificadas como inviáveis (A) e viáveis (B) observadas na variedade *Golden*, sexo hermafrodita. Observa-se na Figura 8A a presença de sementes não desenvolvidas (maiores) e vestígios de óvulos não fertilizados (menores).

As maiores médias para número total de sementes/fruto foram observadas na variedade *Tainung 01* (feminino), em ambas as épocas, sendo que em *Tainung 01* os dados obtidos no verão (média=1400,1) foram superiores aos dados observados no inverno (média=1175,4). Considerando os frutos advindos de plantas do sexo hermafrodita, o *Tainung 01* apresentou 636 sementes/fruto no verão e 632,8 no inverno enquanto que o *Golden* apresentou 448,9 sementes/fruto no verão e 443,2 sementes/fruto no inverno (Tabela 4, Figura 9). Einhardt (2006),

trabalhando com frutos do híbrido da variedade *Tainung 01*, observou que plantas do mamoeiro híbrido apresentou uma queda na produção de seus frutos, resultando em um número menor de sementes no verão do que na primavera.

A porcentagem média de sementes viáveis (Tabela 4, Figura 10) no genótipo *Tainung 01* foi de 96,52% em frutos advindos de plantas femininas e 82,03% em frutos advindos de plantas hermafroditas considerando as duas épocas de avaliação (verão e inverno). A variedade *Golden* apresentou uma porcentagem média de, aproximadamente, de 98% de sementes viáveis advindas de frutos femininos e 73,74% em frutos advindos de plantas hermafroditas. Esses dados não refletem o que a literatura relata, já que em frutos advindos de plantas hermafroditas espera-se, em média, 75% de sementes viáveis. O teste “qui-quadrado” aplicado aos dados em ambos os genótipos trabalhados foi significativo (18,85) indicando a rejeição da hipótese de 3 sementes viáveis: 1 semente inviável, ou 75% de sementes viáveis: 25% de sementes inviáveis. Considerando que de um modo geral a porcentagem de sementes viáveis observadas foi superior ao esperado, supõem-se que a letalidade no zigoto quando relacionada ao alelo M_2 pode ser restaurada quando ocorrer a fertilização ao receber o alelo m , permitindo assim que o número de sementes viáveis seja significativamente superior ao números de óvulos viáveis.

Pode-se verificar que os genótipos respondem diferentemente quanto à proporção de sementes viáveis nas épocas inverno e verão, sendo o maior percentual médio (85,78%) apresentado no verão. A variedade *Tainung 01* feminino teve um comportamento mais estável, já que tanto no verão (96,08%) quanto no inverno (96,97%) apresentou valores bem próximos, não diferindo estatisticamente (Figura 9). Por outro lado a *Tainung 01* hermafrodita teve uma proporção de sementes viáveis superior no verão (89,26%) do que no inverno (74,81%). A proporção de sementes viáveis na variedade *Golden* hermafrodita no verão (72,08%) foi ligeiramente inferior à do genótipo hermafrodita no inverno (75,40%). Apesar de esses dados não terem diferido estatisticamente, eles sugerem um comportamento diferenciado das variedades quanto à estação do ano. Segundo Wilcoch (2002), durante o inverno as condições ambientais faz com que ocorra a redução no sucesso do processo de polinização.

Durante a coleta dos dados experimentais observou-se que a distribuição de sementes inviáveis era aleatória dentro do fruto do mamoeiro. Essa observação indica que a inviabilidade das sementes não se deve a questões de crescimento de tubo polínico diferenciado e também não se deve a uma posição desprivilegiada do óvulo no interior do ovário. Observou-se também que a cavidade ovariana abrange uma parte maior da região apical do fruto e apresenta um espaço incompleto em seu interior, assim como diferença no tamanho e na quantidade das sementes dos frutos *Tainung 01* características provavelmente inerentes ao híbrido.

Tabela 4. Número total médio de sementes, proporção de sementes viáveis, limite inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) para os dados obtidos em duas variedades de mamoeiro, *Golden* e *Tainung 01*, sexos feminino e hermafrodita. Dados obtidos em duas épocas, verão e inverno de 2007, em Campos dos Goytacazes/ RJ.

Genótipo	Total médio	%	Intervalos		DP	CV%
			-----LI-----	-----LS-----		
		sement e viável				
TFV	1400,1	96,08	1201,2	1599,0	255,7	18,3
THV	636,0	89,26	377,5	894,5	332,3	52,3
GHV	448,9	72,08	367,4	530,4	104,7	23,3
Média	828,3	85,78	648,7	1007,9		
TFI	1175,4	96,97	1201,1	1599,0	354,6	30,1
THI	632,8	74,81	605,9	659,6	31,5	10,9
GHI	443,2	75,40	408,6	497,7	570,2	12,6
GFI	537,9	97,91	398,3	677,5	179,4	33,3
Média	697,3	64,27	953,8	858,4		

Intervalo de confiança para número de semente ao nível de 5% de significância. *Tainung 01* feminino verão (TFV), *Tainung 01* feminino inverno (TFI), *Tainung 01* hermafrodita verão (THV), *Tainung 01* hermafrodita inverno (THI), *Golden* hermafrodita verão (GHV), *Golden* feminino inverno (GFI), *Golden* hermafrodita inverno (GHI).

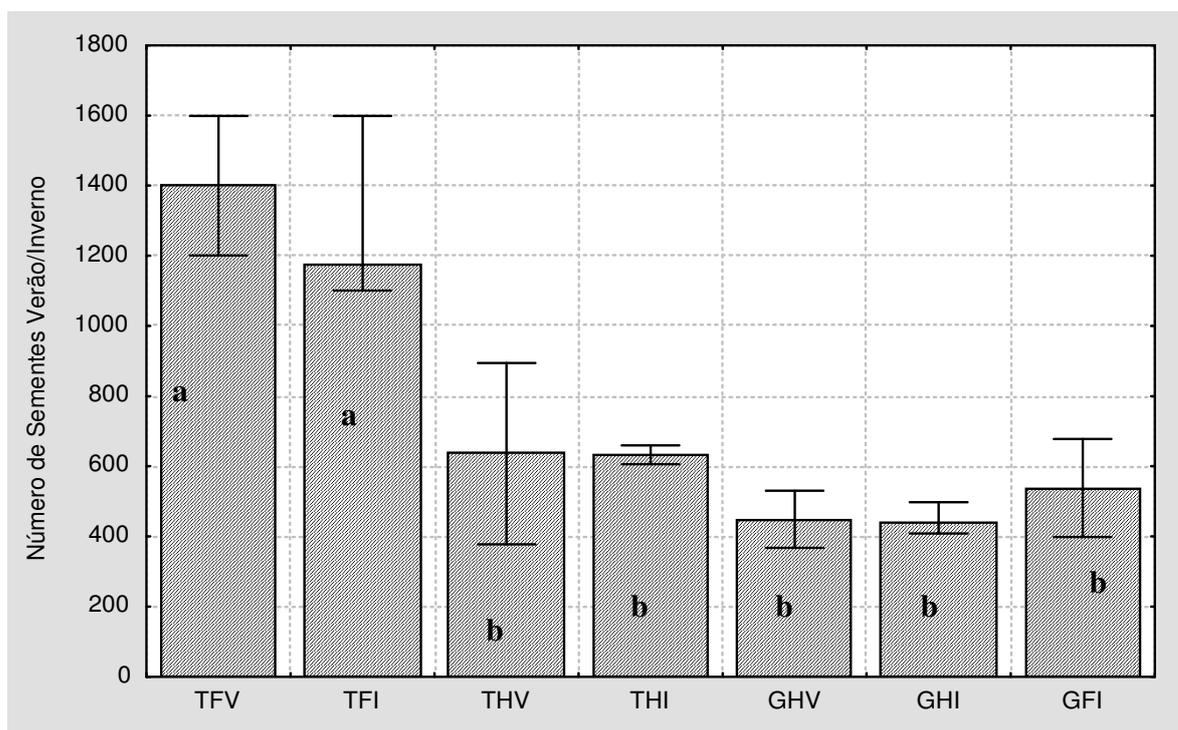


Figura 9. Número total médio de sementes em mamoeiro obtidos no verão e inverno: *Tainung01* feminino verão (TFV), *Tainung01* feminino inverno (TFI), *Tainung01* hermafrodita verão (THV), *Tainung01* hermafroita inverno (THI), *Golden* feminino inverno (GFI), *Golden* hermafrodita verão (GHV), *Golden* hermafrodita inverno (GHI). Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre sipelo teste “T” a 5% de probabilidade.

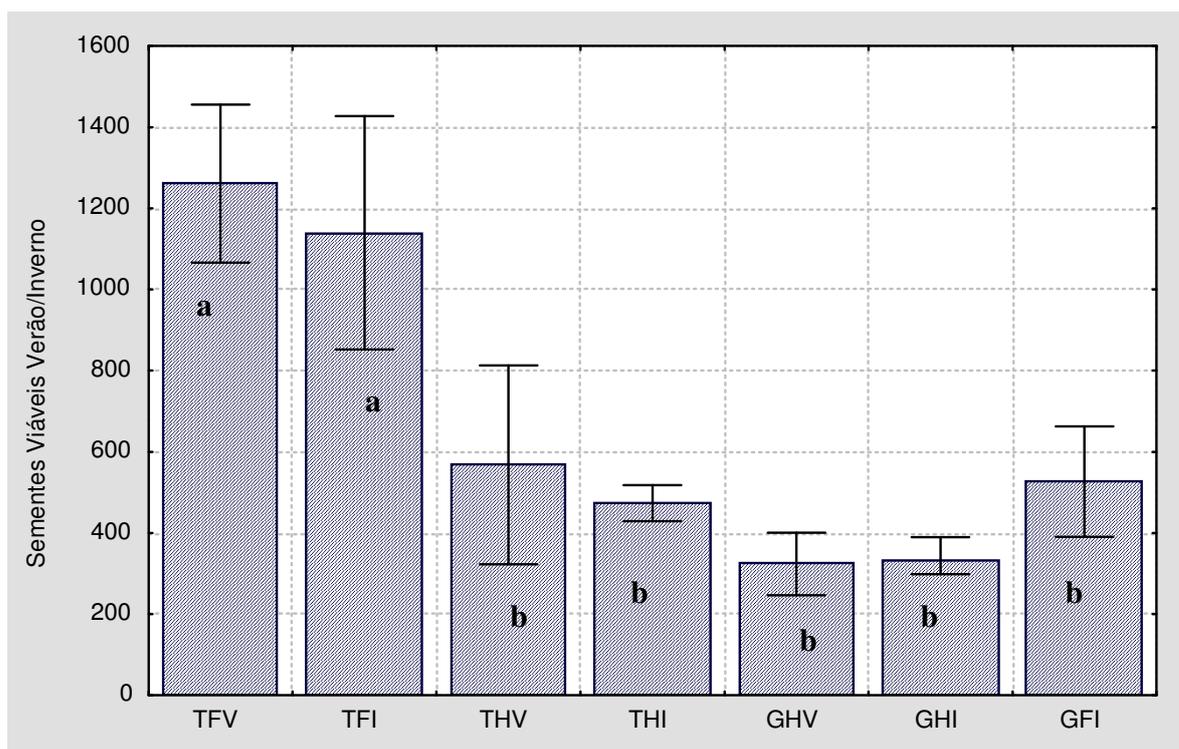


Figura 10. Intervalo de confiança para o número de sementes viáveis no verão e inverno: *Tainung* feminino verão (TFV), *Tainung* feminino inverno (TFI), *Tainung* hermafrodita verão (THV), *Tainung* hermafrodita inverno (THI), *Golden* hermafrodita verão (GHV), *Golden* hermafrodita inverno (GHI), *Golden* feminino inverno (GFI). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste “T” a 5% de probabilidade.

4.6. Análise da formação do embrião

A metodologia utilizada para a observação da formação do embrião permitiu a observação de algumas fases da formação do endosperma primário (Figura 11 A) e a presença do zigoto (Figura 11 B), Esse fato é indicativo de que o saco embrionário se apresentou em perfeito estado, com sete células e oito núcleos conforme descritos por Zoe e Caiyun (2004) no momento que o grão de pólen o alcançou, promovendo conseqüentemente a dupla fertilização, dando origem ao embrião (Figura 11 C). Infelizmente, não foi possível observar todas as fases de formação do embrião propriamente dito. Assim, iremos nos deter a descrever as fases observadas nas lâminas permanentes preparadas.

Pode-se notar também a camada interna de integumento (Figura 11 D) desaparecendo quase que completamente, devido ao crescimento do embrião,

permanecendo quase uma única camada do integumento. No final do processo os integumentos correspondem ao tegumento da semente madura e no mamoeiro o integumento interno forma a endotesta, enquanto o externo forma a sarcotesta (transparente e gelatinosa) da futura semente do mamoeiro (Lange, 1961), portanto estruturas muito importantes na cultura.

Verifica-se, ainda, que o embrião apresentou como conexão à parede do ovário o suspensor (Figura 11 D), que pode senescer na fase de torpedo, sendo que o suspensor é uma estrutura considerada como responsável em nutrir o embrião (Mansfield e Briarty, 1990). Os mesmos autores consideram o suspensor responsável pela secreção de enzimas hidrolíticas, que irão digerir o endosperma com função de absorver nutrientes e transferí-los para o embrião. Segundo Yueng e Meinke (1993), o suspensor é uma estrutura utilizada como canal que nutre o embrião, sendo que com o tempo esse acaba por degenerar em algumas espécies (Marsden e Meike, 1985).

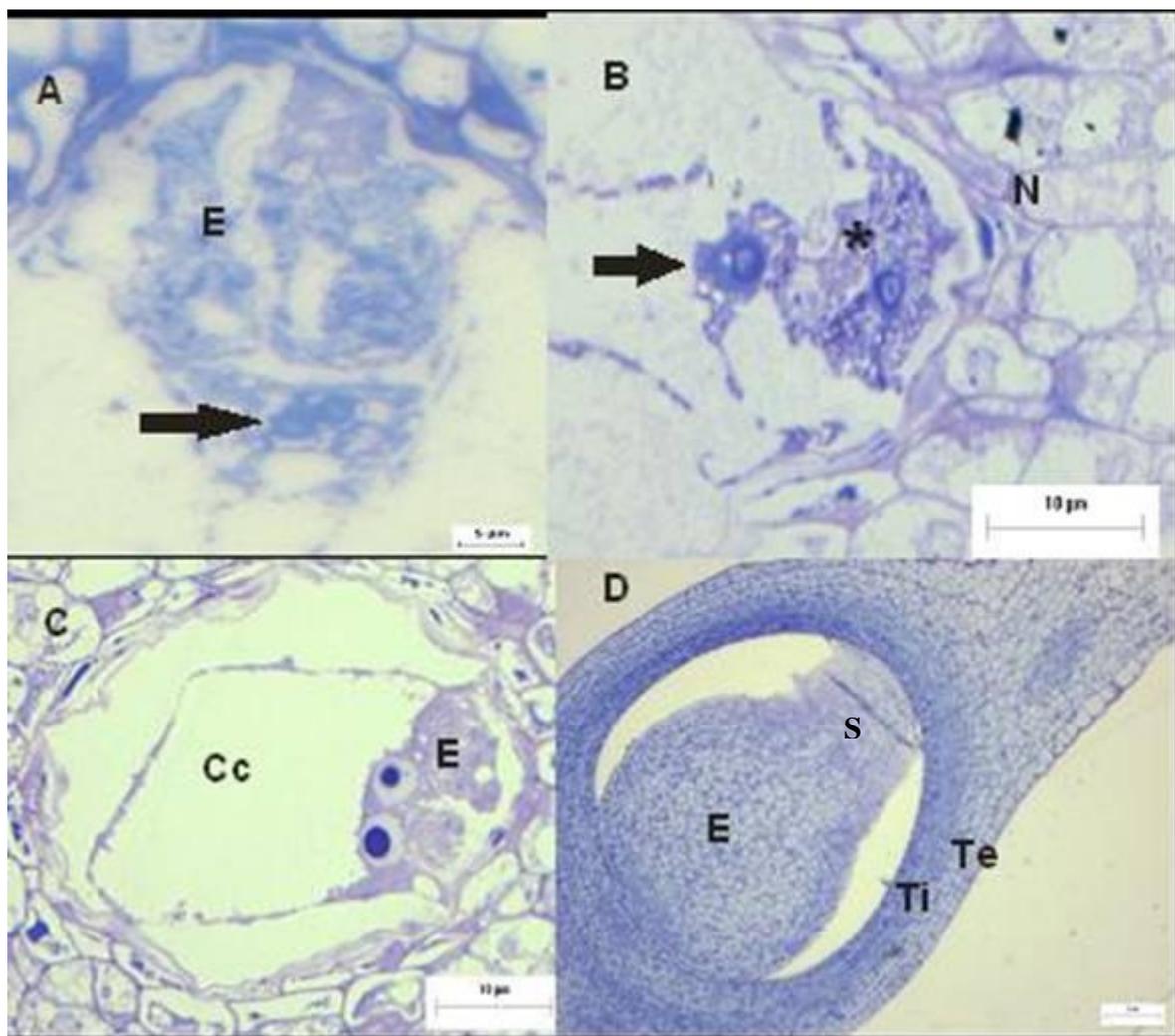


Figura 11. Algumas fases observadas durante a embriogênese em mamoeiro *Tainung 01*. A: Embrião (E); endosperma primário (seta) Barra: 5 µm. B: Nucela (N), endosperma primário (seta), parte do zigoto(*) Barra: 20µm. C: Embrião (E) e célula central do saco embrionário (Cc) Barra: 10 µm. D: Embrião na fase globular (E), Tegumento externo (Te), Tegumento interno (Ti), Suspensor (S) Barra: 30 µm. A e B: 24 horas, C: 72horas, D e E: 96 horas após a polinização.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho objetivou estudar a viabilidade gamética e zigótica e associa-la com a letalidade. O estudo foi realizado em plantas das variedades *Golden* (Grupo Solo) e *Tainung 01* (Grupo Formosa) cultivadas na Fazenda Romana (Empresa Caliman Agrícola S/A), município de Linhares, Estado do Espírito Santo e na área de convênio da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO/ Estação Experimental de Campos dos Goytacazes.

1- As variedades *Golden* e *Tainung 01* apresentaram boa viabilidade polínica, especialmente no verão;

2- As variedades apresentaram viabilidade do saco embrionário baixa, sendo que os menores valores foram observados na variedade *Golden*, sexo hermafrodita. Supõe-se que haja algum outro fator que esteja contribuindo para a viabilidade baixa dos óvulos em plantas de mamoeiro;

3- O saco embrionário do mamoeiro, feminino e hermafrodita, é do tipo *Polygonum*, apresentando oito núcleos, oosfera, duas sinérgides, três antípodas e dois núcleos polares;

4- A variedade *Tainung* 01, sexo feminino, apresentou o maior número de sementes por fruto e o maior número de sementes viáveis no verão, porém um pouco inferior ao número de sementes viáveis do *Golden* no inverno.

5- Os valores para o número de sementes viáveis não corresponderam aos esperados, supondo-se uma segregação de 3 viáveis: 1 inviável no caso do sexo hermafrodita;

7- Noventa e seis horas após a polinização o embrião do mamoeiro apresentou-se na forma globular, sugerindo ser necessário mais tempo após a polinização para se estudar a formação da semente do mamoeiro.

8- Com base nos dados obtidos, conclui-se que a letalidade observada no mamoeiro deve estar associada ao gameta feminino, devido à alta taxa de óvulos inviáveis, ou devido ao embrião. Neste último caso será necessário que os estudos de embriogênese sejam realizados em outros tempos após a polinização, incluindo também a questão da germinação e crescimento do tubo polínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrianual (2005) Anuário da Agricultura Brasileira, São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 536 p.
- Alexander, M P. (1969) Differential staining of aborted and non-aborted pollen. *Stain Technology*, 44; 117-122.
- Almeida, E. P. de, Nickel, O., Medina ,V. M., Cordeiro, Z. J. M. (1994) Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 52p. (FRUPEX. Série Publicações Técnicas, 9).
- Almeida, E.P. de, Nickel, O., Medina ,V. M., Cordeiro, Z. J. M. (1994) Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 52p. (FRUPEX. Série Publicações Técnicas, 9).
- Aradhya, M. K.; Manshardt, R. M.; Zee, F.; Morden, C. W. (1999) A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cp DNA intergenic spacer region. *Genetic resources and Crop Evolution*. 46: 579-586p.
- Arathi, K. N. Ganeshaiyah, R. Uma shaanker, and S.G Hegde. (1996). Factores affeting ambryo abortion in *Syzygium cuminii* (L.) Skeels (Myrtaceae). *Internacional journal of plant Science* 157: 49-52.
- Badillo V. M (2000) *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): con le rehabilitación de este ultimo. *Ernstia* 10:74-79.

- Badillo V. M (2001) Nota correctiva Vasconcellea St. Hil. y no Vasconcella (Caricaceae). *Ernstia* 11(1):75-76.
- Badillo, V. M. (1971) Monografía de la familia *Caricaceae*. Editorial Nuestra América C. A. Maracay Venezuela, 221p.
- Badillo, V. M. (1993) Caricaceae. *Revista de la Faculdade de Agronomia-Alcance*, v.43, 111p.
- Badillo, V. M. (2001) Carica L. V. S. Vasconcella St. Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10: 74-79.
- Bautista-Calles, F.; Zamudio. C. A.; Kezama. E. V. Niveles de N,P e K, anatomia de óvulos y presencia de tubos polínicos, y calosa en los ovarios abortivos de papaya (*Carica papaya* L.). *Chapingo Série Horticultura* 5 (2): 125-130, 1999.
- Benchimol, M.; Attias, M.; Cunha, N. L.; Carvalho, T. U. (1996) *Métodos de Estudo da Célula*. Teatral, Rio de Janeiro, v. 1, p. 142,.
- Bingham, E. T.; Hawkins-Pfeiffer, J. (1984) Female sterility in alfalfa due to a recessive retarding integument development. *J. Hered.* 75: 231-233.
- Cachoran, W. G. Técnicas de Amostragem. Rio de Janeiro. Fundo de Cultura, 1995, 555p.
- Cameron, B.G. e Prakash, N. (1994) Variations of the megagametophyte in the Papilionoideae. *Advances in legume systemetic 6: Strutral Botany*, 97-115.
- Corandie, W. (1992) Origin of the papaya. In: *Papaya*. Pretoria: Institute for tropical and subtropical crops, 3-4 p.
- Storey, W. B. (1941) The botany and sex relationship of the papaya. *Papaya production in the Hawaii Islands*. Honolulu, Hawaii Agricultural Experiment Station, 87: 5-22.
- Damasceno Junior, P. C. (2004) Estudo Reprodutivo em Mamoeiro (*Carica papaya*). Tese de Mestrado – Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Campos dos Goytacazes, RJ. 67p.
- Damasceno Junior, P. C. Costa. F. R. da, Neto, M. F, Pereira. T. N. S., Pereira. M. G. (2007). Cariotipagem convencional de três espécies da família caricaceae. *Boletim técnico 3º Reunião de Pesquisa do frutimamão*. p. 226-229.
- Datta, P. C. (1971) Chromosomal biotypes of *Carica papaya* Linn. *Cytologia*, 36: 555-562p.

- Desai, B. B.; Kotecha, P. M.; Salunkhe, D. H. (1997) Seed biology and biotechnology. In: Part I. Seeds Handbook – biology, production, processing and storage. p.7-27.
- Dornelas, M.C (2003) Desenvolvimento e diferenciação celular. *In*: Freitas, L.B. e Bered, F. Genética e evolução vegetal. Porto Alegre: Editora UFRGS, 463p.
- Einhardt, P. M. Correa, E. R. Raseira, M. C. (2006) Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen em pessegueiro. *Revista Brasileira fruct. Jaboticabal-SP*, V. 28, Nº21, 5-7p.
- Farias, A. R. N., Oliveira, A. M. G., Santos Filho, H. P., Dantas, J. L. L., Oliveira, M. A., Sanches, N. M., Medina, V. M. & Cordeiro, Z. J. M. A Cultura do Mamão. Brasília: Embrapa-SPI, Coleção Plantar, 37. 1998.
- Garret, A.(1995). The pollination biology of papaw (*Carica papaya* L.) in Central Queensland. PhD. Thesis, Central Queensland University, Rockhampton.
- Goldberg R. B.; Barker S. J.; Perez-Grau, L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56:149.
- Hofmeyr, J. D. J. (1938) Genetical studies of *Carica papaya* L., Africa Dept. Agric. For. Sci.Bul.,187: 1-64.
- Hofmeyr, J. D. J. (1939) Genetical studies of *Carica papaya* L., Africa Dept. Agric. For. Sci. Bul., 187: 1-64.
- Hofmeyr, J. D. J. (1967) Some genetic breeding aspects of *Carica papaya* L. *Agron. Trop.* 17:345-351.
- Horner, H. T.; Palmer, R. G. (1995) Mechanisms of genic male sterility. *Crop Science*, 35(6): 1527-1535.
- Horovitz, S., Zerpa, D. M., Arnal, H. (1953) Frecuencias de equilibrio de las formas sexuales en poblaciones de *Carica papaya* L. *Agronomia Tropical* 3: 149-174.
- Hossaert, M.; Valero, M. (1988) Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae: Papilionoideae). *American journal of botany* 75: 1714-1731.
- J. L. L., Santos, L. B. dos, Oliveira M. A., Souza Junior, M.T., Silva, M. J., Kapil, R. N e Bhatnagar, A. K. (1981) Utrastruture and Biology of female gametophyte in floring plants. *International review of cytology*, 70: 291-337.

- Kermode, A. R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 9: 155-195.
- Liu, Z.; Moore, P. H.; Ma, H.; Ackerman, C. M.; Ragiba, M.; Yu, Q.; Pearl, H. M.; Kim, M. S.; Charlton, J. W.; Stiles, J. I.; Zee, F. T.; Paterson, A. H.; Ming, R. (2004) A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature Publishing Group*, 427: 342-348p.
- Magdalita, P. M, Drews, R. A. Godwin, I. D., Adkins, S. W. (1998). An efficient interspecific hybridisation protocol for *Carica papaya* L. X *C. Cauliflora* jacq. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 523-530p.
- Maheshwari, P. (1950) An introduction to the embryology of angiosperms. New York: McGraw-Hill, 453p.
- Malavasi, M. M. (1997) Produção e tecnologia de sementes: Desenvolvimento e formação de sementes e plântulas. Lavras, UFLA/FAEPE, 97p.
- Mansfield, S., Briarty, S. (1990). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. *The developing embryo*. *Can. J. Bot.* 69, 461-476.
- Marin, S. L. D. (2004) Mamão papaya: produção, pós-colheita e mercado. *In: Semana Internacional da fruticultura, floricultura e agrindústria*, 11, Fortaleza: SINDIFRUTA-FRUTAL, 82p.
- Marin, S. L. D., Gomes, J. A., Salgado, J. S. (1986) Recomendações para a cultura do mamoeiro cv. Solo no Estado do Espírito Santo. 2.ed. Belo Horizonte: EMCAPA, 62p. (Circular Técnica, 2).
- Marin, S. L., Gomes, J. A., Silva, J. G. F., Salgado, J. S. (1994) Variação sazonal da produção do mamoeiro do grupo solo na região norte do Espírito Santo. *In: Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 13., 1994, Salvador. Resumos. Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura. V.2, 665p.
- Marsden, M. P. F.; Meinke, W. D. (1985) Abnormal development of the suspensor in an embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Amer. J. Bot.* 72(11): 1801-1812p.
- Martin. F. W. (1959). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain technol.* 34: 125-128
- McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *The plant cell*, 5: 1265-1275.

- McDade, L. A. (1983) Pollination intensity and seed set in *Trichanthera gigantea*. *Biotropica*, 15: 122-126.
- Miranda, I. P. A. (1993). A importância da conservação *in vitro* do pólen da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth)Arecaceae para o melhoramento genético. Pp. 361-171.In: Ferreira, E. J. G; Santos, G. M.; Leão, E. L. M. &Oliveira, L. A. (Eds.). Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia v. 2, SCT/INPA, Manaus.
- Nakasone, H. Y., e R. Z. Paull, (1998): Papaya. In H. Y. Nakasone, and R.Z. Paull(eds.) Tropical Fruits, 239-269. CAB International Press, Wallingford, UK.
- Oliveira, R. P. de, Farias, A. R. N., Santos Filho, H. P., Oliveira, J. R. P., Dantas, Pereira, T. N. S.; Ilarslan, H.; Palmer, R. G. (1997a) Genetic and cytological analyses of three lethal ovule mutants in soybean (*Glycine max*; leguminosae). *Genome*, 40: 273-285.
- Pereira, T. N. S.; Lersten, N. R.; Palmer, R. G. (1997b) Genetic and cytological analyses of a partial-female-sterile mutant (PS-1) in soybean (*Glycine max*; leguminosae). *American Journal of Botany*, 84 (6): 781-791.
- Reiser, L.; Fisher, R. L. (1993) The ovule embryo sac. *Plant Cell*. 5: 1291-1301.
- Robinson-Beers, K.; Pruitt, R. E.; Gasser, C. S. (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *The Plant Cell*, 4:1237-1249.
- Rolim, S.G., Couto, H. T. Z., Jesus, R.M (1999) Mortalidade e retrocruzamento de árvores na floresta Atlântica de Linhares (ES). *Scientia Forestalis* 55:49-69.
- Rosellini, D.; Ferranti, F.; Varonesil, F. (2005) Ovule sterility and seed set in alfalfa. Disponível em: www.naaic.org/TAG/TAGpapers/rosellini/rosellini.html. Acesso em 13/01/2005.
- SAEG-Sistema de Análises Estatísticas e genéticas (1997). Universidade Federal de Viçosa. Versão 9.0. Viçosa, MG: UFV,. 150p.
- Santos, L. M. S.(2004) Estudo da formação do gameta masculino de plantas de maracujá. Campos dos Goytacazes (RJ), 44p. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).
- Singh, R.J.(1993) Plant cytogenetics. United States: CRC.Inc.391p.

- Sondur, S. N.; Manshardt, R. M.; Stiles, J. I. (1996) A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 547-553.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S, Viana, P., Silva, L. C., Sudré, C. P. (2004). Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). *Beitr. Biol. Pflanzen* 73: 1-18.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Hoffmann, M., Melo, E., Louro, R. P. (2002). Embryo sac development in yellow passion fruit (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology* 25: 471-475.
- Storey, W. B. (1938) Segregation sex types in solo papaya and their application. To the selection of seed. *Proc. Soc. Hort. Sci.* 35: 83-85
- Storey, W. B. (1941) The botany and sex relationship of the papaya. *Papaya production in the Hawaii Islands*. Honolulu, Hawaii Agricultural Experiment Station, 87: 5-22.
- Storey, W. B. (1953) Genetics of the papaya. *J. Hered.*, Washington, n.2, 44: 70-78p.
- Sun, K. (2004). Ovule abortion in arabidopsis triggered by stress. *Plant physiology*, vol. 135, 2358-2367p.
- Taiz, L. e Zeiger, E. (1998) *Plant Physiology*. The Benjamin-Cummings Publishing Co., California, 559 p Schaal.
- Vishnyakova, M. A. (1991) Callose as an indicator of sterile ovules. *Phytomorphology* 41: 245-252.
- Yadegari, R. Drews, G. (2004). Female gametophyte development. *Plant cell*, 16: 133-141p.
- Yeung, E. C.; Meinke, D. W. (1993) Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *Plant Cell* 5, 1371-1381.
- Yim, K. O, Bradford, K. J. (1998) Callose deposition is responsible for apoplastic semipermeability of the endosperm envelope of muskmelon seeds, *Plant Physiol*, 118: 83-90.
- Zoe, A. Caiyun, Y, (2004). Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development . *Society for Reproduction and Fertility*, 128, 483-492.