

## Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.)

Pedro Corrêa Damasceno Junior<sup>1</sup>  
Telma Nair Santana Pereira<sup>1</sup>  
Messias Gonzaga Pereira<sup>1</sup>  
Francisco Filho da Silva<sup>1</sup>

### RESUMO

A viabilidade e a conservação de grãos de pólen são importantes fatores a serem considerados na conservação de germoplasma e em programas de melhoramento. Esta pesquisa teve como objetivos selecionar o melhor corante para análise da viabilidade polínica em mamoeiro, e determinar o período e ambiente de conservação de grãos de pólen de dois cultivares de mamoeiro, Golden e Tainung 01. Para o primeiro caso, foram testados dois corantes (FCR e solução de Alexander), enquanto para conservação dos grãos de pólen botões florais na antese foram coletados, colocados em recipientes plásticos e mantidos em dois ambientes, freezer (-18° C) e geladeira (12° C), por 60 dias. Antes e após o período de conservação, os grãos de pólen tiveram sua viabilidade testada. A análise de variância indicou que os dois métodos de análise da viabilidade polínica não diferiram estatisticamente, conforme Teste “t” a 5% de probabilidade. A solução de Alexander é mais simples de preparar e mais viável economicamente quando comparada com o método FCR. Assim sendo, o primeiro método foi selecionado para testar a viabilidade polínica dos grãos de pólen conservados. Os resultados indicaram que a conservação dos grãos de pólen em botão floral para os cultivares Tainung 01 e Golden foi viável por 60 e 30 dias, respectivamente. O cultivar Golden apresentou drástica redução na viabilidade aos 60 dias de armazenamento. Não foi observada diferença estatística significativa entre os ambientes de conservação.

**Palavras-chave:** Viabilidade de grãos de pólen, FCR, Solução de Alexander.

### ABSTRACT

#### Conservation of papaya (*Carica papaya* L.) pollen grain

The viability and conservation of pollen grain is an important factor in germplasm conservation and plant breeding programs. The objectives of this research were to determine the best stain for testing papaya pollen viability, the best time and the best environment to preserve pollen grains of two papaya cultivars, Golden and Tainung 01. For the first objective, the dyes FCR test and Alexander's solution were tested. For pollen grain conservation, flower buds at anthesis were collected, put in plastic vials, and kept in freezer (-18°C) and refrigerator (12°C) environments for 60 days; before and after the conservation period pollen grains had their viability tested. The analysis of variance showed that the two stain methodologies were not statistically different based on “t” Test at 5% of probability; since the Alexander's solution is a cheaper and easier procedure compared with the FCR test, the former was selected as the procedure to test the pollen grain viability. The results showed the pollen grain conservation in floral buds was viable during 30 and 60 days for cultivars Golden and Tainung 01, respectively. Cultivar Golden had a drastic viability decrease at 60 days storage. There was no significant difference between the conservation environments.

**Key words:** pollen grain viability, FCR, Alexander's solution.

Recebido para publicação em julho de 2007 e aprovado em setembro de 2008

<sup>1</sup> Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000. 28.013-600. Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. E-mail: pedroj@uenf.br, telmasp@uenf.br

## INTRODUÇÃO

A conservação de grãos de pólen é um procedimento muito importante em programas de melhoramento genético, principalmente quando se pretende cruzar seleções ou cultivares que não têm florações coincidentes. A conservação de grãos de pólen é também um método indicado para trabalhos de conservação e intercâmbio de germoplasmas (Hanna, 1994). Na conservação de grãos de pólen, o principal propósito é a manutenção da sua viabilidade.

Os programas de melhoramento genético utilizam com certa frequência a hibridação entre genótipos, que, muitas vezes, podem estar em ambientes diferentes. Além disso, é comum haver em plantios de mamoeiro plantas hermafroditas com reversão sexual, já que quase todos os genótipos de mamão são vulneráveis a este fenômeno. De acordo com Damasceno Junior (2004), tais anomalias podem ser herdáveis. Assim sendo, é importante para o melhorista identificar no campo genótipos com menor incidência de reversão sexual e outras anomalias florais (carpeloidia e pentandria) e conservar os grãos de pólen dessas plantas para uso futuro em programas de melhoramento, visando à redução dessas anomalias florais.

Os fatores mais importantes para que a conservação dos grãos de pólen seja bem sucedida são a temperatura do armazenamento e o teor de umidade do material. Com a redução de ambos, a viabilidade dos grãos de pólen tende a aumentar (Pickert, 1988).

Antes, durante e após o período de conservação dos grãos de pólen, é necessário monitorar a sua viabilidade. Dessa forma, pode-se estabelecer o período máximo em que os grãos de pólen podem permanecer conservados sem perder a capacidade de germinar e fertilizar. Segundo Dafni (1992), a avaliação da viabilidade dos grãos de pólen é o primeiro passo no entendimento das chances que ele tem de germinar no estigma da flor, sendo esse um estágio crucial rumo à fertilização. A viabilidade do grão de pólen pode ser estimada por vários métodos: coloração (para isso podem ser utilizados diversos corantes como solução de lugol, método de reação fluorocromática (Fluorochromatic Reaction - FCR), solução tripla de Alexander e corantes vitais como o sal de tetrazólio) e as geminações *in vivo* e *in vitro*.

A solução tripla é um corante diferencial que distingue bem grãos de pólen viáveis de inviáveis na maioria das angiospermas (Alexander, 1969). Porém, o método FCR é o mais indicado para determinar a viabilidade, a germinação e a capacidade de fertilização, quando comparado com outros corantes, em razão de apresentar alta correlação com o potencial de germinação de grãos de pólen maduros, refletindo assim uma situação real *in vivo*. A única desvantagem do método é utilizar fluorocromos e, conseqüentemente, necessitar de microscópios equipados com fluorescência (Dafni, 1992).

O objetivo desta pesquisa foi selecionar um corante adequado e prático para a análise da viabilidade polínica em mamoeiro, bem como determinar qual o melhor período e ambiente de conservação de grãos de pólen de dois cultivares de mamoeiro, Golden e Tainung 01, armazenados diretamente no botão floral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal*

Os materiais genéticos utilizados nesta pesquisa foram os cultivares Golden, representando o grupo Solo, e o Tainung 01, representando o grupo Formosa. As coletas foram realizadas em plantios comerciais pertencentes à Empresa Caliman Agrícola S.A., localizada no município de Linhares, ES. As plantas estavam dispostas em fileira dupla, com espaçamento de 3,5 x 2,0 x 1,8 m. O sistema de irrigação foi do tipo microaspersão, e todo o manejo das plantas foi efetuado conforme recomendações para a cultura (Marin *et al.*, 1995). A coleta dos botões florais utilizados no teste de conservação dos grãos de pólen foi realizada no dia 15 de fevereiro de 2004, às 8 h.

### *Teste de coloração*

Para dar suporte ao teste de conservação dos grãos de pólen, foi necessário estabelecer um protocolo para avaliar a capacidade germinativa dos grãos de pólen. Assim sendo, testaram-se dois corantes: solução tripla de Alexander (Alexander, 1969) e reação fluorocromática (Fluorochromatic Reaction - FCR) (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970).

Quinze botões florais hermafroditas/cultivar próximos da abertura foram coletados, fixados em etanol 70% e conservados a 12 °C. Para o preparo das lâminas foram utilizados dois anteras/botão/cultivar/métodos, sendo o mesmo botão avaliado pelos dois métodos. No método proposto por Alexander (1969), as anteras foram maceradas numa gota do corante (solução tripla). Depois de retirado o excesso de corante, com papel filtro e após cinco minutos, as lâminas foram observadas sob campo claro em microscópio óptico (Olympus BX 60, EUA). Os grãos de pólen foram classificados como normais/viáveis ou anormais/inviáveis, baseado na reação dos grãos de pólen com a solução, a qual permite a distinção entre grãos de pólen viáveis de inviáveis.

Para a reação fluorocromática (FCR), duas anteras/botão/cultivar foram hidratadas por cinco minutos em água destilada. Após esse período, foram maceradas em gota do corante diacetato de fluoresceína para liberação dos grãos de pólen. Posteriormente, a lâmina foi montada com lamínula e observada sob microscópio de fluorescência (Olympus BX 60, EUA), utilizando-se o filtro com comprimento de onda para emissão de 520 nm e excitação de 495 nm. Grãos de pólen mal formados, ou seja, com o citoplasma contraído, fluorescentes ou não, pouco fluorescentes e sem fluores-

cência foram considerados inviáveis, conforme Gwyn & Stelly (1989), enquanto os circulares e fluorescentes foram tidos como viáveis.

Para cada método foram avaliadas 15 lâminas/cultivar/método, sendo em cada uma contados 250 grãos de pólen, totalizando 15.000. Os dados foram analisados no Programa Genes (Cruz, 2001), utilizando-se o teste “t” para comparação de médias.

### Teste de conservação dos grãos de pólen

Botões florais hermafroditas na antese foram coletados e acondicionados individualmente em recipientes tubos plásticos devidamente etiquetados. As amostras foram acondicionadas em geladeira, a uma temperatura de 12 °C, e em freezer, a uma temperatura de – 18 °C.

Antes de se iniciar o armazenamento, cada botão floral a ser armazenado teve sua viabilidade polínica monitorada via Solução de Alexander (coloração definida no experimento anterior), indicando que todos os botões apresentavam viabilidade polínica superior a 90%. Após o monitoramento, um botão/genótipo/frasco foi colocado nos dois ambientes (cinco frascos na geladeira e cinco no freezer). Após sete, 14, 21, 30 e 60 dias de conservação foi retirado um frasco de cada ambiente e de cada genótipo para avaliação da viabilidade polínica, sendo depois descartado. Foram preparadas quatro lâminas/botão, cada uma com duas anteras, as quais foram maceradas no corante (Solução de Alexander) e depois observadas em microscópio ótico (Olympus BX 60, EUA). Para cada lâmina foram contados os grãos de pólen viáveis e os inviáveis, totalizando 500 por lâmina.

Foram realizadas análises estatísticas utilizando o Teste “t” para comparação de médias entre os genótipos, entre os ambientes, entre os ambientes dentro de cada genótipo e entre as épocas dentro de cada ambiente para cada genótipo. Os dados foram analisados no Programa Genes (Cruz, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

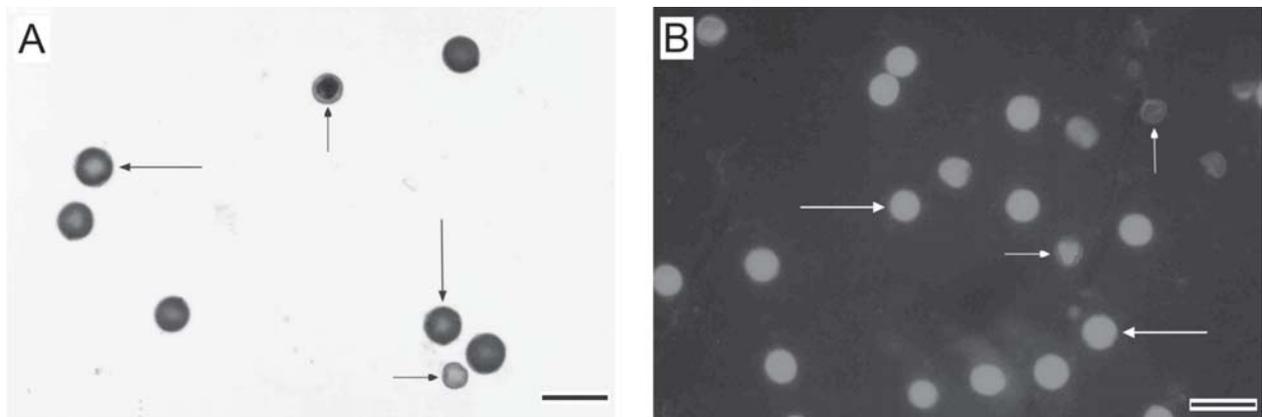
### Teste de coloração

Não foi observada diferença significativa, pelo Teste “t” ( $P>0,05$ ), entre os testes de coloração utilizados nesta pesquisa, ou seja, resultados semelhantes foram observados utilizando tanto a solução tripla de Alexander (Figura 1A) quanto a reação fluorocromática (FCR) (Figura 2B). Para a viabilidade polínica entre os cultivares Golden e Tainung 01, houve diferença significativa pelo Teste “t” ( $P<0,01$ ), em que médias apresentaram valores de 82,28 e 94,30% (Tabela 1), respectivamente.

Pickert (1988), trabalhando com grãos de pólen maduros reidratados de *Arabidopsis thaliana*, observou correlação significativa entre os testes de germinação in vitro e FCR, encontrando 80 e 87% de viabilidade polínica, respectivamente. Esse mesmo autor justifica porcentagens de viabilidades maiores para os testes de coloração, explicando que tal fato pode ser devido às condições subótimas do meio de cultura utilizado no procedimento in vitro, ou em função das enzimas reagirem com o FCR nas membranas intactas de alguns grãos de pólen, porém eles não apresentavam a capacidade de emitir tubo polínico.

Na Tabela 1 observam-se, para o cultivar Golden, valores semelhantes estatisticamente para a viabilidade polínica utilizando-se os dois métodos de coloração, sendo os valores de 81,97 e 82,58% respectivamente para a Solução de Alexander e o FCR. No cultivar Tainung 01 as viabilidades encontradas entre os testes utilizando a solução de Alexander e FCR foram de 93,77 e 94,82% (Tabela 1), respectivamente, também não havendo diferença significativa pelo Teste “t” ( $P>0,05$ ).

Considerando que o teste de Alexander (Alexander, 1969) é menos oneroso, mais simples, prático e por não ter apresentado diferença estatística significativa quando comparado com a reação fluorocromática (FCR), que é mais complexa e mais onerosa, optou-se por utilizar a solução de Alexander para monitorar a viabilidade



**Figura 1.** Viabilidade de grãos de pólen de mamoeiro. Grãos de pólen corados com: (A) Solução Tripla de Alexander (Alexander, 1969); e (B) diacetato de fluoresceína (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison, 1970). Setas maiores indicam grãos de pólen viáveis e as menores grãos de pólen inviáveis. Barra = 50  $\mu$ m.

**Tabela 1.** Porcentagem média da viabilidade polínica em mamoeiro, cultivares Golden e Tainung 01, utilizando dois métodos, solução tripla de Alexander e reação fluorocromática (Fluorochromatic Reaction (FCR) test). Médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo teste t

	Golden	Tainung 01	Média
Solução Alexander	81,97 bA	93,77 aA	87,87 A
FCR	82,58 bA	94,82 aA	88,70 A
Média	82,28 b	94,30 a	88,29

Obs.: Letras minúsculas comparam médias na linha e letras maiúsculas comparam médias na coluna.

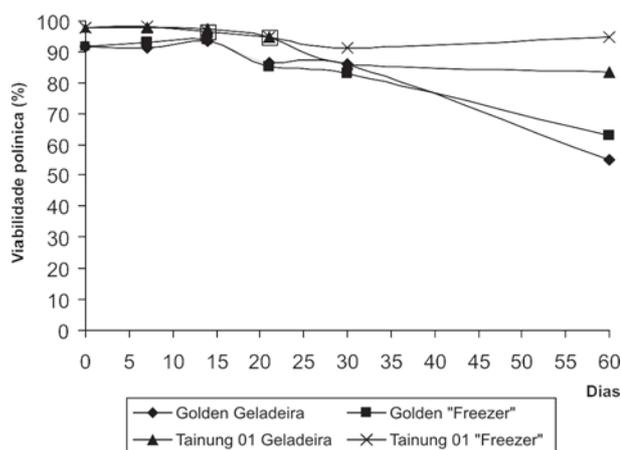
polínica do material conservado. Com isso, pode-se otimizar a avaliação da viabilidade pela utilização de reagentes mais acessíveis e a não utilização de microscopia de fluorescência, necessária quando se utiliza o teste FCR. Além disso, o método de Alexander (Alexander, 1969) tem alta confiabilidade para o discernimento entre grãos de pólen viáveis e inviáveis, visto a semelhança de resultados com uma das técnicas mais aceitas e recomendadas para avaliação da viabilidade de grãos de pólen, o teste FCR.

#### Teste de conservação dos grãos de pólen

Estatisticamente não houve diferença significativa pelo Teste “t” ( $P > 0,05$ ) entre os ambientes de conservação, geladeira e freezer (Tabela 2), porém, para cada genótipo, observam-se valores maiores de viabilidade polínica aos 60 dias de armazenamento no ambiente freezer. A média de viabilidade no freezer foi de 89,37%, enquanto na geladeira foi de 87,16% (Tabela 2). Segundo Cohen *et al.* (1989), o armazenamento de grãos de pólen de mamoeiro a uma temperatura de 5 °C foi satisfatório quando eles foram conservados por dois meses, porém, por um período mínimo de seis meses, a temperatura que gerou um melhor resultado foi a de -18 °C em freezer. Os grãos de pólen do mamoeiro podem ser conservados por no mínimo seis meses se acondicionados a

10 °C, com umidade relativa do ar em torno de 10% (Storey, 1969). Griggs *et al.* (1953) recomendam que os grãos de pólen de algumas fruteiras podem ser mantidos congelados a -18 °C sem controle de umidade relativa em freezer por mais de um ano. Como descrito na Tabela 2, o cultivar Tainung 01 apresentou a maior porcentagem de viabilidade dos grãos de pólen, com média geral de 93,49%, e o Golden, com 83,04% de grãos de pólen viáveis, considerando todos os períodos de armazenamento, apresentando diferença estatística significativa entre os cultivares.

O cultivar Golden apresentou decréscimo na viabilidade dos grãos de pólen a partir de 21 dias de armazenamento nos dois ambientes de acondicionamento (Tabela 2 e Figura 2), sendo observado tal decréscimo quando as médias atingiram 86,35 e 85,20% na geladeira e no freezer, respectivamente. Com 60 dias, observou-se claramente redução drástica da viabilidade nos dois ambientes de armazenamento, sendo esses valores significativos estatisticamente. No freezer, a redução da viabilidade foi menor do que na geladeira, sendo



**Figura 2.** Viabilidade polínica de grãos de pólen em dois cultivares de mamoeiro, Golden e Tainung 01, armazenados durante sete, 14, 21, 30 e 60 dias, em dois diferentes ambientes de acondicionamento, geladeira e freezer.

**Tabela 2.** Porcentagem média de viabilidade polínica e desvio-padrão em dois cultivares de mamoeiro Golden e Tainung 01 avaliados em seis períodos de armazenamento em dois ambientes diferentes de acondicionamento (geladeira e freezer). Médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo teste t

Coleta	Golden		Tainung 01	
	*91,60±2,06 a		*97,90±1,15 a	
Período	Geladeira	Freezer	Geladeira	Freezer
7 dias	91,05±1,40 a	93,15±1,58 a	97,85±0,91 a	98,05±1,10 a
14 dias	93,50±2,50 a	94,10±1,82 a	97,55±0,41 a	96,40±1,98 a
21 dias	86,35±0,85 b	85,20±5,59 ab	94,75±0,39 b	94,70±2,47 b
30 dias	86,10±3,20 b	83,10±2,56 b	86,20±4,34 c	91,20±3,41 b
60 dias	55,00±10,00 c	62,90±5,30 c	83,30±3,98 c	94,95±1,37 b
**Média/ambiente/genótipo	82,40±15,04 A	83,69±12,02 A	91,93±6,61 A	95,06±3,06 A
Média/genótipo	83,04±13,07 Freezer = 89,37±10,39 a			
Média/ambiente	Geladeira = 87,16±12,44 a		93,49±5,24 b	

\*Letras minúsculas na coluna comparam entre épocas.\*\*Letras maiúsculas na linha comparam entre ambientes dentro de cada genótipo.

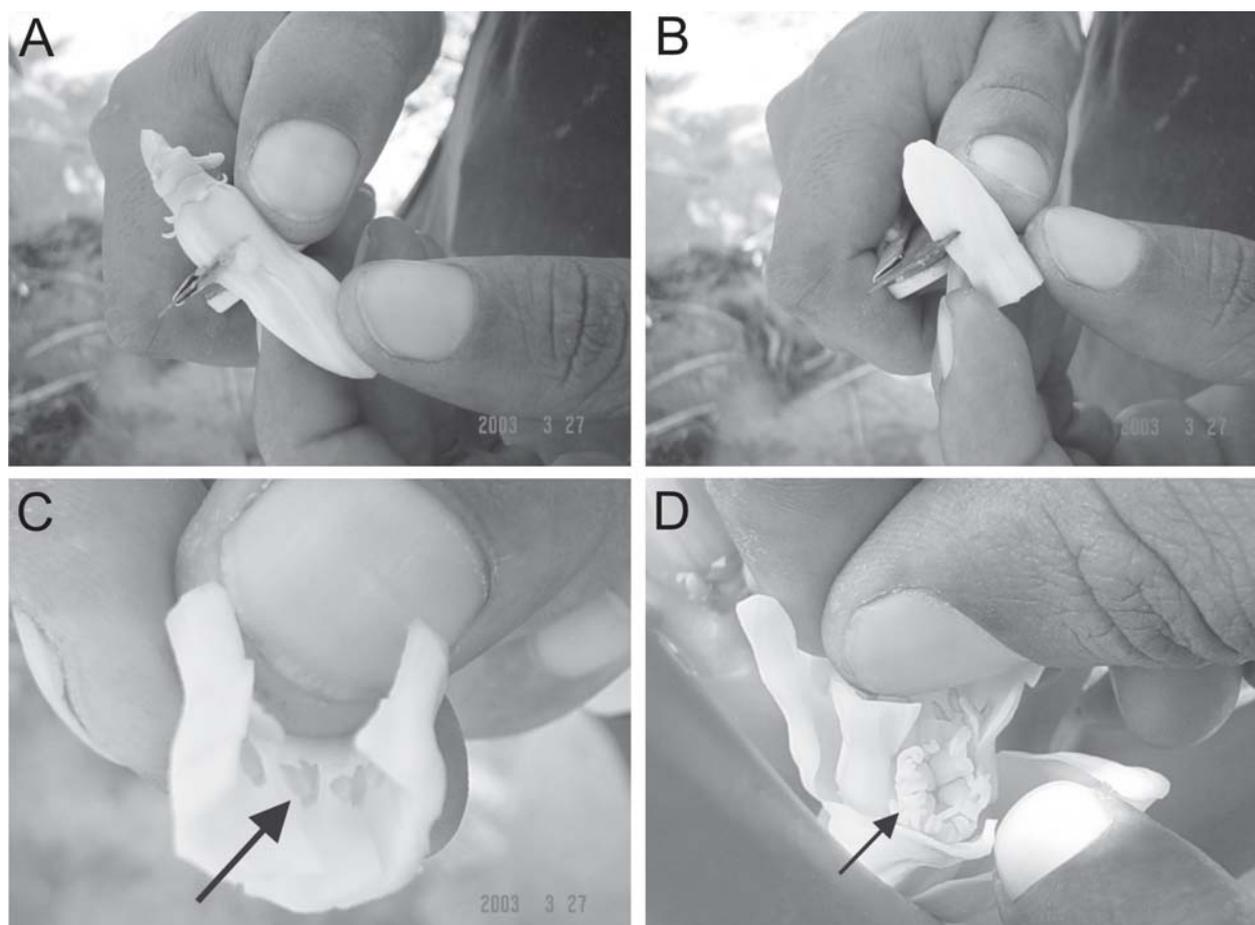
as médias de 62,90 e 55,0%, respectivamente (Tabela 2). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os dois ambientes testados, geladeira e freezer, utilizando-se o Teste “t” para o cultivar Golden. De acordo com Ganeshan (1986), não existiu diferença significativa na viabilidade dos grãos de pólen do cultivar Washington (*Carica papaya* L.) e *Carica cauliflora* L. após 485 dias de conservação em nitrogênio líquido. A viabilidade dos grãos de pólen frescos (57,54% em *C. Papaya* e 67,67% em *C. Cauliflora*), quando comparada com a viabilidade após cada intervalo de armazenamento (sete, 30, 60, 90, 180, 365 e 485 dias), exibiu resposta uniforme à criopreservação, e não houve interação significativa entre espécie e período de armazenamento.

Com 60 dias de armazenamento, os grãos de pólen do cultivar Tainung 01 apresentaram maior resistência ao armazenamento em relação ao Golden. Porém, no ambiente geladeira, observou-se, a partir de 30 dias, ligeira queda na viabilidade dos grãos de pólen do Tainung 01, quando essa passou de 94,75 para 86,20% (Tabela 2 e Figura 2), sendo estes valores estatisticamente distintos. Não houve diferença significativa pelo Teste “t” entre os ambientes geladeira e freezer, considerando o cultivar Tainung 01, porém no ambi-

ente freezer observa-se (Tabela 2) que os valores finais da viabilidade polínica foram superiores aos valores finais no ambiente geladeira.

Pode-se inferir que no ambiente freezer houve menor atividade metabólica dos grãos de pólen, principalmente no cultivar Tainung 01, por isso observou-se maior viabilidade desses neste tipo de ambiente, porém, como já mencionado, tanto para o Golden quanto para o Tainung 01 não houve diferença estatística significativa entre os ambientes geladeira e freezer. Visser (1955) relatou que a longevidade dos grãos de pólen armazenados depende da redução da sua atividade fisiológica. Em geral, os grãos de pólen da maioria das espécies alcançam melhor viabilidade em umidades relativas de zero a 30%, contudo, o ótimo de umidade relativa varia com a temperatura de armazenamento (Galletta, 1983).

Alguns problemas foram detectados no decorrer do presente experimento, como a incidência de fungos nas peças florais dos botões armazenados, indicando a necessidade de aprimoramento da técnica de conservação proposta no presente trabalho. Entretanto, no processo de polinização artificial (Figura 3 A-D) utilizado nos programas de melhoramento do mamoeiro tal alteração não se constitui em fator limitante.



**Figura 3.** Processo de polinização manual em mamoeiro. Flores hermafroditas (A e B) são dissecadas para retirada das pétalas (C), onde estão aderidos os estames com suas respectivas anteras (seta), sendo o conjunto depositado sobre as papilas estigmáticas (seta) de uma flor feminina (D).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que em alguns casos o valor da viabilidade polínica inicial de dado período foi inferior ao da viabilidade do período subsequente. Estatisticamente não se observou diferença significativa entre os valores de viabilidade polínica de tais períodos; dessa forma, não se pode considerar que houve elevação da viabilidade em determinados períodos de armazenamento. De acordo com Baéz *et al.* (2002), Gibernau *et al.* (2003) e Khan & Perveen (2006), em grãos de pólen armazenados não se observa aumento de viabilidade polínica com o passar do período de armazenamento, mas sim decréscimo. Portanto, os resultados mencionados no presente trabalho estão de acordo com a literatura, ou seja, com o passar do tempo observou-se redução significativa da viabilidade dos grãos de pólen armazenados.

## CONCLUSÕES

Não foi observada diferença significativa entre os resultados encontrados utilizando a solução tripla de Alexander e o teste FCR nos dois cultivares estudados, recomendando-se a utilização da solução tripla de Alexander para trabalhos de viabilidade de grãos de pólen frescos ou armazenados em mamoeiro.

De modo geral, a viabilidade dos grãos de pólen do cultivar Tainung 01 é mais alta que a dos grãos de pólen do Golden em qualquer condição de armazenamento.

É possível conservar os grãos de pólen do cultivar Golden e Tainung 01 diretamente no botão floral acondicionados em geladeira ou freezer por 30 e 60 dias, respectivamente.

Estatisticamente, os ambientes geladeira e freezer não apresentaram diferenças significativas para os grãos de pólen armazenados no botão floral, semelhante também quando se consideram os dois ambientes dentro de cada cultivar.

## AGRADECIMENTOS

À FAPERJ, FINEP e à Empresa Caliman Agrícola S/A.

## REFERÊNCIAS

- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, 44:117-122.
- Baéz P, Riveros M & Lehnebach C (2002) Viability and longevity of pollen of *Nothofagus* species in south Chile. *New Zealand Journal of Botany*, 40:671-678.
- Cohen E, Lavi U & Spiegel-Roy P (1989) Papaya pollen viability and storage. *Scientia Horticulturae*, 40:317-324.
- Cruz CD (2001) Programa genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 648.
- Dafni A (1992) *Pollination ecology – a practical approach*. New York, Oxford University Press Inc., 250.
- Damasceno Junior PC (2004). Estudo reprodutivo em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Dissertação de mestrado. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 67 p.
- Galletta GJ (1983) Pollen and seed management. In: Moore JN, Janick J (eds) *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press. 23-47 p.
- Ganeshan S (1986) Cryogenic preservation of papaya pollen. *Scientia Horticulturae*, 28:65-70.
- Gibernau M, Marquart D & Diaz A (2003) Pollen viability and longevity in two species of *Arum*. *Aroideana*, 26:58-62.
- Griggs WH, Vansell GH & Iwakiri BT (1953) The storage of hand-collected and bee-collected pollen in a home freezer. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 62:304-305.
- Gwyn JJ & Stelly D (1989) Method to evaluate pollen viability of upland cotton: tests with chromosome translocations. *Crop Science*, 29:1165-1169.
- Hanna, WN (1994) Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. *Crop Science*, 34:1681-1682.
- Heslop-Harrison J & Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence, intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45:115-120.
- Khan SA & Perveen A (2006) Germination capacity of stored pollen of *Abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) and their maintenance. *Pak. J. Bot.*, 38:233-236.
- Marin SLD, Gomes JA, Salgado JS, Martins D dos S & Fullin EA (1995) Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no estado do Espírito Santo. Vitória, ES, EMCAPA. P. 57. (Circular Técnica, nº 3).
- Pickert M (1988) In vitro germination and storage of trinucleate *Arabidopsis thaliana* (L.) pollen grains. *Arabidopsis Inf. Service*, 3:39-42.
- Storey WB (1969) Papaya. In: Ferwerda, FP, Wit F (eds.) *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Wageningen, 389-407 p.
- Visser T (1955) Germination and storage of pollen. *Meded Landb. Hogesch. Wageningen*, 55:1-68.