

Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração

HISTER, C.A.L.^{1*}; TEDESCO, S.B.¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Departamento de Biologia, Av. Roraima, 1000, Prédio 16, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900.

*Autor para correspondência: carmineh@gmail.com

RESUMO: A análise histoquímica dos grãos de pólen através do uso de corantes permite a determinação de sua viabilidade polínica. O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência dos corantes orceína acética 2% e reativo de Alexander modificado, para estimar a viabilidade polínica de vinte acessos de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) – uma árvore de frutos muito apreciados que também é utilizada para fins medicinais. Botões florais na pré-antese foram coletados e fixados em etanol:ácido acético (3:1) por 24 horas, após os botões foram transferidos para etanol 70% e mantidos sob refrigeração. A técnica de esmagamento das anteras foi utilizada no preparo das lâminas. Para cada acesso foram preparadas 2 lâminas por corante e analisados 500 grãos de pólen por lâmina. A viabilidade polínica foi estimada através da porcentagem de grãos de pólen viáveis. De modo geral, observou-se que os grãos de pólen corados com orceína acética 2% apresentaram viabilidade alta, acima de 98,1%, e os acessos não diferiram entre si. A viabilidade polínica através da coloração com a solução de Alexander variou de 43% (acesso Silveira Martins 1) a 97% (acesso Candelária 1), mostrando que provavelmente exista variabilidade genética entre os acessos. Em apenas dois acessos não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade encontrados através dos dois corantes testados. Conclui-se então que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica de *P. cattleianum* e que o reativo de Alexander é o mais preciso, devido a sua dupla coloração (verde de malaquita + fucsina ácida). Assim, indica-se o reativo de Alexander para análise de estimativa da viabilidade polínica de genótipos de araçá envolvidos em um programa de melhoramento genético.

Palavras-chave: Araçá, orceína acética, reativo de Alexander, viabilidade polínica

ABSTRACT: Estimation of pollen viability of strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) through distinct staining methods. The histochemical analysis of pollen grains through the use of stains makes it possible to determine their pollen viability. The purpose of this study was to compare the efficiency of 2% acetic orcein and Alexander's stain modified, in estimating the pollen viability of twenty strawberry guava accessions (*Psidium cattleianum* Sabine) – a valued fruit tree which is used for medicinal purposes. Pre-anthesis flower buds were collected and fixed in ethanol:acetic acid (3:1 v/v) for 24 hours at room temperature, subsequently they were stored in 70% ethanol under refrigeration. The anther squash technique was performed for slide preparation. In each accession two slides per stain and 500 pollen grains were analyzed. The pollen viability was estimated according to the percentage of viable pollen grains. Overall, it was observed that pollen grains stained with 2% acetic orcein evinced a high viability, higher than 98,1%, and the accessions did not differ. The pollen viability estimated with Alexander's stain varied from 43% (accession of Silveira Martins 1) to 97% (accession of Candelária 1), indicating that there is probably genetic variability among the accessions. There was no significant difference among the levels of viability found by means of the two stains in only two accessions. In conclusion, 2% acetic orcein overestimated the pollen viability of *P. cattleianum*, whereas the Alexander's stain is in turn more accurate due to its two stains (green malachite and fuchsine). Thus, it is indicated Alexander's stain for analysis estimation of pollen viability of strawberry guava genotypes involved in a genetic improvement program.

Keywords: strawberry guava, acetic orcein, Alexander's stain, pollen viability

INTRODUÇÃO

Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas em florestas tropicais. São árvores ou arbustos aromáticos, que frequentemente produzem frutos comestíveis. Vários membros desta família também são utilizados na medicina popular (Stefanello et al., 2011). Em Myrtaceae, o número de cromossomos diploide $2n = 2x = 22$ é o mais comum, embora ocorram variações de nível de ploidia, com alguns registros triploides ($2n = 3x = 33$) e tetraploides ($2n = 4x = 44$) feitos por Costa & Forni-Martins, 2007. Desta maneira, estes autores confirmaram o número cromossômico básico $x = 11$ para Myrtaceae, proposta anteriormente por Atchinson (1947).

Algumas espécies nativas de *Psidium* vêm chamando a atenção da indústria farmacêutica por produzirem frutos ricos em vitaminas e também em substâncias antioxidantes, além de óleos essenciais que podem ser extraídos das folhas e de outras partes da planta (Franzon et al., 2009). Tais características são de grande importância comercial, sobretudo para a agricultura familiar, sendo fonte de renda alternativa e sustentável.

Dentre as espécies deste gênero, destaca-se *Psidium cattleianum*, conhecida popularmente como araçá. É uma espécie nativa do Rio Grande do Sul e que apresenta grande potencial para exploração econômica. Além do consumo de seus frutos *in natura*, é uma espécie utilizada com fins medicinais, sendo que experimentos com extratos de suas folhas demonstraram atividade antiproliferativa em células de câncer – gástrico, da mama, do cólon, do fígado e do pulmão (Moon et al., 2011; Medina et al., 2011; Jun et al., 2011; Im et al., 2012). Extratos de seus frutos e folhas também apresentaram atividade antimicrobiana (Medina et al., 2011; Jun et al., 2011; De Menezes et al., 2010; Brighenti et al., 2008).

A grande variação existente em *P. cattleianum*, inclusive aquela relacionada à cor de seus frutos, leva à necessidade de buscar um melhor conhecimento do organismo em estudo, sob vários aspectos, sejam eles ecológicos, genéticos, morfológicos, químicos, entre outros (Sousa & Sobral, 2007). A possibilidade de uso de determinada espécie em programas de melhoramento genético depende da obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no seu germoplasma (Techio et al., 2006a). A viabilidade polínica é um dos fatores responsáveis pela seleção de genótipos para programas de melhoramentos, e grãos de pólen viáveis influenciam diretamente o sucesso da fertilização (Cabral et al., 2013).

A estimativa da viabilidade polínica é importante para a análise de fluxo gênico em plantas porque evidencia o potencial masculino de

reprodução da espécie e pode ser útil em estudos taxonômicos, ecológicos, genéticos e palinológicos (Frescura et al., 2012). Há um número de causas não genéticas que podem levar à inviabilidade polínica, incluindo a idade do pólen e fatores físicos, tais como temperatura e umidade (Kelly et al., 2002).

Não há na literatura um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico, por isso a importância de se testar mais de um tipo de corante a fim de encontrar o mais adequado para cada espécie. Vale destacar que a importância de se avaliar diferentes corantes para estimar a viabilidade polínica reside no fato de se conhecer com maior confiabilidade aquele que forneça resultados mais próximos ao obtido pela germinação de pólen *in vitro*. Em araçazeiro não há estudos de viabilidade polínica utilizando orceína acética ou reativo de Alexander, apenas Raseira & Raseira (1996) realizaram um teste de viabilidade baseado na capacidade dos grãos de pólen adquirirem cor quando em contato com o carmim propiônico, obtendo de 21 a 71% de polens corados. Techio et al. (2006a) comparando os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander observaram viabilidade do grão de pólen superior a 90% em capim-elefante e milheto, independente do corante utilizado. Entretanto, Auler et al. (2006), comparando os mesmos três corantes, observaram diferença significativa entre eles, sugerindo o reativo de Alexander como o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen na espécie medicinal *Baccharis trimera* (Less) DC. ('carqueja').

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou estimar a viabilidade polínica de *P. cattleianum* testando dois corantes, a saber, orceína acética 2% e reativo de Alexander.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material botânico

Botões florais de araçazeiro foram coletados nos meses de outubro e novembro de 2013, em estágio de pré-antese. Os botões coletados foram imediatamente fixados em solução etanol:ácido acético (3:1), por um período de 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os botões foram transferidos para frascos com etanol 70% e mantidos sob refrigeração até a sua utilização. Os acessos coletados são de diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul – Brasil. De cada acesso, foi depositada uma exsicata no Herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul (RS).

Preparo das lâminas e critérios de análise

Botões florais com diâmetro entre 8 e 10 mm foram utilizados para o preparo das lâminas, buscando-se os polens já diferenciados. A técnica de esmagamento das anteras, descrita por Guerra & Souza (2002), foi utilizada no preparo das lâminas. A estimativa da viabilidade polínica foi comparada utilizando os seguintes corantes: orceína acética 2% e reativo de Alexander (Alexander, 1980) modificado.

Para cada acesso foram confeccionadas quatro lâminas, duas para cada um dos corantes, avaliando-se 500 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 1000 grãos de pólen analisados por corante para cada um dos acessos. As lâminas foram preparadas e analisadas após 24 horas, para que os corantes pudessem agir nos grãos de pólen, colorindo-os. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 40X. As medidas dos grãos de pólen foram feitas com o auxílio de uma ocular micrométrica. Conforme Raseira & Raseira (1996), os grãos de pólen podem apresentar forma triangular, arredondada, oval ou disforme. Desta maneira, na análise dos polens buscou-se essa variação na forma também nas populações coletadas.

Os grãos de pólen corados com orceína acética quando viáveis apresentam coloração rosa escuro e os não corados ou com morfologia anômala são considerados inviáveis. Em contrapartida, na solução de Alexander, os grãos de pólen de coloração púrpura são considerados viáveis e os de cor verde, inviáveis. Também foram contabilizados aqueles grãos que apresentaram tamanho diminuto e/ou formato irregular. A viabilidade polínica foi estimada por meio da porcentagem de grãos de pólen viáveis.

Análise estatística

O delineamento experimental foi em esquema fatorial 20 x 2 (acessos x corante). Os dados de porcentagem de viabilidade foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico Assistat®, versão beta 7.7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação colorimétrica dos grãos de pólen dos diferentes acessos de *P. cattleianum* é apresentada na Tabela 1. É possível observar que a coloração obtida pelo uso da orceína acética 2% (Figura 1a, 1b e 1c) não permitiu a discriminação satisfatória no que diz respeito à estimativa de viabilidade dos polens na maior parte dos acessos estudados. De acordo com os dados observados na Tabela 1, percebe-se que os grãos de pólen corados

com orceína acética 2% apresentaram uma alta viabilidade polínica, superior a 98,1%.

Não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade polínica dos acessos corados com orceína acética, como mostram as letras minúsculas da Tabela 1 obtidas pelo Teste de Scott-Knott. O corante orceína acética 2% foi escolhido para analisar a viabilidade polínica de *P. cattleianum*, pois a capacidade de coloração com um determinado corante pode variar entre as espécies. Nesta espécie estudada, a orceína acética não se mostrou um bom corante para avaliar a viabilidade polínica. Entretanto, em outras espécies este mesmo corante foi satisfatório na estimativa da viabilidade polínica, como em estudo realizado por Techio et al. (2006a) onde, comparando os corantes orceína acética, carmim propiônico e reativo de Alexander, observaram viabilidade do grão de pólen superior a 90% em capim-elefante e milho, independente do corante utilizado. Entretanto, Frescura et al. (2012) demonstraram que a orceína acética 2% superestimou a viabilidade polínica de *Polygala paniculata* L., devido à dificuldade de distinção entre os grãos de pólen viáveis e não viáveis, sendo que essa avaliação foi realizada basicamente pela diferença de tamanho dos polens.

Por outro lado, a viabilidade polínica através da coloração com o reativo de Alexander (Figura 1d, 1e e 1f) variou de 43,0% a 97,0%. Em apenas dois acessos (06 e 09) não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade, sendo que apresentaram 99,2% (orceína acética 2%) e 97,0% (reativo de Alexander) no acesso 06 e 98,5% (orceína acética) e 95,4% (reativo de Alexander) no acesso 09 (Tabela 1). Já nos demais acessos houve diferença significativa dos valores de porcentagem de viabilidade polínica entre os corantes. Estes resultados foram encontrados através da comparação entre os dois corantes testados. A maior diferença entre os dois corantes foi encontrada nos acessos 07 (orceína acética = 99,3%; reativo de Alexander = 46,4%) e 14 (orceína acética = 98,7%; reativo de Alexander = 43,0%). O uso dos distintos corantes, além de mostrar a superestimação da viabilidade ocasionada pelo uso da orceína acética, também revelou que o reativo de Alexander é o corante mais eficiente e fidedigno no que diz respeito à estimativa da viabilidade dos grãos de pólen através da capacidade de coloração.

Estudos realizados por Frescura et al. (2012), em *Polygala paniculata*, revelaram uma viabilidade polínica superior a 70% na maioria dos acessos, utilizando o reativo de Alexander, apesar de alguns acessos apresentarem valores inferiores a 70% de viabilidade, assim como também observado nos acessos de araçá 07 e 14. Uma viabilidade polínica inferior a 70% é considerada

TABELA 1. Porcentagem da viabilidade dos grãos de pólen de araçazeiro corados comorceína acética e reativo de Alexander.

Acessos	Número SMDB	Orceína acética 2%	Reativo de Alexander
01 - Santa Maria 1	15.063	98,9% a A*	90,4% b B
02 – Santa Maria 2	15.086	98,6% a A	88,9% c B
03 – Santa Maria 3	15.075	98,6% a A	85,6% d B
04 – Santa Maria 4	15.076	98,2% a A	88,9% c B
05 – Santa Maria 5	15.077	99,6% a A	80,3% e B
06 – Candelária 1	15.073	99,2% a A	97,0% a A
07 – Candelária 2	15.074	99,3% a A	46,4% f B
08 – Cerro Largo 1	15.072	98,9% a A	83,5% d B
09 – Cerro Largo 2	15.071	98,5% a A	95,4% a A
10 – Cerro Largo 3	15.078	99,4% a A	89,0% c B
11 – Cerro Largo 4	15.087	99,9% a A	85,0% d B
12 – Cerro Largo 5	15.069	99,2% a A	90,7% b B
13 – Cerro Largo 6	15.070	98,2% a A	91,8% b B
14 – Silveira Martins 1	15.066	98,7% a A	43,0% f B
15 – Silveira Martins 2	15.079	99,7% a A	88,6% c B
16 – Formigueiro 1	15.085	99,1% a A	84,7% d B
17 – Formigueiro 2	15.081	98,2% a A	86,9% c B
18 – Formigueiro 3	15.082	98,9% a A	93,8% a B
19 – Formigueiro 4	15.083	99,6% a A	87,2% c B
20 – Formigueiro 5	15.084	98,1% a A	85,2% d B

Letras minúsculas diferentes nas linhas correspondem às diferenças dentro dos acessos, entre os corantes. Letras maiúsculas diferentes nas colunas correspondem às diferenças entre os corantes, para cada acesso. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade de erro.

baixa, o que pode trazer problemas para a espécie, como infertilidade. Baixos valores de viabilidade dos grãos de pólen podem indicar possíveis irregularidades meióticas provocando diferentes graus de esterilidade, como observaram Bione et al. (2005) na soja.

Entre os acessos coletados em um mesmo município os que apresentaram maior diferença, pela coloração com reativo de Alexander, foram os do município de Candelária (acesso 07 = 46,4% e acesso 06 = 97,0%) e de Silveira Martins (acesso 14 = 43,0% e acesso 15 = 88,6%), mostrando que mesmo em acessos não muito distantes espacialmente provavelmente exista variabilidade genética.

Em estudos realizados por Techio et al. (2006a) com híbridos interespecíficos (*Pennisetum purpureum* x *P. glaucum*), os resultados de viabilidade polínica variaram de acordo com o corante empregado. Segundo os autores, os corantes nucleares utilizados (orceína acética e

carmim propiônico) mostraram alta taxa de polens funcionais (acima de 90%). Essa frequência de polens viáveis não era esperada, uma vez que híbridos entre *P. purpureum* x *P. glaucum* são descritos como estéreis devido a irregularidades meióticas (Jauhar, 1968, 1981; Techio et al., 2006b). Por outro lado, o reativo de Alexander confirmou que dentre os quatro acessos híbridos interespecíficos avaliados, três apresentaram completa esterilidade. Coelho et al. (2012) analisaram os grãos de pólen de *Crotalaria juncea* L., concluindo que a orceína acética superestimou a viabilidade, ao passo que o reativo de Alexander minimizou os problemas relacionados à obtenção de dados sobre a viabilidade polínica da espécie.

As análises usando o reativo de Alexander fornecem dados mais acurados sobre a viabilidade do pólen, pois se obtém uma coloração diferencial dos polens viáveis e não viáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam dupla coloração. O primeiro tem

afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Dessa maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander, 1980).

Em várias espécies do gênero *Psidium* analisadas por Costa (2004), foram encontrados valores elevados de viabilidade de grãos de pólen, com índices superiores a 86%, utilizando o corante carmim acético, pelo método de Medina & Conagin (1964). Entretanto, Raseira & Raseira (1996) em seus estudos sobre germinação do pólen *in vitro* de *P. cattleianum* obtiveram um valor muito baixo de germinação, atingindo no máximo 8,5%, sugerindo novos estudos para determinar se a falha na germinação foi devida à baixa viabilidade ou se houve influência do estágio de desenvolvimento da flor no momento da coleta das anteras. Raseira & Raseira (1996) também encontraram porcentagens baixas de tétrades normais, 65%, o que talvez explicasse a baixa porcentagem de germinação dos grãos de pólen. Del Duca (1976) cita trabalhos de outros autores com diversas espécies, como *Agropyron desertorum* (Fisch. Ex Link) Schult., *Bromus inermis* Leyss. e

Secale cereale L., que indicam que irregularidades meióticas aparentemente afetam a fertilidade.

Os grãos de pólen de *P. cattleianum* apresentaram forma variada: triangular, arredondada, oval ou disforme, resultado similar ao observado por Raseira & Raseira (1996). A análise dos grãos de pólen, no que diz respeito ao seu tamanho, revelou a presença de três tamanhos distintos de polens: pequenos = até 5 μm de diâmetro (Figura 1b e 1e), médios = de 5 a 10 μm (Figura 1a e 1d) e grandes = mais de 10 μm (Figura 1c e 1f). Os grãos de pólen de tamanho médio foram os observados em maior número, apresentando formato triangular. Os polens de tamanho diminuto e formato oval, embora encontrados em pequena quantidade, eram na maioria deles inviáveis. Do mesmo modo, os polens de tamanho grande, que em alguns acessos eram bastante numerosos, tinham o formato arredondado e apresentavam grande inviabilidade.

Para a espécie em questão, *P. cattleianum*, há relatos na literatura de casos de poliploidia, tendo sido encontrado $2n = 44$ (Costa & Forni-Martins, 2006), $2n = 66$ (Costa, 2009), $2n = 77$ (Singhal et al., 1985) e $2n = 88$ (Atchinson, 1947). De acordo com Stanley & Linskens (1974), o tamanho do pólen

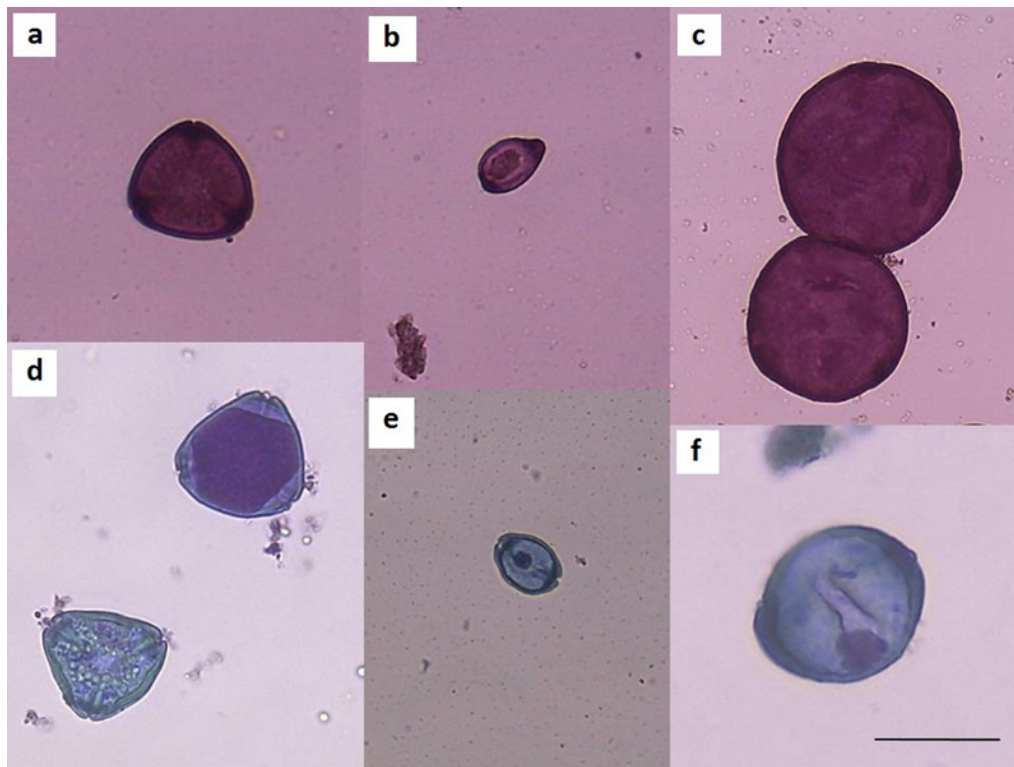


FIGURA 1. Grãos de pólen submetidos a diferentes métodos de coloração. Orceína acética 2%: a) Grão de pólen viável tamanho médio (de 5 a 10 μm) – acesso 09 (Cerro Largo 2); b) Pólen pequeno ou diminuto (tamanho menor que 5 μm) – acesso 09 (Cerro Largo 2); c) Polens viáveis de tamanho grande (maior que 10 μm) – acesso 13 (Cerro Largo 6). Reativo de Alexander: d) Pólen viável e inviável de tamanho médio (acesso 10 – Cerro Largo 3); e) Pólen inviável, tamanho pequeno – (acesso 13 – Cerro Largo 6); f) Pólen de tamanho grande, inviável (acesso 14 – Silveira Martins 1). Escala: 10 μm .

está relacionado ao número de cromossomos e, geralmente, é constante. O tamanho do grão de pólen em várias espécies tem relação com o nível de ploidia (Raseira & Raseira, 1996). A relação positiva entre o nível de ploidia e tamanho do pólen tem sido relatada para vários gêneros de plantas poliploides, como *Avena* L. (Katsiotis & Forsberg, 1995), *Mentha* L. (Celenk et al. 2008) e *Lippia* L. (Sousa et al. 2013). Conforme Simioni et al. (2004) plantas que produzem grãos de pólen com 30% a 40% de incremento no tamanho, quando comparados com grãos considerados normais, servem como um indicativo de grãos de pólen não reduzidos. A utilização de plantas boas produtoras de gametas não reduzidos no melhoramento pode levar à geração de plantas com níveis de ploidia mais elevados, o que pode ser muito vantajoso para algumas características como, por exemplo, maior robustez das plantas (Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2001).

Entretanto, a presença de conteúdo celular, como pode ser observada pela coloração púrpura fornecida pelo reativo de Alexander, não garante que o pólen é metabolicamente ativo ou capaz de crescer em tubos polínicos (Rodrigues et al. 2006). Através da análise colorimétrica torna-se possível realizar somente a estimativa da viabilidade do pólen (no caso, capacidade de coloração). Mas ressalta-se que a fertilidade do pólen é determinada por testes de germinação e crescimento do tubo polínico ou por meio de testes fluorocromáticos. O corante de Alexander e os testes de germinação *in vitro* confirmaram a completa esterilidade dos grãos de pólen de três dos acessos híbridos interespecíficos (*Pennisetum purpureum* x *P. glaucum*) avaliados por Techio et al. (2006a).

Através deste estudo, utilizando os corantesorceína acética 2% e reativo de Alexander para determinação da viabilidade polínica em acessos de *Psidium cattleianum*, conclui-se que o reativo de Alexander mostra-se mais eficaz para a diferenciação entre grãos de pólen viáveis e não viáveis. Utilizando o reativo de Alexander, na maioria dos acessos a viabilidade polínica é alta (superior a 80,3%). Em apenas dois acessos a viabilidade polínica foi inferior a 70%, o que é considerado baixo e pode trazer problemas de infertilidade. Assim, indica-se o reativo de Alexander para análise de estimativa da viabilidade polínica de genótipos de araçá envolvidos em um programa de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P.A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v.1, n.5, p.13-8, 1980.
- ATCHINSON, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany**. v.34, n.3, p.159-164, 1947.
- AULER, N.M.F. et al. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.2, p.55-63, 2006.
- BIONE, N.C.P.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, L.A. A male-sterile mutation in soybean (*Glycine max*) affecting chromosome arrangement in metaphase plate and cytokinesis. **Biocell**, v.29, n.2, p.177-181, 2005.
- BRIGHENTI, F.L. et al. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production. **Caries Research**, v.42, n.2, p.148-154, 2008.
- CABRAL, J.C. et al. Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes colorimétricos. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.17, p.2780-2788, 2013.
- CELENK, S. et al. A palynological study of the genus *Mentha* L. (Lamiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.157, n.1, p.141-154, 2008.
- COELHO, A.P.D. et al. Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). **Agrociencia**, v.46, n.5, p.481-487, 2012.
- COSTA, I.R. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. 2004. 80p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- COSTA, I.R. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. 2009. 234p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- COSTA, I.R.; FORNI-MARTINS E.R. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. **Australian Journal of Botany**, v.54, n.4, p.409-415, 2006.
- COSTA, I.R.; FORNI-MARTINS E.R. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 4, p. 571-580, 2007.
- DE MENEZES, T.E.C. et al. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.3, p.300-305, 2010.
- DEL DUCA, L.J.A. **Índices meióticos em trigos brasileiros e estudos comparativos entre comportamento citológico, fatores ambientais e componentes de produção**. 1976. 139p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- FRANZON, R.C. et al. **Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 47 p.
- FRESCURA, V.D. et al. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**, v.36, n.3, p.143-145, 2012.
- GIUDICE-NETO, J. Del. et al. Herança e ligação em locos izoenzimáticos de *Caesalpinia echinata* L. (pau-brasil).

- Revista do Instituto Florestal**, v.16, n.2, p.101-110, 2004.
- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002. 131p.
- IM, I. et al. The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK 1/2 MAPK signalling pathway. **Nutrition and Cancer**, v.64, n.2, p.255-266, 2012.
- JUN, N.J. et al. Cytotoxic activity of b-caryophyllene oxide isolated from Jeju guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. **Records of Natural Products**, v.5, n.3, p.242-246, 2011.
- JAUHAR, P.P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, v.39, n.1, p.360-370, 1968.
- JAUHAR, P.P. Cytogenetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, v.34, p.407-479, 1981.
- KATSIOTIS, A.; FORSBERG, R.A. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. **Euphytica**, v.83, n.2, p.103-108, 1995.
- KELLY, J.K. et al. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. **American Journal of Botany**, v.89, n.6, p.1021-1023, 2002.
- MEDINA, D.M.; CONAGIN, C.H.T.M. **Técnica Citológica**. Publicação n. 2610, Campinas: Instituto Agrônomo, 1964, 107p.
- MEDINA, A.L. et al. Araça (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v.128, n.4, p.916-922, 2011.
- MOON, J.Y. et al. The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cell proliferation via induction of apoptosis. **Food Chemistry**, v.125, n.2, p.369-375, 2011.
- RASEIRA, M do C.B.; RASEIRA, A. **Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum***. Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1996. 95p.
- RODRIGUES, L.R. et al. Isolation and culture of soybean microspores and pollen grains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, p.537-545, 2006.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não-reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.169-175, 2001.
- SIMIONI, C. et al. Selection for increasing 2n gametes production in red clover. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, n.4, p.477-483, 2004.
- SINGHAL, V.K. et al. Cytology of woody species. **Proceedings of the Indian Academy Sciences (Plant Sciences)**, v.94, n.4-6, p.607-617, 1985.
- SOUSA, L.P.; SOBRAL, M.E.G. Morfotipos do Araçazeiro, *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) no Estado do Paraná. In: PEDROSA-MACEDO, J. H. et al. (Orgs). **O Araçazeiro: Ecologia e Controle Biológico**. Curitiba, PR: FUPEF, 2007, p.19-28.
- SOUSA, S.M. et al. Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L. (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.1, p.147-157, 2013.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. **Biology Biochemistry Management**. Berlin: Heidelberg, 1974, 307p. Disponível em: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-642-65905-8>. Acesso em: 19 Jan 2015.
- STEFANELLO, M.E.A. et al. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, n.1, p.73-94, 2011.
- TECHIO, V.H. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, v.28, n.1, p.7-12, jan./mar. 2006a.
- TECHIO, V.H. et al. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*P. Glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.353-362, 2006b.