

AVALIAÇÃO CITOLOGICA DE ACESSOS DE *Psidium*.

**RODRIGO MIRANDA BARBOSA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2016

AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DE ACESSOS DE *Psidium*.

**RODRIGO MIRANDA BARBOSA**

“Dissertação 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 Genética e Melhoramento de Plantas”.

Orientadora: Telma Nair Santana Pereira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2016

# AVALIAÇÃO CITOLÓGICA DE ACESSOS DE *Psidium*.

**RODRIGO MIRANDA BARBOSA**

“Dissertação 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 Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016

Comissão Examinadora

---

Prof. Alexandre Pio Viana (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF

---

Dr<sup>a</sup>. Elba Honorato Ribeiro (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) -  
UENF

---

Prof. Pedro Correa Damasceno Junior (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UFRRJ

---

Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço aos meus pais, por todo o apoio durante toda a minha jornada acadêmica e pelas tantas palavras de incentivo para perseguir meus objetivos.

À UENF, pela infraestrutura concedida e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho, e à Faperj, pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora, Telma Nair Santana Pereira, pela orientação, pela paciência e por acreditar em meu potencial, proporcionando meu crescimento profissional.

Aos Professores do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, por todo conhecimento transmitido nestes anos de estudo e pesquisa.

Ao secretário do Programa, Daniel, pela eficiência e prontidão em ajudar.

E a todos os meus colegas de laboratório e amigos, em especial para Lorraine, Rafael, Ingrid, Hellen, Andressa, Nádia e Larissa.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1. Classificação botânica.....	04
3.2. Aspectos econômicos.....	06
3.3. Melhoramento genético.....	07
3.4. Aspectos citológicos.....	08
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Material vegetal.....	11
4.2. Metodologia.....	12
4.2.1. Análise meiótica.....	12
4.2.2. Frequência de gametas não reduzidos.....	12
4.2.3. Índice meiótico.....	13
4.2.4. Viabilidade polínica.....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
6. CONCLUSÕES.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

## RESUMO

BARBOSA, Rodrigo Miranda M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; FEVEREIRO 2016; Avaliação citológica de acessos de *Psidium*. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira. Conselheiros: Profs. Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

Esta pesquisa visou caracterizar citologicamente os acessos da coleção de *Psidium* quanto ao número cromossômico, nível de podia, e quanto ao comportamento meiótico dos acessos de *Psidium* do banco de germoplasma. A coleção apresenta acessos de goiabeira (*P.guajava*L.) e de araçás (*P.guinense* e *P. cattleaynum*). Para a análise meiótica botões florais de diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados e fixados em etanol e ácido acético (3:1), as lâminas foram preparadas por *squash* e coradas com Carmim acético 1%. Todas as células, nas diferentes fases da divisão meiótica, foram examinadas. Para a frequência de gametas não reduzidos 2n, 1500 produtos pós-meióticos foram avaliados. Para a viabilidade polínica, 1500 grãos de pólen foram analisados e caracterizados como viáveis ou inviáveis pela coloração tripla de Alexander. O número de cromossomos entre os acessos variou de 33 a 44 cromossomos. A meiose pode ser caracterizada como normal para os acessos, no entanto, algumas anormalidades foram observadas, sendo que cromossomos retardatários foram os mais comuns, mas também foi observado divisão assincrônica e citomixia. Os cromossomos retardatários podem ser perdidos durante a divisão e podem dar origem a gametas aneuploides ou inviáveis. O acesso UENF-F2P1

apresentou a maior frequência de gametas não reduzidos entre os acessos estudados, 31,3%; essa frequência tão alta foi devido ao grande número de díades, quanto à viabilidade polínica dos acessos, a qual variou de 47% a 79,6% para *P. cattleaynum* e 95 a 99,6% para as goiabeiras. Uma característica observada nesse estudo foi a ocorrência de grãos de pólen com mais de três aberturas germinativas nos acessos poliploides; o normal considerado para as dicotiledôneas é a presença de três aberturas germinativas.

## ABSTRACT

BARBOSA, Rodrigo Miranda M.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; FEVEREIRO 2016; Cytological evaluation of *Psidium* accesses. Adviser: Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira. Committee members: Profs. Messias Gonzaga Pereira e Alexandre Pio Viana.

This study aimed to do a cytological characterization of the *Psidium* Germplasm Collection by the chromosome number, ploidy level and the meiotic behavior of the accessions. For the meiotic analysis, flower buds in different developmental stages were collected and fixed in ethanol: acetic acid (3:1); the slides were prepared by squash and stained with 1% acetic carmine. All cells, in different stages of meiotic division were examined. For 2n gametes frequency, 1500 post-meiotic products were evaluated and counted. For pollen viability, 1500 pollen grains were analyzed and characterized as viable or unviable by using Alexander 's triple staining. The chromosome number varied from 33 to 44 chromosomes. Meiosis can be characterized as normal for the access, however some abnormalities were observed being laggard chromosomes the most frequent abnormality. It was also observed asynchronic division and cytomixis. The laggard chromosomes can be lost during meiotic division, which can generate aneuploidy or non-viable gametes. The UENF-F2P1 access showed highest frequency of unreduced gametes among the studied accesses, 31.3%. The unreduced 2n gametes can be used in sexual polyploidization. The pollen grain viability, varied from 47% to 79.6% for *P. cattleaynum* and from 95% to 99.6% for guajava. It was

observed in the present study was the occurrence of pollen grain with more than three germ aperture being considered normal for dicots the presence of three pores but it was observed pollen grains with one, two, four, and five aperture.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais países produtores de frutas do mundo, sendo a fruticultura um segmento importante do agronegócio brasileiro (Vitti, 2009; Coser et al., 2012). Dentre a grande diversidade de árvores frutíferas nativas do Brasil, destacam-se exemplares da família *Myrtaceae*, com ampla variabilidade e um grande potencial econômico, sendo suas espécies utilizadas na alimentação, ornamentação e como medicinal.

*Myrtaceae* é uma família que apresenta distribuição no hemisfério sul e neotropical, compreende de 130 a 150 gêneros e mais de 5650 espécies (Govaertset al., 2009; Coser et al., 2012). No Brasil, sua representatividade chega a 24 gêneros e 990 espécies (Sobral et al., 2014). Dentro da família *Myrtaceae*, está inserido o gênero *Psidium*, ao qual pertencem a goiabeira e os araçás, com ampla distribuição no território brasileiro, bem como em outros países da América do Sul. Entre as frutas produzidas no país destaca-se a goiaba (*Psidium guajava* L.), sendo o país o maior produtor mundial de goiabas vermelhas com cerca de 15 hectares de área plantada e produção de 345.332 toneladas por ano (IBGE, 2012).

Com o aumento de área cultivada, torna-se comum o aparecimento de novas pragas e doenças (Rossi e Ferraz, 2005). O nematoide, *Meloidogyne enterolobii* é um importante patógeno de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e está presente nas principais regiões produtoras do país (Almeida, 2008). A região Norte Fluminense foi grande produtora de goiaba, porém devido à presença do

nematoide (*M. enterolobii*) e do fungo (*Fusarium solani*) esta produção foi decrescendo. Existe uma associação sinérgica entre o nematoide e o fungo que causa uma doença complexa, o declínio da goiabeira. Os sintomas dessa doença são o apodrecimento progressivo das raízes, queima das bordas das folhas, amarelecimento e queda das folhas e morte da planta. As perdas econômicas diretas por causa dessa doença somam mais de R\$ 112 milhões (Pereira et al, 2009).

A ocorrência de espécies de *Myrtaceae* resistentes ao nematoide permitiria a sua utilização como porta enxerto para variedades comerciais de goiabeira ou como fontes de genes de resistência. Alguns acessos de araçazeiros (*P. cattleyanum* e *P. guineense*) apresentam resistência ao nematoide (Pessanha et al, 2011), entretanto, essas espécies apresentam ploidia diferente da goiabeira e por isso a transferência de genes de resistência e o uso delas como portas-enxerto são dificultados devido à compatibilidade genética quanto à compatibilidade histológica (Souza et al., 2014). Portanto, é muito importante a procura de materiais resistentes dentro de *Myrtaceae* e a viabilidade de uso desses materiais como porta enxerto ou como fontes de genes de resistência para a forma cultivada.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense tem um programa de melhoramento para a goiabeira, sendo realizados estudos de diversidade genética em *Psidium* (Pessanha et al, 2011), sendo também um dos enfoques o uso de hibridação interespecífica entre goiabeiras e araçazeiros, bem como a caracterização de acessos resistentes ao complexo *M. enterolobii*- *F. solani* (Miranda et al., 2010). A goiabeira (*P. guajava*) é uma espécie diploide com  $2n=2x=22$  cromossomos e as espécies de araçá (*P. cattleyanum* e *P. guineense*) apresentam níveis de ploidia variando de  $2n = 4x$  a  $8x$  (Souza et al., 2014); o número básico dos cromossomos da família é  $x=11$ . Considerando que os araçazeiros têm ploídias diferentes é necessário se obter informações citogenéticas para um futuro uso nos programas de melhoramento de goiabeira via hibridação interespecífica.

Considerando que a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) tem uma coleção de germoplasma de *Psidium* é importante caracterizar citogeneticamente os acessos, visando, assim, gerar informações que possam auxiliar o programa de melhoramento da goiabeira.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar aspectos citológicos de acessos de goiabeira (*Psidium guajava*), e araçazeiros (*Psidium guineense* SWe *Psidium. Cattleaynum*).

### Objetivos específicos:

- Caracterizar o comportamento meiótico de acessos de goiabeira e araçazeiros;
- Estimar a frequência de gametas não reduzidos em acessos de goiabeira e araçazeiros;
- Estimar a viabilidade polínica de acessos de goiabeira e araçazeiro.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Classificação botânica

A ordem *Myrtales* é constituída por cerca de 9000 espécies agrupadas em 13 famílias, dentre elas, *Myrtaceae* destaca-se com maior riqueza de espécies na maioria das formações vegetacionais no sudeste do Brasil (cerrado, campos rupestres, floresta atlântica e florestas decíduais) (Costa e Orni-Martins, 2004). Esta família compreende de 130 a 150 gêneros e mais de 5650 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Coser et al., 2012).

Atualmente, a tribo *Myrteae* encontra-se dividida em três subtribos com base na morfologia dos embriões: *Eugeniinae* (embriões globosos com radícula não evidente), *Myrciinae* (embriões com cotilédones foliáceos e radícula longa) e *Myrtiinae* (cotilédones reduzidos e radícula longa) (Costa e Orni-Martins, 2004). Segundo os autores, dentro da subtribo *Myrtiinae*, os gêneros *Psidium* e *Campomanesia* são os mais diversificados e amplamente distribuídos na região neotropical. A goiabeira (*Psidium guajava*, L.) é originária de clima tropical e teria tido origem no continente Americano, provavelmente, entre as áreas do México, Peru, Colômbia e Brasil (Soubihe Sobrinho, 1951). Já Ochse *et al.* (1966) afirmam que ela teve origem no Brasil, de onde se difundiu para todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo.

A goiabeira é um arbusto ou árvore de pequeno porte (Koller, 1979), podendo atingir de três a seis metros de altura. As folhas são opostas, têm formato elíptico-oblongo e caem quando maduras, característica das plantas de folhas decíduas. As flores são brancas, hermafroditas e surgem isoladas ou em grupos de duas ou três, sempre na axila das folhas e nas brotações surgidas em ramos maduros. O modo de reprodução das goiabeiras ainda é assunto de pesquisa, pois alguns autores a classificam como autógama, porém, para outros autores a goiabeira apresenta uma taxa de fecundação cruzada variável entre plantas, de 25,7 a 41,3%, considerando-se 35,6% como um índice médio (Soubihe Sobrinho e Gurgel, 1962), sendo a abelha (*Apis mellífera*) o principal agente polinizador (Pereira e Martinez Junior, 1986).

*P. guineense* e *P. cattleyanum* também destacam-se dentro do gênero *Psidium* (Pereira e Nachtigal, 2003). Essas plantas vegetam nos mais variados ecossistemas, sendo que *P. guineense* ocorre nas restingas, tabuleiros, cerradões e capoeiras, enquanto *P. cattleyanum* ocorre na floresta latifoliada semidecídua, matas ciliares e matas de altitude (Brandão et al., 2002; Franzon et al, 2009).

*P. cattleyanum* é originário do Sul do Brasil e está distribuído desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, bem como em outros países da América do Sul. É uma espécie de porte arbóreo cuja altura varia entre 3,0 e 6,0 m, com tronco liso e casca descamante, o fruto é baga globulosa, amarelo ou vermelho, com poupa suculenta. As flores são hermafroditas, axilares e brancas, folhas simples obovadas, coriáceas e glabras (Lorenzi, 1992).

O araçazeiro (*P. guineense*) é originário da América do Sul e apresenta uma ampla área de distribuição, que vai desde o Sul do México até ao Norte da Argentina (Franzon et al, 2009). Apresenta porte arbustivo, pode alcançar 1,5 metros de altura, com caule de casca lisa, suas folhas são compridas, grossas, opostas, verde-escuras e lustrosas, com forma elíptica e peciolada, flores hermafroditas brancas e axilares (Damiani, 2009). Os frutos são bagas ovoides ou oblongas, amarelas ou verdes, com polpa suculenta, e com 22 a 250 sementes (Franzon et al., 2009).

### 3.2. Aspectos econômicos

A produção brasileira de goiaba no ano de 2012 foi de 345.332 toneladas, sendo que as regiões com maior produtividade foram a nordeste e a sudeste. A excelente qualidade da goiaba é atribuída ao elevado teor nutritivo, excelentes propriedades organolépticas, alto rendimento por hectare e polpa de elevada qualidade industrial. A maior parte da produção de goiabas é consumida como fruta fresca, e o restante processado sob as formas de goiabada, geleia, bala, suco, polpa, vinho, fruta seca e conservas (Salunkhee Kadam., 1995).

O *P. cattleyanum* possui diversas características de interesse, podendo-se destacar seu potencial na fruticultura, seus frutos podem ser utilizados desde o consumo *in natura* até em diferentes formas processadas (doces, sorvetes, geleias e licores). Possuindo também elevado valor nutricional em virtude do seu baixo teor de açúcar, grande riqueza em nutrientes como presença de vitamina C e compostos fenólicos (Santos et al., 2007).

O *P. guineense* apresenta potencial para exploração econômica em virtude da boa aceitação para o consumo *in natura*, por seu elevado teor de vitamina C, sendo quatro vezes maior do que as frutas cítricas, como a laranja e o limão. Além disso, possui alta capacidade de frutificação, resistência a doenças, pragas (exceto à mosca das frutas) e dispersão, indicando adaptação a diferentes ambientes (Raseira e Raseira, 1996).

Nas áreas de ocorrência natural e dispersão de *P. guineense*, a geração de emprego e renda na agricultura familiar ainda é pouco representativa, sendo exceções as comunidades rurais que obtêm na coleta, beneficiamento de polpa e comercialização dos seus produtos e derivados, uma fonte adicional de renda sustentável (Franzon et al, 2004).

Em razão da maioria das espécies de araçazeiro encontrar-se em fase de domesticação, poucos conhecimentos estão disponíveis sobre as técnicas de propagação vegetativa, variedades definidas, práticas culturais, nutrição mineral e adubação, exigindo-se mais estudos aprofundados (Souza, 2011).

### 3.3. Melhoramento genético

Na goiabeira os métodos de melhoramento aplicados à cultura são basicamente seleção e hibridação (Pereira e Nachtigal, 2002). Para a obtenção de sucesso em um programa de melhoramento de plantas, é necessário se dispor de informações básicas relativas à herança dos principais caracteres agrônômicos que se pretende melhorar, bem como a divergência genética disponível para o melhoramento (Pereira e Nachtigal, 2003).

Os primeiros trabalhos científicos de melhoramento de goiabeira datam um pouco antes da metade do século passado, nos Estados Unidos (Califórnia e Flórida), em Porto Rico, na Índia e no Egito. No Brasil, destacam-se os trabalhos de doutorado desenvolvidos por Soubihe Sobrinho, na escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, publicados em 1951. Em seu trabalho, Soubihe Sobrinho fez seleção de plantas de goiabeira em institutos de pesquisa (Instituto Agrônômico de Campinas, Embrapa e outros); entretanto, as principais cultivares, produtoras de frutos destinados ao consumo como fruta fresca, surgiram de trabalhos desenvolvidos por produtores de origem japonesa sendo a cultivar Século XXI a mais recentemente obtida (Bruckner, 2002).

O programa de melhoramento genético no Brasil, até o momento, está voltado para o desenvolvimento de variedades comerciais superiores, sendo que há poucos programas de melhoramento genético para a cultura da goiabeira. Os objetivos do melhoramento visam à qualidade do fruto (consumo *in natura* e indústria), finalizando com o lançamento de variedades superiores. Em 2002 foi lançada a cultivar Século XXI pelo programa de melhoramento da UNESP (Pereira e Nachtigal, 2002).

A condução de estudos genéticos clássicos apresenta restrições para a goiabeira, em razão da sua alta heterogeneidade, da grande capacidade de adaptação, do longo ciclo de vida e da exigência de grandes espaçamentos (Pereira e Martinez Jr., 1986).

Pereira e Nachtigal (2002) indicam características importantes para o melhoramento da goiabeira no Brasil e outras partes do mundo, visando o fruto, tais como acidez total titulável de 1,5 a 2,0%, pois frutos mais ácidos permitem melhor conservação e controle da qualidade dos produtos industrializados, frutos

com peso médio de 198 a 340 g e conteúdo mínimo de vitamina C de 300 mg.100 g<sup>-1</sup> de peso fresco. Outras características importantes são obter planta de crescimento baixo e aberto, resistentes a doenças e pragas e frutos com poucas sementes e com a cavidade da polpa bem cheia, com elevado aproveitamento para purê (80% de aproveitamento é considerado bom)

Não existem programas de melhoramento genético das espécies de *Psidium* nativas (Franzoni et al., 2009), poucas espécies são exploradas em escala comercial, e apenas em pequenas produções e em determinadas regiões (Raseira e Raseira, 1996), ou seja, elas ainda não possuem expressão econômica na fruticultura nacional (Bezerra et al., 2006).

Como as espécies de araçazeiros apresentam resistência ao nematoide, seu uso em programas de melhoramento é limitado a servir de porta-enxerto de *P. guajava* ou para transferência do gene de resistência por meio de cruzamentos interespecíficos (Eder-Silva et al., 2007; da Costa et al., 2010).

### 3.4. Aspectos citológicos

O gênero *Psidium* é cariologicamente variável, com várias contagens com  $2n=22$ , 44 e 88 (Souza et al., 2014), sugerindo um número básico  $x=11$ . A goiabeira (*P. guajava*) apresenta  $2n=2x=22$  e  $2n=2x=18$  cromossomos (Pereira, 1995; Souza et al., 2014). Em estudo citogenético de algumas espécies frutíferas no nordeste brasileiro, Éder-Silva et al. (2007) encontraram *Psidium arboreum* com  $2n=88$ , confirmando a tendência de poliploidia no gênero. *Psidium arboreum*, além de evolução por poliploidia, apresenta ganho aneuploide de alguns pares cromossômicos, provavelmente resultantes de erros de disjunção meiótica.

*Psidium araçá* (araçá), com  $2n=44$ , tem cromossomos predominantemente metacêntricos e submetacêntricos, medindo 0,8 a 2,1  $\mu\text{m}$  e um par de satélites longamente distendidos pela ocorrência de uma constrição secundária proximal (Éder-Silva et al., 2007). Vijaakumare & Subramanian (1985) descreveram variação cariotípica em diferentes cultivares de goiabeira, a espécie apresentou cariótipo simétrico e cromossomos pequenos, variando de 1,8 a 0,8  $\mu\text{m}$ , com três a seis pares de cromossomos do tipo subtelocêntricos. Por outro lado, *P. acutangulum* predomina cromossomos metacêntricos.

Com essa variação cariológica espera-se que os grãos de pólen apresentem números cromossômicos básicos variáveis e, conseqüentemente, viabilidade variável também; assim, é necessário o acompanhamento da meiose desses materiais. Segundo Souza et al. (2000), o comportamento meiótico de uma planta reflete diretamente no seu grau de fertilidade e a ocorrência de falhas durante o processo como cromossomos retardatários ou desorganização dos fusos, representam dificuldades na produção de híbridos, por ter como consequência, a variação cromossômica em função da perda ou ganho de cromossomos nas novas gerações.

A meiose é um processo que finaliza com a formação de gametas reduzidos ( $n$ ), apresentando a metade do número de cromossomos da célula diploide original. Porém, quando se trata de espécies poliploides, a meiose pode ser bastante irregular. Se for um autopoliploide, espera-se uma segregação irregular com formação de multivalentes; se for um alopoliploide, espera-se uma segregação similar a de um diploide (Singh, 1993). Porém, é comum em espécies poliploides a ocorrência de gametas não reduzidos ( $2n$ ).

Gametas não reduzidos são resultados de um processo meiótico anormal, em que a redução do número cromossômico não ocorre. Essa falha na redução pode ocorrer basicamente de duas formas. Na meiose I, pela restituição na primeira divisão (RPD), em que os cromossomos não se dirigem para os pólos na anáfase e, em vez de duas células com número haploide de cromossomos na telófase I, há formação de uma célula com número diploide; a meiose II, neste caso, ocorre normalmente, mas resulta em uma díade ao contrário da tétrade esperada. A outra forma de surgimento dos gametas  $2n$  é pela restituição na segunda divisão (RSD) que ocorre na meiose II, em que há falha da citocinese e restituição de núcleos diploides, com formação de díades ou tríades (Schifino-Wittmann e Dall'agnol, 2001).

Gametas não reduzidos podem ser detectados citologicamente, no lado masculino, pela presença de grãos de pólen com o dobro do tamanho dos grãos normais, ou grãos gigantes ou “macropólens”, como são também chamados (Negri, 1992; Wagenwoort e DenNijs, 1992; Ramsey e Schemske, 1998), ou pela presença de díades e tríades ao final da telófase II (Ortiz *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1997).

Gametas não reduzidos ocorrem de forma espontânea em praticamente todas as populações naturais de plantas, mas, em geral, em percentagens muito baixas, em torno de 1% ou menos. Muitas vezes não são detectados por problemas amostrais. Entretanto, a frequência de gametas não reduzidos pode ser estimada pela equação de Yan *et al.* (1997), onde se computa o número de díades (D), tríades (Tr) e tétrades (T) ao final da micro esporogênese.

Há muitas evidências de que a formação de gametas  $2n$  está sob controle genético, e populações de plantas, frequentemente, possuem variação genética herdável para produzir gametas não reduzidos, o que é evidenciado pela rápida resposta à seleção para produção de gametas não reduzidos em muitas culturas (Ramsey e Schemske, 1998). Fatores ambientais, tais como temperatura, especialmente variações na temperatura, estresse hídrico e nutricional podem afetar a produção de gametas masculinos não reduzidos (Ramsey e Schemske, 1998).

Os dois aspectos mais vantajosos da utilização de gametas não reduzidos  $2n$  no melhoramento são a possibilidade de poliploidização sexual, tanto unilateral, ou seja, pela união de um gameta reduzido com um não reduzido, ou bilateral, pela união de dois gametas não reduzidos, mantendo assim a heterozigose. A utilização desses gametas é como ponte para transferir genes desejáveis entre níveis de ploidia diferentes (Ramanna, 1992; Ramsey e Schemske, 1998). Tetraploides produzidos por poliploidização sexual podem ter um desempenho melhor devido às possibilidades de interações multialélicas, as quais são menos acumuladas pelos tetraploides produzidos somaticamente.

Gametas  $2n$  irão, também, permitir a introgressão de genes de espécies diploides silvestres para o conjunto gênico tetraploide cultivado (McCoy e Bingham, 1991). O uso final dos gametas  $2n$  seria para maximizar a heterozigose pela união de oosferas  $2n$  tipo RPD e pólen  $2n$  tipo RPD, originados de progenitores diploides (Bingham, 1980). Esses híbridos possuiriam máxima heterozigose e representariam o equivalente nuclear da hibridação somática de células (Peloquin, 1983).

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Material Vegetal

Neste estudo foram utilizados dois acessos de goiabeira, um de *P. guineense* e 27 de *P. cattleyanum* (Tabela 1), conservados na coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A coleção está mantida na Escola Agrícola Antônio Sarlo, no município de Campos dos Goytacazes. As plantas estão distribuídas em seis linhas de plantio, o material foi todo propagado via seminal e o espaçamento é de 5 m dentro da linha e 7 m entre linhas. Para acessos que têm mais de uma planta, foram utilizadas, para todas as análises, três plantas/acesso.

**Tabela 1.** Acessos de *Psidium* sp utilizados na presente pesquisa e conservados na coleção de germoplasma na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF, na Escola Agrícola Antônio Sarlo, Campos dos Goytacazes, RJ

Acesso	Espécie	Nome comum	Procedência	Número de plantas
<i>P. cattleyanum</i>	UENF F1P1	Araçá amarelo	Atafona- São João da Barra	10
	UENF F2P1			
	UENF F3P3			
	UENF F4P3			
	UENF F5P3			
	UENF F6P1			
	UENF F6P3			
	UENFF2P5	Araçá Coroa		1
<i>P. guineense</i>	UENF F3P10	Araçá do campo	Itaboraí- RJ	1

## 4.2. Metodologia

### 4.2.1. Análise Meiótica

Durante o período de floração, botões florais de diferentes tamanhos e em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados em solução de etanol: ácido acético, na proporção de 3:1, por 24h a 4°C. Em seguida, transferidos para uma solução de álcool 70% e conservados em geladeira a 4°C até serem utilizados. Para o preparo das lâminas, dez anteras por botão floral por indivíduo, de cada acesso estudado, foram maceradas (*squash*) sobre a lâmina em gotas de carmim acético 1%. Para acompanhar o processo meiótico, todas as células disponíveis, nas diferentes fases da divisão meiótica, foram examinadas. Todas as lâminas foram observadas sob microscópio óptico (*Olympus BX60*), e as imagens foram capturadas com o *cellSens Standard 1.8* (Olympus).

### 4.2.2. Frequência de gametas não reduzidos

Para a frequência de gametas não reduzidos tipo 2n, botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70% e conservados na geladeira. As lâminas, cinco por acesso, foram preparadas a partir da técnica de esmagamento (*squash*), onde anteras foram maceradas e coradas em carmim acético 1%. Tétrade com quatro células de mesmo tamanho foi considerada normal e qualquer desvio (mônade, díade, tríade e políade) foi considerado anormal. Sob microscópio óptico foram contabilizados 1.500 produtos pós-meióticos para cada acesso. A frequência foi obtida pela seguinte equação (Yan *et al.* 1997):

$$2n = \frac{(2 \text{ Díade} + \text{Tríade})}{(2\text{Díade} + 3\text{Tríade} + 4\text{Tétadre})} \times 100$$

Em que:

O numerador (2Díade + Tríade) representa o número total de gametas 2n observados. O denominador (2Díade + 3Tríade + 4Tétadre) representa o número total de gametas observados. Todas as lâminas foram observadas sob

microscópio óptico (*Olympus BX60*), e as imagens foram capturadas com o *cell Sens Standard 1.8* (Olympus).

#### 4.2.3. Índice Meiótico

Para a estimativa do índice meiótico (IM), conforme Love (1951), botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70% e conservados na geladeira a 4°C. No momento de preparo das lâminas, dez anteras foram maceradas em solução de carmim acético 1% e observadas sob microscópio, sendo preparadas cinco lâminas. Para a estimativa do índice meiótico foram contados os números de produtos pós-meióticos nas cinco lâminas analisadas, sendo contados 300 produtos pós-meióticos por lâmina, num total de 1500 produtos pós-meióticos. O índice meiótico é estimado pela relação entre o total de tétrades normais e o total de produtos pós-meióticos. Tétrade com quatro núcleos do mesmo tamanho foi considerada normal e qualquer desvio (mônade, díade, tríade e políade) foi considerado anormal. O índice foi obtido pela seguinte equação:

$$IM = \frac{\text{Número total de tétrades}}{\text{Número total de produtos pós - meióticos}} \times 100$$

Todas as lâminas foram observadas sob microscópio óptico (*Olympus BX60*), e as imagens foram capturadas com o *cellSens Standard 1.8* (Olympus).

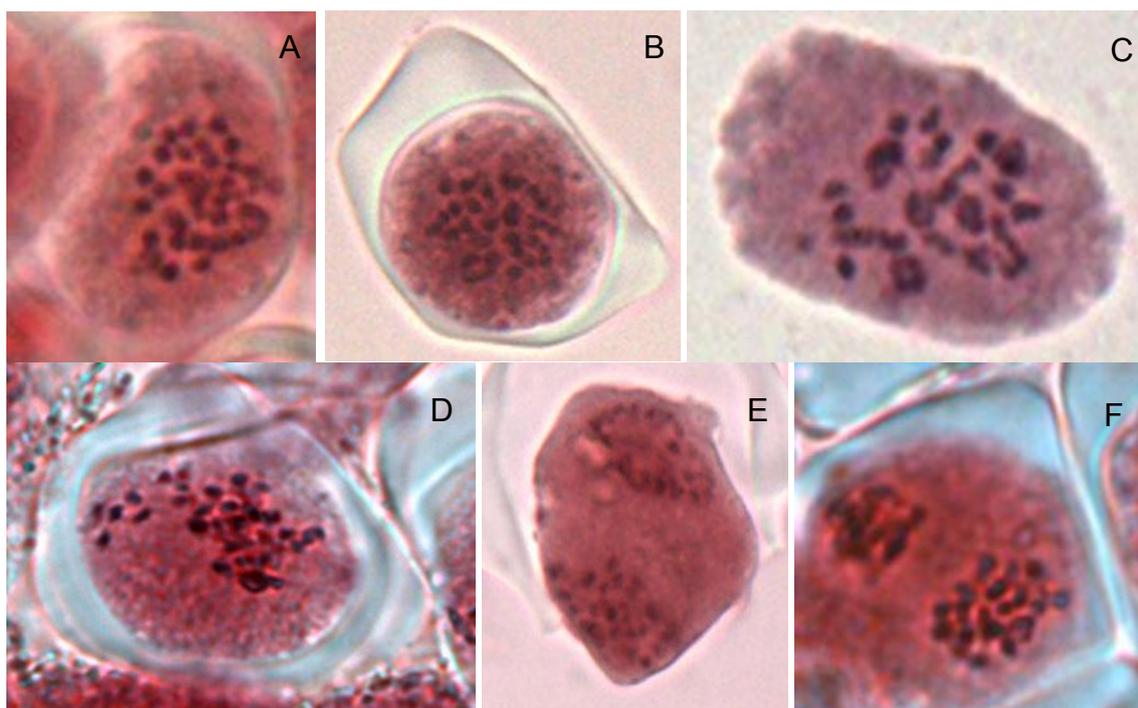
#### 4.2.4. Viabilidade Polínica

A viabilidade polínica dos acessos foi estimada via solução tripla de Alexander (Alexander, 1969). Para tal, botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70% e conservados a 4°C. Na preparação das lâminas, as anteras foram maceradas em uma gota do corante. Para cada acesso, foram feitas cinco lâminas e em cada lâmina vão ser contados 300 grãos de pólen, totalizando 1.500 grãos de pólen. Foram considerados viáveis os grãos com formato e tamanho regular e que apresentaram coloração púrpura. Foram considerados inviáveis os grãos que não coraram, com protoplasto contraído ou de formato e tamanho irregular.

Foi avaliado, também, o número de poros germinativos dos grãos de pólen, sendo considerados normais para o gênero, três poros germinativos. Todas as lâminas foram observadas sob microscópio óptico (*Olympus BX60*), e as imagens foram capturadas com o *cellSens Standard 1.8* (Olympus).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de cromossomos dos acessos variou, porém a variação foi maexpressiva na espécie *P. cattleyanum*, sendo que foram contados 33 cromossomos nos acessos UENF-F5P3, UENF-F6P1 e UENF-F6P3, em pró-metáfase I (Figura 1a, 1b e 1c, respectivamente), caracterizando-os como triploides  $2n=33$  cromossomos, já que o número básico do gênero é  $x=11$  cromossomos (Raven1975; Forni Martins e Martins 2007). O acesso UENF-F4P3 apresentou 30 cromossomos (Figura 1d), o UENF-F2P1 apresentou 44 cromossomos, onde é possível observar 22 cromossomos em cada polo da célula em telófase I (Figura 1e), caracterizando-o como tetraploide  $2n=4x=44$  cromossomos, e o acesso UENF-F3P3 apresentou 40 cromossomos (Figura 1f). Souza *et al.* (2014) encontraram acessos de *Psidium* sp. com número cromossômico variando entre 30 e 36, e acessos de *P. cattleyanum* tetraploides com  $2n=44$  cromossomos.



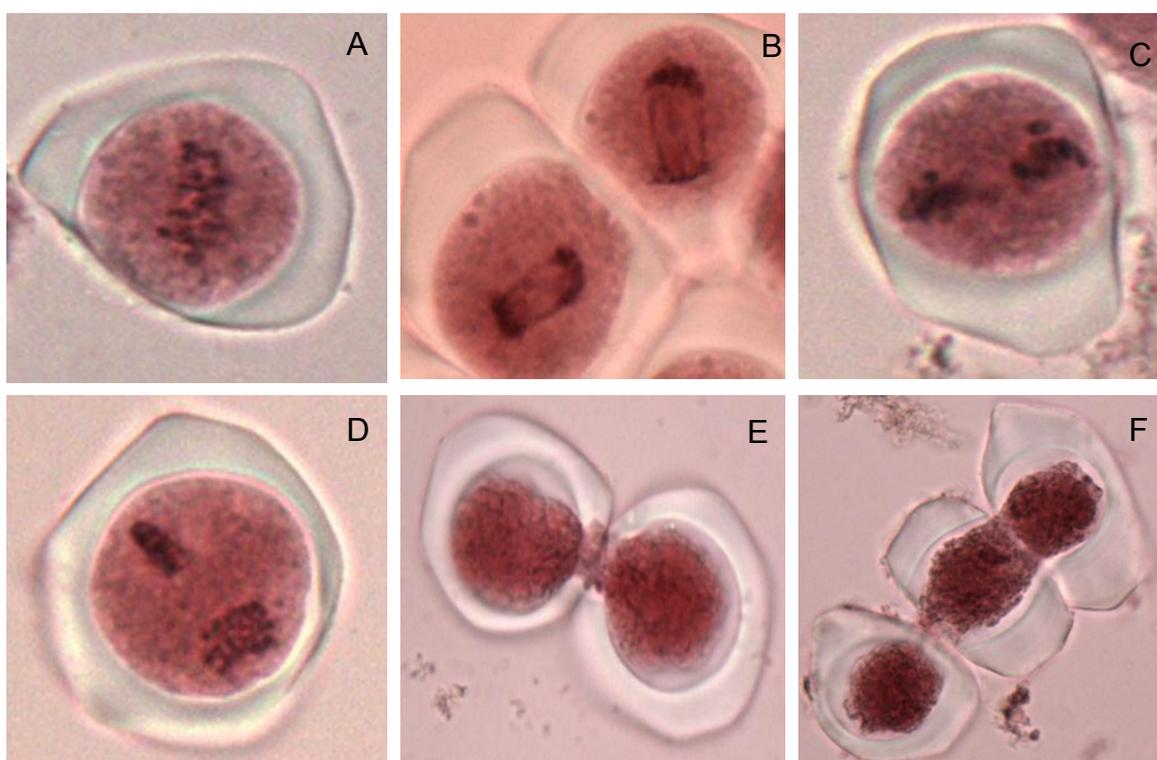
**Figura 1** – Meiose em *P. cattleyanum*. A) Pró-metáfase I em UENF-F5P3; B) Pró-metáfase I em UENF-F6P1; C) Pró-metáfase I em UENF-F6P3; D) Pró-metáfase I em UENF-F4P3; E) Telófase I em UENF-F2P1; F) Telófase I em UENF-F3P3.

A meiose foi relativamente normal para os acessos (Figuras 2 a-b), no entanto, algumas anormalidades foram observadas, como cromossomos retardatários (Figura 2C), divisão assíncronica (Figura 2D) e citomixia (Figura 2E-F). Os acessos UENF-F2P3, UENF-F4P5 (goiabeiras), UENF-F2P5 e UENF-F4P3 (araçazeiros) apresentaram o total de células meióticas com divisão normal de 91,5%, 93,9%, 88% e 86%, respectivamente (Tabela 2). Os acessos UENF-F1P1 e UENF-F2P1 apresentaram 89,1% e 87,7%, respectivamente, das suas células com divisão meiótica normal. Os acessos de araçazeiros (UENF-F3P3, UENF-F3P10, UENF-F5P3, UENF-F6P1 e UENF-F6P3) apresentaram divisão meiótica com 84%, 82,7%, 87%, 87,3% e 91,9% das células em divisões normais, respectivamente. O acesso UENF-F6P3 apresentou a menor porcentagem de anomalias meióticas entre os araçás.

As anomalias meióticas mais comuns na maioria das espécies estão relacionadas com falhas na segregação dos cromossomos (Pagliarini 2000), podendo tanto ser a ocorrência de cromossomos retardatários ou segregação precoce em metáfase e anáfase I. Os cromossomos retardatários podem ser

perdidos durante a divisão e podem dar origem a gametas aneuploides ou inviáveis (Batisttin et al, 2006). Cromossomo retardatário é caracterizado por um cromossomo ou conjunto de cromossomos que não se apresenta alinhado na placa equatorial durante a metáfase I ou II (Figura 2C).

Segundo Risso-Pascotto et al (2003), os cromossomos retardatários são, também, associados a presença de micronúcleos, no entanto apenas os acessos F2P1 e F6P1 apresentaram micronúcleos. A não presença de micronúcleos nos outros acessos pode ser devido à ação do mecanismo de *check-point*. Esse mecanismo pode ser acionado quando há atraso na divisão celular, caracterizado quando o cromossomo não apresenta o cinetócoro ligado às linhas do fuso, assim as proteínas desse complexo emitem um sinal para a ativação do *check-point* até que a situação seja regularizada. Desse modo, a formação de micronúcleos pode ter sido evitada. Nas células meióticas, os *check-points* conhecidos são  $G_1/S_1$ ,  $G_2/M$  e um ponto adicional que impede a segregação dos cromossomos na meiose I até o término da recombinação (Weinert, 1998).



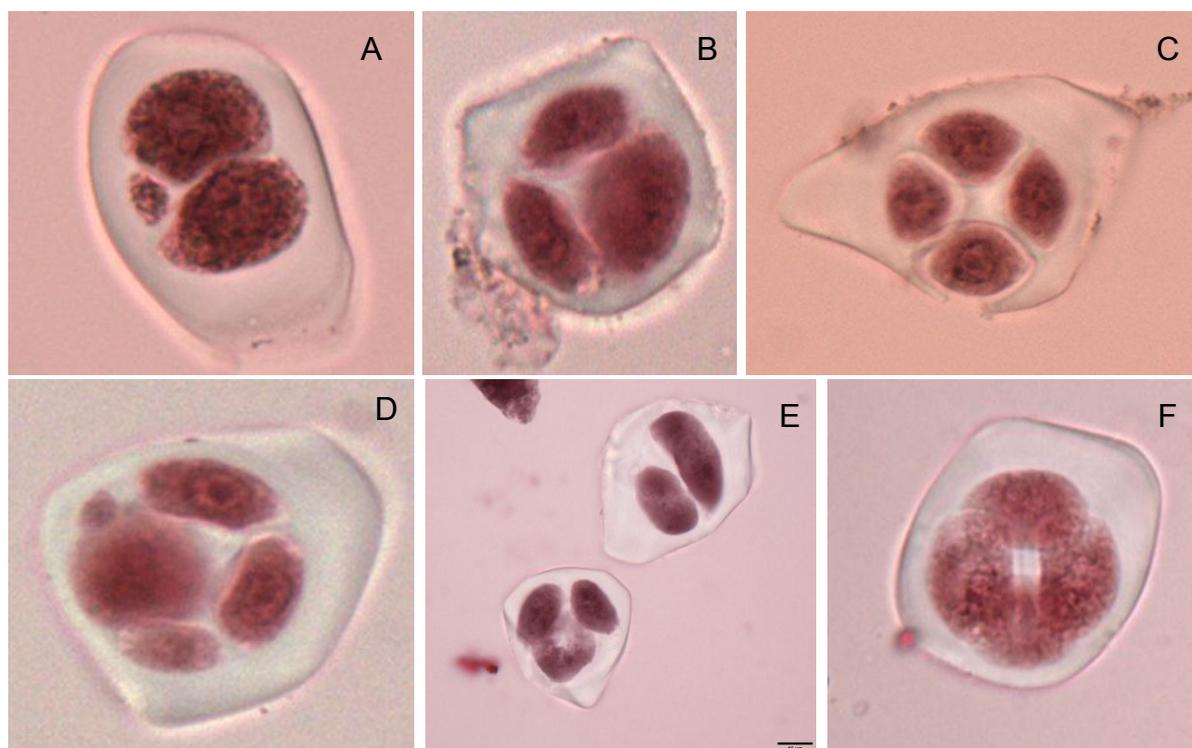
**Figura 2** – A) Metáfase I em UENF-F5P3; B) Anáfase I em UENF-F2P1; C) Cromossomos retardatários em metáfase II de UENF-F5P3; D) Divisão assincrônica com prófase e metáfase em UENF-F5P3; E) Citomixia em UENF-F2P1; F) Citomixia em UENF-F1P1.

Nos acessos UENF-F1P1 e UENF-F2P1 (araçazeiros), também foi observada a ocorrência de citomixia (Figura 2E - F), que é a migração de material genético, produtos gênicos e organelas entre células mãe do pólen, através de conexões citoplasmáticas (Falistocco et al. 1995). Dependendo do número de células envolvidas e do tipo de transferência, esse fenômeno pode levar à formação de micrósporos inviáveis, aneuploides não reduzidos ( $2n$ ) ou poliploides, quando dois micrósporos doam todo o seu material genético para um terceiro (Pierre e Sousa, 2011). Muitos fatores podem levar à ocorrência da citomixia, tais como fatores genéticos (Nirmala e Kaul, 1994), alterações fisiológicas (Bell, 1964), mudanças de temperatura durante a meiose (Souza e Pagliarini, 1997) ou agentes químicos (Gulfishan et al., 2010).

**Tabela 2-** Porcentagem de anomalias meióticas observadas nos acessos representantes das espécies *P. guajava*, *P. cattleyanum*, e *P. guineense*.

Anomalias meioticas	Acessos										
	<i>P. guajava</i>		<i>P. cattleyanum</i>								<i>P. guineense</i>
	UENF F2P3	UENF F4P5	UENF F1P1	UENF F2P1	UENF F2P5	UENF F3P3	UENF F4P3	UENF F5P3	UENF F6P1	UENF F6P3	UENF F3P10
Cromossomo retardatário	7,5	6,1	10,1	12,3	12,0	13,0	14,0	9,0	10,7	8,1	15,3
Divisão assincrônica	1,0	0	0	0	0	3,0	0	4,0	2,0	0	2,0
Total de células anormais	8,5	6,1	10,1	12,3	12,0	16,0	14,0	13,0	12,7	8,1	17,3

Quanto à frequência de gametas não reduzidos  $2n$  (Tabela 3), todos os acessos estudados apresentaram uma frequência de gametas não reduzidos superiores a 1%, valor considerado normal para a maioria das populações naturais de plantas (Schifino-Wittmann e Dall'agnol, 2001). Gametas não reduzidos  $2n$  são gametas que apresentam o mesmo número cromossômico que as células somáticas, ou seja, não sofrem redução de cromossomos durante a meiose. O acesso UENF-F2P1 (araçazeiro) apresentou a maior frequência de gametas não reduzidos entre os acessos estudados, 31,3%; essa frequência tão alta pode ter ocorrido devido ao grande número de díades (Figura 3A), já que ela dá origem a dois gametas  $2n$ , em comparação a tríade que dá origem a apenas um gameta  $2n$ . A origem da díade é causada por falha na redução cromossômica na meiose I pelo mecanismo de restituição na primeira divisão (RPD), onde os cromossomos não migram para os polos na anáfase I (Schifino-Wittmann e Dall'agnol, 2001).



**Figura 3** – Produtos pós-meióticos em *Psidium*. A) Díade com micronúcleo em UENF-F2P1; B) Tríade em UENF-F6P1; C) Tétrade em UENF-F2P5; D) Tríade com micronúcleo em UENF-F6P1; E) Tríade e Díade em UENF-F3P3; F) Tétrade em UENF-F6P3.

Os acessos UENF-F5P3, UENF-F6P1 e UENF-F6P3 apresentaram frequências de gametas  $2n$  de 7,5%, 9,4% e 8,8%, respectivamente. Sendo que nesses acessos o produto pós-meiótico anormal mais comum foi a tríade (Figura 3B), que é formada pelo mecanismo de restituição de segunda divisão (RSD), onde ocorre falha na citocinese e na restituição do núcleo  $2n$ . Os mecanismos RPD e RSD apresentam consequências genéticas diferentes, já que os gametas produzidos por RPD transferem cerca de 80% de heterozigose dos progenitores para a progênie e uma alta proporção das interações epistáticas são mantidas (Peloquin1981). Já nos gametas originados pelo RSD, cerca de 45% da heterozigose dos progenitores é transferida a progênie.

**Tabela 3.** Frequência de gametas 2n (F2n-%), índice meiótico (IM), e número de produtos pós-meióticos tipo Mônades (M), Díades (D), Tríades (T) e Tétrades (TT), em acessos representantes das espécies *P. guajava*, *P. cattleyanum*, e *P. guinense*.

	<i>P. guajava</i>					<i>P. cattleyanum</i>				<i>P. guinense</i>	
	UENF F2P3	UENF F4P5	UENF F1P1	UENF F2P1	UENF F2P5	UENF F3P3	UENF F4P3	UENF F5P3	UENF F6P1	UENF F6P3	UENF F3P10
F2n	3,1	1,7	11,2	31,3	10,0	7,0	6,0	7,5	9,4	8,8	12,5
IM	87,8	93,2	66,6	40,6	69,8	75,2	78,6	72,6	68,6	69,7	59,4
M	0	0	0	0	8,0	4,0	2,0	0	0	0	15
D	0	0	101	540	93	14	25	20	46	32	66
T	182	102	400	345	351	352	292	384	425	422	528
TT	1318	1398	999	610	1048	1129	1180	1090	1029	1046	891

A utilização de gametas não reduzidos do tipo  $2n$  pode ser uma ferramenta muito importante no melhoramento de plantas, podendo ser utilizada na poliploidização sexual ou como meio de transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes (Ramana, 1992; Ramsey e Schemske 1998). Em batata, a produção de tubérculos de clones tetraploides obtidos por colchicina não sofreu diferença, em comparação aos clones tetraploides obtidos por poliploidização sexual que apresentaram produção significativamente maior (Peloquin et al. 1989).

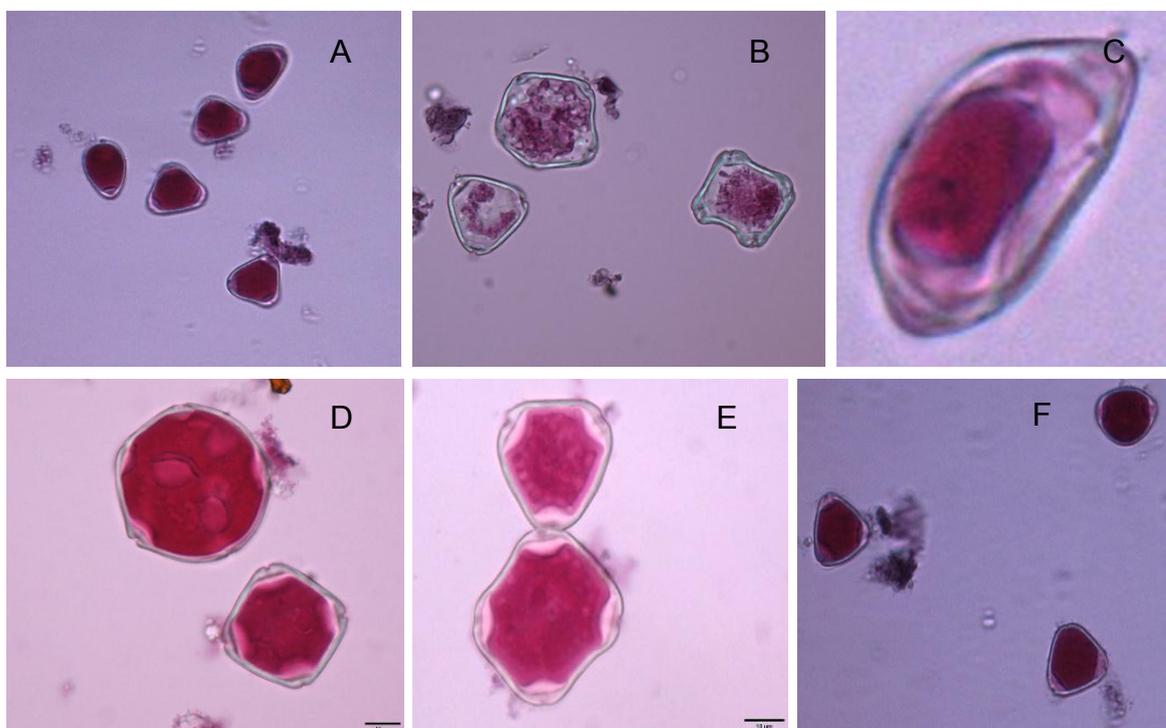
Simioni (2004) obteve sucesso em aumentar a frequência de gametas não reduzidos em trevo vermelho (*Trifolium pratense*), utilizando ciclos de seleção. Foi utilizada a morfologia do grão de pólen como meio de detecção de gametas não reduzidos, sendo o pólen de maior tamanho que o normal (macropólen) caracterizado como não reduzido. A autora obteve já na primeira triagem, a procura de plantas produtoras de gametas não reduzidos, uma população com alta frequência de indivíduos produtores de macropólen.

O produto pós-meiótico mais comum, para a maioria dos acessos foram as tétrades (Figura 3c), que são resultantes de uma divisão meiótica normal. Pelo Índice Meiótico (Love, 1951) os acessos de goiabeira (UENF F2P3 e UENF F4P5) apresentaram o maior índice mitótico, 87,8 e 93,2%, respectivamente (Tabela 3). Os acessos de *P. cattleyanum* apresentaram uma variação alta, sendo o acesso com maior índice meiótico o UENF F4P3, com 78,6% e o acesso UENF F2P1 com o menor índice, 40,6%. O acesso de *P. guineense* UENF F3P10 também apresentou um índice baixo, 59,4%.

Segundo Love (1951), plantas que apresentam índice meiótico menor que 90% são caracterizadas como meioticamente instáveis. Desse modo, apenas o acesso de goiabeira UENF F4P5 apresentou índice superior a 90%, configurando, então, uma meiose estável. O restante dos acessos apresentou índice meiótico inferior a 90%, caracterizando-os como tendo a meiose instável.

Quanto à viabilidade polínica dos acessos, a mesma variou de 47% a 79,6% para os araçás e 95 a 99,6% para as goiabeiras (Tabela 2), onde a porcentagem mais baixa foi do acesso UENF-F3P10, 47%, provavelmente um acesso semi-estéril e pouco útil para o melhoramento, se utilizado como genitor masculino. Essa viabilidade baixa pode ser explicada pelo alto número de produtos pós-meióticos anormais do tipo díade e tríade. Foi possível observar

uma correlação positiva entre o número de tétrades normais e a viabilidade do pólen. Causas não genéticas, incluindo estágio do pólen e fatores físicos como temperatura e umidade, são citadas como fatores que podem afetar a viabilidade do pólen (Palma-Silva et al., 2008). O estudo da viabilidade do grão de pólen é importante para investigação de problemas de fertilidade que a planta possa apresentar (Peñaloza, 1995). Coser et al. (2012) trabalharam com genótipos *P. guajava* de diferentes procedências e encontraram variação entre as viabilidades polínicas, no entanto, todos os genótipos apresentaram viabilidade alta, acima de 70%.



**Figura 4** – A) Grãos de pólen viáveis com dois e três poros germinativos em UENF-F2P3; B) Grãos de pólen inviáveis com três, quatro e cinco poros em UENF-F1P1; C) Grão de pólen com dois poros em UENF-F5P3; D) Pólen com cinco e quatro poros em UENF-F2P1; E) Grãos de pólen com três e quatro poros em UENF-F2P5; F) Pólen viável com dois e três poros em UENF-F4P5.

**Tabela 4-** Viabilidade polínica (VP - %) e percentagem de aberturas germinativas por pólen (AG - %) nos acessos representantes das espécies *P. guajava*, *P. cattleyanum*, e *P. guineense*.

	<i>P. guajava</i>					<i>P. cattleyanum</i>				<i>P. guineense</i>	
	UENF F2P3	UENF F4P5	UENF F1P1	UENF F2P1	UENF F2P5	UENF F3P3	UENF F4P3	UENF F5P3	UENF F6P1	UENF F6P3	UENF F3P10
VP	95,0	99,6	68	53,8	79,6	71,5	76,7	73,6	76,0	77,1	47,0
1AG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8
2AG	12,4	10	0	10,7	20	13	24	7,3	12	11,3	4,6
3AG	86,2	84,6	91,3	61,3	71,0	71,0	74,0	76,0	73,8	72,3	79,6
4AG	1,4	5,4	5,7	12	5,3	16,0	2,0	14,7	13,0	16,4	11,4
5AG	0	0	3,0	16	3,7	0	0	2,0	1,2	0	3,6

AG: Abertura Germinativa.

Uma característica observada nesse estudo foi a ocorrência de grãos de pólen com mais de três poros germinativos (Figura 4b, 4d e 4e), sendo o normal considerado para a maioria das dicotiledôneas a presença de três poros (Fukushima e Shoichi, 1964). Foram observados grãos de pólen com três ou mais poros germinativos em todos os acessos, entretanto os araçazeiros apresentaram, em sua maioria, maior porcentagem de grãos de pólen com mais de três poros maiores que os dois acessos de goiabeiras, sendo essa característica mais um indicativo da natureza poliploide dos acessos de araçazeiro.

O número, a posição e a orientação dos poros do grão de pólen estão diretamente ligados ao padrão da citocinese meiótica na antera (Blackmore e Crane, 1998). A formação da parede celular em microsporócitos ocorre de duas formas, a primeira maneira seria a sucessiva, onde a calose é formada depois da meiose I e novamente no final da meiose II, ou do modo simultâneo, onde a citocinese não ocorre até o final da divisão meiótica. A maioria das eudicotiledôneas apresenta citocinese simultânea. (Ressayre et al., 1988).

Najcevaska e Speckmann (1968) estudaram as espécies *Trifolium pratense*, *Trifolium alexandrinum* e *Trifolium repens*, tanto diploides e tetraploides e observaram que nas três espécies, ao duplicar o número de cromossomos, ocorreu um aumento significativo na quantidade de grãos de pólen com mais de três poros germinativos, sendo a variação no número de poros germinativos maior nas plantas autoploides do que nas não duplicadas.

Fukushima e Shoichi (1964), trabalhando com diversas espécies da tribo *Brassicaceae* (gêneros *Brassica*, *Sinapis*, *Raphanus* e *Crambe*), composta de indivíduos diploides e poliploides artificiais, constataram que o número de poros germinativos nos grãos de pólen mais comum foi três, exceto para poucos poliploides. Observou também que a poliploidia está relacionada, nesta tribo, com uma maior ocorrência de grãos de pólen com número de poros anormal, sendo que o aumento de genomas está diretamente relacionado com o aumento no número de poros. Também foi constatado que a ocorrência de grãos com quatro poros foi mais frequente em autotetraploides do que em alotetraploides.

## 6. CONCLUSÕES

Foi possível determinar o nível de ploidia de quatro acessos de *P. cattleyanum*, sendo UENF-F5P3, UENF-F6P1 e UENF-F6P3 triploides e UENF-F2P1 tetraploide. Os acessos utilizados nesse estudo apresentaram comportamento meiótico normal; entretanto, apresentaram alta frequência de gametas não reduzidos tipo  $2n$ . O acesso com a maior frequência de gametas  $2n$ , UENF F2P1, também apresentou a menor viabilidade polínica, o que pode dificultar a utilização dos gametas  $2n$  masculinos. Um modo de contornar essa dificuldade é utilizar o acesso como receptor de pólen, tornando importante estudar os gametas femininos e averiguar se a frequência de gametas  $2n$  também é alta. Os dois acessos de goiabeira obtiveram viabilidade polínica satisfatória, bem como a maioria dos acessos de *P. cattleyanum*. Foi observado que os acessos poliploides apresentaram grãos de pólen com aberturas germinativas superiores a três.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M.P. 1969. Differential staining of aborted non aborted pollen. *Stain Technology*, v.44, p.117-122.
- Almeida, E.J. 2008. O nematoide de galha da goiabeira: identificação, hospedeiros e ação patogênica, sobre goiabeiras. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (SP), 97 p.
- Almeida, J.G.F. 2002. Barreiras às exportações de frutas. *Fitopatologia Brasileira*, v.27p.
- Batisttin, A., Conterato, I. F., Pereira, G.M., Pereira, B. L., Da Silva, M. F. 2006. Biologia floral, microsporogênese e número cromossômico em cinco espécies de plantas utilizadas na medicina popular no Rio Grande do Sul. Ver. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*. 8(3): 56 – 62.
- Bell, C.R. 1964. Cytomixis in *Tauschianudicalis* Schlecht (Apiaceae). *Cytologia*, 29: 369-388.
- Bezerra, J. E. F., Lederman, I. E., Silva Junior, J. F., Proença, C. E. B. 2006. Araçá. Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil, Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, Ed. 1, 42 p.

- Bingham, E.T. 1980. Maximizing heterozigosity in autopolyploids. Lewis, W.H. Polyploidy: Biological relevance, New York : 471-489.
- Borém, A. 1999. Melhoramento de Espécies Cultivadas. Ed. Viçosa, UFV. 679-714p.
- Brandão, M.; Laca-Buendía, J. P.; Macedo, J. F. 2002. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: EPAMIG. 528 p.
- Bruckner, C. H. 2002. Melhoramento de fruteiras tropicais. In: Melhoramento genético de Goiabeira. Viçosa: UFV, 267-307p.
- Coser, S. M.; Praça-Fontes, M. M.; Silva-Ferreira, M. F. 2012. Assessment of Pollen Viability in Guava Genotypes. ISHS, Acta Horticulture 959: III International Symposium on guava and other Myrtaceae.
- Costa, I. R. e Forni-Martins, E. R. 2004. Estudos cromossômicos em *Eugenia* L., *Myrciaria* O. Berg e *Plinia* L. (Myrtaceae, subtribo Eugeniinae) no sudeste do Brasil. Australian Journal of Botany.
- Costa, I. R. e Forni-Martins, E. R. 2007. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 155: 571-580.
- Costa, I.R.; Dornelas, M.C.; Forni-Martins, E.R. 2008. Evolution of nuclear DNA amounts in Neotropical Myrtaceae (fleshy-fruited Myrteae). Plant Syst Evol, Austria, 276:209–217.
- Costa, S. R., Santos, C. A. F., Nunes, E. D., Diniz, L. S. 2010. Cruzamentos interespecífico no gênero *Psidium*. Documentos EMBRAPA 228, Anais V- 75p.
- Damasceno Junior, P.C.; Costa, F.R.; Pereira, T.N.S.; Freitas Neto,M.; Pereira, M.G. 2009. Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L). Caryologia, 62:10-15p.

- Damiani, C. 2009. Caracterização e agregação de valor aos frutos do cerrado: Araçá (*Psidium guineensis* SW.) e Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) Lavras, Minas Gerais.
- Éder-Silva, E.; Felix, L.P.; Bruno, R. De L. A. 2007. Citogenética de algumas espécies frutíferas nativas do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 110-114.
- Falisticco, E.; Tosti, N.; Falcinelli, M. 1995. Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of origins of 2n gametes. *Journal of Heredity*, 86: 448-453.
- Franzon, R. C.; Campos, L. Z. O.; Proença, C. E. B.; Souza-Silva, J. C. 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 48 p.
- Fukushima, E.; Shoichi, I. 1964. On the relationship between the polyploidy and the occurrence of pollen-grains with an increased number of germinal apertures in the tribe Brassiceae. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, Vol. 13, p. 351-359.
- Gomes Filho, A.; Oliveira, J. C.; Viana, A. P.; Siqueira, A. P. O.; Oliveira, M. G.; Pereira, M. G. 2010. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidium guajava* L.). *Acta scientiarum. Agronomy* 32 (4): 627-633.
- Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B. K.; Landrum, L. L.; Matsumoto, K.; Mazine, F. F.; Lughada, E. N.; Proença, C.; Soares-Silva, L. H.; Wilson, P. G.; Lucas, E. 2009. World checklist of Myrtaceae. The board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Guerra, M.; SOUZA, M.J. 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. FUNPEC, Brazil

- Gulfishan M, Khan AK & Bhat TA. 2010. Studies on cytotoxicity induced by DES and SA in *Vicia faba* var. major. *Turkish Journal of Botany* 34: 31-37.
- Hartman HT, Kester DE, Davies JRFT, GeneveRL. 1997. *Plant propagation: principles and practices*, 6th edn. Prentice Hall, New Jersey.
- Koller, O. C. 1979. *Cultura da goiabeira*. Porto Alegre: Agropecuária, 44p.
- Laughlin, C.W.; Lordello, L.G.E. 1977. Sistemas de manejo de nematoides: relações entre a densidade de população e os danos à planta. *Sociedade Brasileira de Nematologia*, 2: 15-24.
- Lorenzi, H.1992. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 368p.
- Love, R.M. 1951. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal*, v.43, p.72-76.
- McCoy, T.J., Bingham, E.T. 1991. Alfalfa cytogenetics. Tsuchiya, T., Gupta, P.K. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B*. Amsterdam: 399-418.
- Mcvaugh, R. 1956. Tropical American Myrtaceae. Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. *Fieldiana Botany*, 29(3).
- Miranda, G.B., Souza, R.M., Viana, A.P.2011. Assessment of methods and criteria for screening *Psidium* spp. for resistance to *Meloidogyne enterolobii*. *Nematologia Brasileira*, 34: 211-219.
- Najčevska, C.M.; Speckmann, G.J. 1968. Numbers of chloroplasts and pollen grain pores in diploid and tetraploid varieties of some *Trifolium* species. *Euphytica* 17: 357-362.

- Negri, V. 1992. Frequency of big pollen occurrence in natural populations of *Lotus tenuis* Wald et Kit. Mariani, A., Tavoletti, S. Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspective, Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 51-53.
- Nirmala, C.; Kaul, M.L.H. 1994. Male sterility in pea VI: Gene action duplicity. *Cytologia*, 59: 195-201.
- Ochse, J.J.; Soule JÚNIOR, M.J.; Dijkman, M.J.; Wehlburg, C. 1966. Tropical and subtropical agriculture, New York: Mac Millan.
- Ortiz, R., Vorsa, N., Bruederle, L.P., Lavery, T. 1992. Occurrence of unreduced pollen in diploid blueberry species, *Vaccinium* sect. *Cyanococcus*. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 85: 55-60.
- Pagliarini MS. 2000. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterily. *Genetics and Molecular Biology* 23: 997-1002.
- Paszko, B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution* 258: 39-48p.
- Peloquin SJ. 1981. Chromosomal and cytoplasmic manipulations. In: FREY, K.J. *Plant Breeding*. Ames: The Iowa State University, p.117-150.
- Peloquin, S.J. 1983. Genetic engineering and with meiotic mutants. Mulcahy, D.L., Ottaviano, E. *Pollen: biology and implications for plant breedin*, New York: 310-316.
- Peñaloza ADPS. 1995. Germinação de sementes de *Arachispintoi* obtidas em condições distintas de multiplicação. In: *Reunião Brasileira de Zootecnia*, 32. Brasília, DF. Anais... Brasília: SBT. 78-79.

- Pereira F.M., Martinez Jr. M. 1986. Goiabas para industrialização. Jaboticabal: Legis Summa. 142p.
- Pereira, F. M.; Nachtigal, J. C. 2002. Melhoramento de Fruteiras Tropicais. Editora UFV, Viçosa.
- Pereira, F.M. 1995. Cultura da goiabeira. Jaboticabal, SP: Funep, 47 p.
- Pereira, F.M.; Nachtigal, J.C. 2003. Melhoramento da goiabeira. 1995 In: Rozane, D. E.; Couto, F. A. d'A. Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado. Viçosa: UFV. p. 53- 78.
- Pereira, F.O.M.; Souza, R.M.; Souza, P.M.; Dolinski, C.; Santos, G.K. 2009. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira*, v.33, p.176-181.
- Pessanha, P. G. O.; Viana, A. P.; Junior, A. T. A.; Souza, R. M.; Teixeira, M. C.; Pereira, M. G. 2011. Avaliação da diversidade genética em acessos de *Psidium* spp. via marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):129–136.
- Price, H. J.; Johnston, J. S. 1996. Analysis of plant DNA content by Feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: Jauhar P (ed.). *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Boca Raton, pp 115-131.
- Ramanna, M.S. 1992. The use of 2n gametes in breeding polysomic polyploid species: some achievements and perspectives. Mariani, A., Tavoletti, S. Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspective, Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 91-99.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 467-501.

- Raseira, M.C.B.; Raseira, A. 1996. Contribuição ao estudo do araçazeiro: *Psidium cattleianum*. Pelotas. Embrapa/CPACT, p.33-45.
- Raven, P.H. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62:724-764.
- Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., Valle, C. B. 2003. Mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. *Genome*. 46: 724 – 728.
- Rossi, C.E.; Ferraz, L.C.C.B. 2005. Fitonematoides da superfamília Criconematoidea e Dorylaimoidea associados a fruteiras de clima subtropical e temperado nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Nematologia Brasileira*, 29 (2): 183-192.
- Salunkhe, D.K.; Kadam, S.S. 1995. *Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage and Processing*. Marcel Dekker, 611p.
- Santos, M. S.; Petkowicz, C. L. O; Wosiacki, G.; Nogueira, A.; Carneiro, E. B. B. 2007. Caracterização do suco de araçá vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine) extraído mecanicamente e tratado enzimaticamente. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.29, p.617-621.
- Singh, R. J. 1993. *Plant cytogenetics*. 2. ed. Flórida: CRC Press, 488p.
- Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. 2014. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>.
- Soubih Sobrinho, J. 1951. Estudos básicos para o melhoramento da goiabeira (*Psidium guajava* L.). São Paulo: ESALQ, 166p. Tese de Doutorado.
- Soubihe Sobrinho, J.; Gurgel, J. T. A. 1962. Taxa de panmixia na goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Bragantia* V.21, n.2, p. 15-20.

- Souza, A. G. 2011. Caracterização molecular, citogenética e seleção de espécies de Myrtaceae resistentes nematoide *Meloidogyne enterolobii* Lavras. UFLA, 118 p.
- Souza, A. G.; Resende, L. V.; Lima, I. P.; Martins, L. S. S.; Techio, V. H. 2014. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and comercial varieties of guava tree. *Plant Syst Evol.*
- Souza, A.M.; Pagliarini, M. S. 1997. Cytomixis in *Brassic napus* var. oleífera and *Brassica campestris* var. oleífera (Brassicaceae). *Cytologia*, 62: 25-29.
- Souza, M. M.; Pereira, T. N. S.; Rodrigues, R.; Dutra, G. A.; Sudré, C. P. 2000. Irregularidades meióticas em pimenta. *Horticultura Brasileira*, v18, 748-749p.
- Vitti, A. 2009. Análise da competitividade das exportações brasileiras de frutas selecionadas no Mercado internacional. 105 f. Economia aplicada, ESALQ – Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Vijayakumar, N. & Subramanian, D. 1985. Cytotaxonomical and pollination studies in South Indian Myrtaceae. *Cytologia* 50: 513-520.
- Wagenwoort, M., Den Nijs, A.P.M. 1992. Implications of 2n pollen for breeding tetraploid perennial ryegrass. Mariani, A., Tavoletti, S. Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspective, Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 5-13.
- Weinert, T. 1998. DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8: 185 – 193.
- Yan, G., Ferguson, A.R., Mc Neilage, M.A., Murray, B.G. 1997. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. *Euphytica*, Wageningen, (96): 267-272.