

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
LOHANNA BALTAR PINTO DE OLIVEIRA

**COMPORTAMENTO MEIÓTICO E ANÁLISE POLÍNICA DE CEREJEIRA-DO-
MATO (*Eugenia involucrata* DC – Myrtaceae)**

Curitibanos

2015

LOHANNA BALTAR PINTO DE OLIVEIRA

COMPORTAMENTO MEIÓTICO E ANÁLISE POLÍNICA DE CEREJEIRA-DO-MATO (*Eugenia involucrata* DC – Myrtaceae)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia do campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Dra. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro

Curitibanos

2015



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 131 CEP: 89520-000 - Caixa Itabanos - SC
TELEFONE (048) 3723-2178 E-mail: agronomia.cba@contato.ufsc.br.

LOHANNA BALTAR PINTO DE OLIVEIRA

Comportamento meiótico e análise polínica de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC- Myrtaceae).

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a): Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro

Data da defesa: 04/12/2015

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro
Titulação: Doutora
Área de concentração em Genética / Citogenética de Plantas
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Karine Louise dos Santos
Titulação: Doutora
Área de concentração em Agroecologia
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Leocir José Welter
Titulação: Doutor
Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas
Universidade Federal de Santa Catarina

Local: Universidade Federal de Santa Catarina

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

De Oliveira, Lohanna Baltar Pinto
Comportamento meiótico e análise polínica de cerejeira-do
mato (*Eugenia involucrata* DC - Myrtaceae) / Lohanna Baltar
Pinto De Oliveira ; orientadora, Patrícia Maria Oliveira
Pierre Castro - Curitibanos, SC, 2015.
53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Meiose. 3. Palinologia. 4. Eugenia. I.
Castro, Patrícia Maria Oliveira Pierre . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III.
Título.

Dedico a minha família e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu refúgio e fortaleza, pelo seu infinito amor e pelas bênçãos recebidas.

A minha família, que é meu alicerce, por todo amor, compreensão e conselhos. Agradeço imensamente por serem incansáveis incentivadores do meu crescimento profissional.

Aos meus amigos por estarem sempre dispostos a compartilhar os bons e maus momentos, e por saberem compreender, muitas vezes, a minha ausência.

À minha orientadora, por todo empenho, dedicação e ensinamentos. O trabalho torna-se uma prazerosa atividade quando desenvolvido ao lado de pessoas como você.

Aos meus professores, por todo conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas de curso e estágio, por todas as risadas, trocas de experiências e trabalhos desenvolvidos em conjunto.

À UFSC, pela estrutura. Seu compromisso com a excelência faz toda diferença!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

A cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC) é uma espécie nativa do sul do Brasil, que apresenta elevado potencial econômico a ser explorado, em virtude principalmente das características organolépticas de seus frutos. Estes são destinados ao consumo *in natura*, à produção de licores e geléias pela agroindústria familiar e utilizados para a produção de fitoterápicos. Esta espécie apesar de apresentar grande potencial agrônomo a ser explorado, ainda permanece subutilizada quando comparada a outras frutíferas. Outra problemática que envolve o gênero *Eugenia* consiste na complexidade de delimitação dos seus táxons. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo citogenético, com enfoque na determinação do nível de ploidia e análise do comportamento meiótico e dos grãos de pólen, que fornecem informações de caráter relevante quando associados a estudos evolutivos ou quando aplicados como informações auxiliares em programas de melhoramento genético. Amostras de inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas para a realização de análises citogenéticas e palinológicas para análise do comportamento meiótico, determinação do nível de ploidia, índice meiótico, viabilidade polínica e morfologia dos grãos de pólen. As análises permitiram concluir que os indivíduos analisados apresentam $2n=2x=18$ cromossomos e possuem meiose regular, já que não foram observadas alterações cromossômicas nas fases avaliadas, indicando assim uma alta estabilidade meiótica. Estes dados foram confirmada pelo índice meiótico e pela viabilidade polínica que se apresentaram superiores a 95%. A morfometria dos grãos de pólen contrastou com dados previamente relatados na literatura para a espécie, mostrando que a mesma apresenta grãos caracterizados como mônades, pequenos, verrugado, prolatos, sincolpados, de simetria bilateral e âmbito triangular.

Palavras-chave: Cerejeira-do-Rio-Grande. Meiose. Palinologia.

ABSTRACT

The cherry-eating fox (*Eugenia involucrata* DC) is a native specie of south Brazil, which has high economic potential to be explored, mainly due to the organoleptic characteristics of their fruits, which are intended for fresh consumption or liquors and jams production by the agroindustry, highlighting yet, their possible use for the production of phytotherapeutic products. Despite this specie has a great agronomic potential to be handled, it remains underutilized when compared to other fruit. In addition, another problem involving Myrtaceae species, in particular the genus *Eugenia*, is the complexity of delimitation of their taxa. Therefore, this study aimed to carry out a cytogenetic analysis focused on determining the ploidy level and analysis of meiotic behavior and pollen grain, which constitute relevant informations when associated with evolutionary studies or when applied as auxiliary information in future improvement genetic programs. Inflorescences samples at different stages of development were collected for carrying out cytogenetic and pollen analysis for analysis of the meiotic behavior, determination of the ploidy level, meiotic index, pollen viability and pollen grains morphology. The analyzes enabled to conclude that the individuals analyzed presented $2n=2x=18$ chromosomes, have regular meiosis, since chromosomal changes do not were observed in all evaluated phases, thus indicating a high stability meiotic, which was confirmed by the meiotic index and the pollen viability that showed up more than 95%. The morphometry of the pollen grains contrasted with data previously reported in the literature for the specie, showing that, it has grains characterized as monads, small, verrucate, prolate, sincolpate, bilateral symmetry and triangular ambit.

Keywords: Cherry of the Rio Grande. Meiosis. Palynology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA.....	12
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	15
2.2 ASPECTOS CITOTAXONÔMICOS DA FAMÍLIA MYRTACEAE E DO GÊNERO <i>Eugenia</i>	18
2.3 PALINOLOGIA DA FAMÍLIA MYRTACEAE E DO GÊNERO <i>Eugenia</i>	23
2.4 CITOGENÉTICA.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	28
3.2.1 Análise meiótica e determinação do nível de ploidia	28
3.3 PALINOLOGIA.....	30
3.3.1 Viabilidade polínica	30
3.3.2 Citoquímica	30
3.3.3 Morfologia	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA	33
4.1.1 Comportamento meiótico e determinação do nível de ploidia	33
4.1.2 Viabilidade dos grãos de pólen	39
4.2 PALINOLOGIA.....	41
4.2.1 Caracterização citoquímica	41
4.2.2 Morfometria	42
4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae apresenta espécies de expressiva representatividade do bioma brasileiro, sendo algumas utilizadas na medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas. Trata-se de uma das famílias botânicas mais conhecidas, devido ao potencial tecnológico de espécies nativas, com frutos em condições para a industrialização, que apresentam bom rendimento em polpa, aroma característico e presença de compostos fitoquímicos com propriedades antioxidantes (CAMLOFSKI, 2008).

No Brasil, a família das mirtáceas compreende 23 gêneros e 999 espécies, de alto potencial a ser explorado como espécies ornamentais ou com destino à produção comercial de frutos. Entre os gêneros brasileiros, destaca-se o gênero *Eugenia*, como um dos maiores, abrangendo aproximadamente 600 espécies (SOBRAL *et al.*, 2014).

Espécies desse gênero apresentam valor comercial, nutritivo e potencial ornamental, além de seu aproveitamento na obtenção de fármacos (REGO, LAVORANTI; NETO, 2006). Além disso, algumas espécies também podem ser utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente, por apresentarem frutos amplamente consumidos pela avifauna, o que auxilia na dispersão das sementes (DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007).

Um exemplo de espécie com diversas potencialidades é a *Eugenia involucrata* DC, popularmente conhecida como cerejeira-do-mato ou cerejeira-do-rio-grande, nativa do sul do Brasil, que apresenta elevado potencial econômico a ser explorado, em virtude principalmente das características organolépticas dos seus frutos, sendo estes, destinados ao consumo *in natura* ou à produção de licores e geléias pela agroindústria, e ainda, por sua possível utilização para produção de fitoterápicos (CAMLOFSKI, 2008).

No entanto, grande parte dessas espécies ainda permanece subutilizada uma vez que o setor frutícola nacional, em sua maioria, ainda tem direcionado suas ações ao cultivo de espécies exóticas que são adaptadas a condições climáticas do país. De acordo com Prado (2009), a espécie vem sendo cultivada somente em pomares domésticos nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. No exterior, a produção da

cerejeira-do-mato, denominada erroneamente de *Eugenia aggregata* (SHARPE; SHERMAN; BENDER, 1996; LORENZI *et al.*, 2006) é considerada significativa.

Associada à sua baixa exploração comercial, dados citogenéticos e palinológicos são escassos para *E. involucrata*. Tais estudos são importantes por fornecerem bases a programas de melhoramento genético e proporcionarem um melhor entendimento sobre aspectos taxonômicos, biosistemáticos e evolutivos da espécie.

1.1 JUSTIFICATIVA

O Brasil possui rica diversidade vegetal, no entanto, várias espécies frutíferas que continuam subutilizadas e em muitos casos praticamente desconhecidas, apesar de apresentarem potencial agrônomo (DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007).

De acordo com Sarmiento e Silva (2012) informações sobre o modo de reprodução e nível de ploidia de espécies nativas de Mirtáceas são escassas, sendo as pesquisas direcionadas, em grande parte, à goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*), araçazeiro (*Psidium cattleianum*) e pitangueira (*Eugenia uniflora*), devido ao maior potencial agrônomo e comercial.

Além disso, informações sobre a morfologia polínica têm sido empregadas como ferramentas auxiliares em estudos filogenéticos, a fim de colaborar na melhor delimitação dos táxons. Acrescido a este estudo, a determinação do número cromossômico tende a auxiliar em estudos evolutivos e compreensão da distribuição geográfica.

O entendimento da morfologia dos grãos de pólen é relevante para o estudo genético das plantas, uma vez que o mesmo possibilita a compreensão do seu comportamento reprodutivo. Tais dados podem ser empregados em estratégias de conservação e programas de melhoramento, auxiliando também na distinção das espécies por meio de análises morfológicas e de viabilidade (KARSBURG; BATTISTIN, 2005).

Estudos mais detalhados com mirtáceas brasileiras foram realizados com mais ênfase a partir da década de 1980, porém, depois destes relatos não houve significativo avanço das pesquisas com estes materiais, sendo as pesquisas concentradas regionalmente. As últimas informações divulgadas sobre estudos taxonômicos deste grupo têm evidenciado a necessidade de estudar as relações ainda insatisfatoriamente delimitadas entre os gêneros.

Além disso, a variabilidade genética presente no gênero *Eugenia* ainda é pouco estudada e há o registro de citótipos para espécies deste gênero (COSTA, 2004), o que reforça a necessidade de realização de análises citogenéticas e palinológicas.

Considerando a espécie *Eugenia involucrata*, poucos estudos foram realizados nesse sentido. Há relatos somente sobre o número cromossômico e análises reprodutivas, avaliação do índice meiótico e palinologia, nos quais os autores ressaltam que outros trabalhos devem ser realizados, a fim de reconhecer a variabilidade genética da espécie, preferencialmente nas diferentes populações encontradas em regiões distintas (COSTA, 2004; TAKEDA *et al.*, 2012; JUNIOR *et al.* 2006).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo citogenético com a espécie *Eugenia involucrata*, com enfoque na determinação do comportamento meiótico e na análise do grão de pólen.

1.2.2 Objetivos Específicos

Determinar o número cromossômico e o nível de ploidia;

Analisar o comportamento meiótico;

Analisar a viabilidade dos grãos de pólen por meio de testes colorimétricos;

Caracterizar a morfologia dos grãos de pólen.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A família Myrtaceae apresenta cerca de 140 gêneros, dos quais o gênero *Eugenia* possui espécies de valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento para obtenção de fármacos (CAMLOFSKI, 2008).

A cerejeira-do-mato (*E. involucrata* DC), também conhecida como cerejeira, cerejeira-da-terra, cerejeira-do-rio-grande, cereja-preta, ibaiba e ivaí, é nativa do Sul do Brasil, e ocorre desde o Rio de Janeiro e sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (DEGENHARDT *et al.*, 2007). Constitui uma espécie comum na Floresta Estacional Semidecidual do Planalto e do Alto Uruguai, e na Floresta Ombrófila Densa, sendo também identificados exemplares nas encostas da Serra Geral, Serra do Sudeste, além de formações florestais na Argentina, Paraguai e Uruguai.

A árvore tem de 10 a 15 metros (Figura 1), de tronco retilíneo com casca de coloração variando de acordo com a idade, apresentando tonalidades esverdeadas até o castanho-acinzentado. A copa é longa, estreita e de ramificação ascendente, possui densa folhagem verde-escura-brilhante perenifólia ou semidecídua. As folhas são opostas e simples, e as flores são formadas por quatro pétalas brancas, de 2 a 3 cm de diâmetro. Os frutos consistem em uma drupa oblonga (Figura 2), carnosa, lisos, coroado por sépalas foliáceas persistentes, medem aproximadamente 2,5cm de comprimento e 2,0cm de diâmetro, sendo que cada fruto pode ter até quatro sementes. Quando maduros, os frutos possuem coloração negro-vinácea.



Figura 1. Árvore de *Eugenia involucrata* DC (Cerejeira-do-mato). (Fonte: http://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=3.437)



Figura 2. Inflorescência e frutos de *Eugenia involucrata* DC em diferentes estádios de maturação (Fonte: http://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=3.437).

As plantas, autógamas, florescem entre setembro e outubro, e frutificam entre outubro e novembro. A propagação desta espécie é realizada geralmente via sementes, podendo ser realizada também pela técnica de estaquia. É uma planta melífera, e sua madeira pode ser utilizada para fabricação de ferramentas rurais e ripas (DEGENHARDT; FRANZON; COSTA, 2007).

A espécie possui elevado potencial econômico em função do uso como ornamental e devido a suas propriedades organolépticas e a possibilidade de extração de óleos essenciais que pode ser alvo de estudos por pesquisadores e fonte de diversificação de renda para agricultores familiares, aproveitando o nicho de mercado ávido por novos alimentos funcionais.

Outro potencial de uso de cerejeira-do-mato surge na possibilidade de seu incremento em policultivos. Esta espécie apresenta flores melíferas e intensamente perfumadas, sendo, portanto, atrativa para diferentes polinizadores, dentre os quais destaca-se as abelhas da espécie *Apis melífera*. As flores possuem na sua base nectários de onde as abelhas extraem o néctar, razão pela qual esta espécie é considerada importante como fonte de matéria prima para as abelhas e recomposição de florestas, principalmente nos sistemas agroflorestais (REGO, 2006).

Para garantir o seu uso posterior, torna-se relevante elencar estratégias de uso e conservação de recursos genéticos nativos a fim de assegurar a existência da espécie e evitar a perda de diversidade, decorrentes geralmente da pressão antrópica e expansão da agricultura. Embora o Brasil detenha grande diversidade biológica, dentre as quais as mirtáceas se destacam, ainda são escassas as pesquisas sobre o modo de reprodução, nível de ploidia e comportamento meiótico da espécie. Tais dados podem contribuir para a seleção de genótipos para fins de conservação em Bancos de Germoplasma ou ainda viabilizar mecanismos de utilização destes recursos genéticos em futuros programas de melhoramento.

Nesse sentido, ressalta-se a importância da realização de estudos em áreas antropizadas, e principalmente com espécies nativas, a fim de assegurar a diversidade vegetal da região. Segundo Martinez (1976 apud SILVEIRA *et al.*, 2006) estudos têm sido realizados para a família Myrtaceae, no sentido de, esclarecer dúvidas sobre o status taxonômico de diversas espécies. Desse modo, os estudos

cariotípicos são de grande importância, pois permitem estabelecer alto grau de confiança nos fundamentos citológicos e genéticos da planta (SILVEIRA *et al.*, 2006).

2.2 ASPECTOS CITOTAXONÔMICOS DA FAMÍLIA MYRTACEAE E DO GÊNERO *EUGENIA*

Myrtaceae é uma família bastante complexa e o seu estudo é dificultado pela forte correlação filogenética entre seus táxons, pela interpretação morfológica dos caracteres e pelas correlações freqüentemente pouco representativas de sua grande variabilidade e distribuição (McVAUGH, 1956).

Farias Junior (2014) ressalta que desde a publicação da “*Flora Brasiliensis*” feita por Berg, entre os anos de 1857 e 1859, nenhum outro estudo contemplou de forma expressiva as mirtáceas brasileiras, no sentido de procurar melhorar a delimitação das espécies brasileiras da família Myrtaceae ou do gênero *Eugenia*.

Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas no Brasil, concentrada em uma única tribo, Myrteae e três subtribos Myrciinae, Eugeniinae e Myrtinae (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014).

Segundo Caliar (2013), a estimativa da diversidade específica em Myrtaceae é controversa e valores giram em torno de 3.800 a 5.800 espécies, organizadas em aproximadamente 140 gêneros. Considera-se que esta família esteja posicionada na ordem Myrtales, e que, embora possua ampla distribuição, esta se encontra mais freqüentemente distribuída em zonas tropicais e subtropicais do globo.

De acordo com o mesmo autor a circunscrição da família tem sofrido alterações, desde 1828, quando as entidades intrafamiliares foram classificadas com base na consistência dos frutos, dividindo a família em cinco tribos. No entanto, atualmente, dentre as cinco tribos originalmente reconhecidas, somente três constituem o grupo considerando-se circunscrição atual, são eles: Myrteae (com frutos carnosos), Leptospermeae (com frutos capsulares) e Chamelaucieae (com frutos indeiscentes). No entanto, análises filogenéticas realizadas mais

recentemente, por Wilson *et al.* (2005), por exemplo, evidenciam que a divisão em três grupos, de acordo com a consistência dos frutos, deveria ser abandonada.

A circunscrição de Myrtaceae, incluindo *Psiloxylon* e *Heteropyxis*, apresenta maior suporte filogenético, abrangendo duas subfamílias: Myrtoideae, composta por Myrtaceae e *Psiloxylloideae*, composta por *Psiloxylon* e *Heteropyxis* (WILSON *et al.*, 2005; CALIARI, 2013). Entretanto, há uma considerável discordância entre os autores quanto à circunscrição de gêneros e espécies, principalmente nos trópicos, o que tem impulsionado estudos filogenéticos recentes.

A partir de estudos moleculares e de informações morfológicas identificadas por Wilson *et al.* (2005) admite-se que os grupos infra-familiares de Myrtaceae precisam ser redefinidos, uma vez que certas características classicamente utilizadas em sua delimitação se mostram inconsistentes, como por exemplo a ocorrência de frutos carnosos, que são considerados típicos da subfamília Myrtoideae. De acordo com Silva (2009), acredita-se que possivelmente essa característica tenha surgido independentemente em pelo menos três ocasiões distintas na história evolutiva da família, não sendo, portanto, um bom caráter taxonômico. Tais dados evidenciam a importância de estudos citotaxonômicos.

Lucas *et al.* (2007) confirmaram o que havia sido evidenciado por Wilson *et al.* (2005), ou seja, que os três grupos em que os gêneros americanos de Myrtaceae eram divididos não são monofiléticos, pois a morfologia do embrião eugenióide teria evoluído independentemente em dois momentos diferentes, no “grupo *Plinia*” e no “grupo *Eugenia*”.

Outros autores consideram todas as espécies americanas, com a exceção do gênero monotípico chileno *Tepualia*, estão incluídas em Myrteae, que abriga aproximadamente 49 gêneros e cerca de 2500 espécies segregadas em sete grupos informais e mais três táxons isolados (LUCAS *et al.*, 2007). Vale acrescentar que, tais grupos são posicionados desta maneira, devido a quatro caracteres, são eles: morfologia do embrião, número de óvulos no ovário, placentação e anatomia dos vasos. Ainda segundo o referido autor, no Brasil ocorrem dois dos três táxons isolados e seis dos sete grupos informais.

Esses mesmos autores reconheceram, a partir de um estudo filogenético realizado com a tribo Myrteae, sete grupos, sendo um grupo australiano-asiático e outros seis grupos sulamericanos, são eles: grupo “Plinia”, grupo “Myrcia”, grupo “Myrceugenia”, grupo “Myrteola”, grupo “Pimenta”, grupo “Eugenia”.

Lima (2011) relata que após estudos moleculares realizados por Wilson *et al.* (2005), a família foi reorganizada, pois os dados demonstraram o não monofiletismo das subfamílias. Desde então, Myrtaceae tem sido dividida nas subfamílias Psiloxylodeae, caracterizada principalmente pelas flores unissexuadas e número cromossômico básico $n=12$, e Myrtoideae, com flores unissexuadas e número cromossômico $n=11$. A primeira inclui dois gêneros ocorrentes na África (*Psiloxylon* Thouars ex Tul. e *Heteropyxis* Harv.), enquanto que a segunda é representada por todas as outras Myrtaceae conhecidas.

No Brasil, Myrtaceae está representada apenas pela subfamília Myrtoideae, dentro da tribo Myrteae, com ampla distribuição, sendo que mais de 700 espécies são exclusivamente brasileiras (SOBRAL *et al.* 2015).

Landrum e Kawasaki (1997, apud ROMAGNOLO e SOUZA, 2006) relatam que a família Myrtaceae abrange 23 gêneros. McVaugh (1968) estima que em torno de um terço destas espécies pertencem ao gênero *Eugenia*, que tem ampla distribuição, havendo registros de ocorrência desde o México até a Argentina.

Dentre os gêneros de Myrtaceae, o gênero *Eugenia* destaca-se como sendo o maior, sendo composto por aproximadamente 1038 espécies. Baseando-se em análises de filogenia molecular, atualmente o gênero pode ser subdividido em oito seções, e possivelmente este deve ser originário do oeste ou sudeste da América do Sul, tendo migrado desde as regiões andinas para o norte ou nordeste da América do Sul e com ocorrência desde o México e Caribe até o norte da Argentina, África e Sudeste da Ásia (FARIA JUNIOR, 2014).

A respeito da espécie interesse para este trabalho e evidenciando-se, mais uma vez, a problemática a respeito do conhecimento e delimitação das espécies desta família, acrescenta-se que a espécie *E. involucrata* foi denominada erroneamente de *E. aggregata*. (SHARPE; SHERMAN; BENDER, 1996; LORENZI *et al.*, 2006). Admite-se que a referida espécie esteja incluída na família Myrtaceae,

Subfamília Myrtoideae, Tribo Myrteae, Subtribo Eugeniinae, Gênero *Eugenia* (SOBRAL *et al.*, 2015).

São reconhecidas onze sinonímias para *E. involucrata* DC os seguintes nomes científicos: *E. aggregata* (Vell.) Kiaersk..., *E. bracteata* Vell., *E. calystegia* (O.Berg) Nied..., *E. laevigata* (O.Berg) D.Legrand., *E. minutifolia* (Mattos & D.Legrand) Mattos, *E. pallescens* Kiaersk..., *Myrtus aggregata* Vell., *Phyllocalyx cerasiflorus* O.Berg., *Phyllocalyx involucratus* (DC.) O.Berg., *Phyllocalyx laevigatus* O.Berg., *Stenocalyx involucratus* (DC.) Kausel.

Avaliações da morfologia e número cromossômico e a identificação de variações cromossômicas de um táxon associadas a outros caracteres citológicos permitem reconhecer o número básico do grupo, auxiliando no entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução de um grupo, como também na delimitação taxonômica de espécies (YOSHIMOME; SOUZA; KARSBURG, 2008).

Em um estudo realizado por Costa (2004) com diversas espécies de mirtáceas brasileiras, coletadas em diferentes formações vegetacionais da região sudeste do Brasil, confirmou-se o número básico descrito para a família de $x = 11$. No entanto, no mesmo estudo, para as espécies representativas do gênero *Eugenia*, variações intra-específicas no nível de ploidia também foram observadas, por meio do relato de citótipos. Neste mesmo trabalho, o referido autor determinou o mesmo número para indivíduos de *E. bracteata* Vell. (sinonímia de *E. involucrata* DC).

De acordo com esse autor, a alta frequência de citótipos diferenciados pelo nível de ploidia permite supor que nas demais espécies em que se constatou poliploidia e para as demais diplóides, também possam existir citótipos.

Costa (2004) sugere que a diferenciação de raças cromossômicas ou citótipos pode ser entendida como uma etapa intermediária e relevante que favorece o processo de especiação, tendo em vista que pode ocasionar o isolamento genético pela possibilidade de fornecer uma barreira ao fluxo gênico, atuando na diferenciação dos mesmos.

A meiose é um tipo de divisão celular específica que ocorre em organismos eucariotos na qual uma célula-mãe se divide e origina quatro células-filhas com metade do número cromossômico. Esse é considerado um processo essencial para os organismos de reprodução sexuada, responsável por ampliar a variabilidade genética. Assim, para aumentar a eficiência da reprodução das culturas, a

compreensão do mecanismo pelo qual a variação é ampliada e transmitida é de grande relevância (HARRISON *et al.*, 2010).

Para avaliar aspectos reprodutivos das plantas sob o ponto de vista meiótico podem ser realizados diferentes tipos de análises:

a) Avaliação do comportamento meiótico - refere-se à análise do comportamento dos cromossomos durante a primeira e segunda divisões da meiose. Aspectos como o pareamento cromossômico e o número de bivalentes na prófase I, o alinhamento no plano equatorial dos pares de homólogos na metáfase I, a disjunção cromossômica na anáfase I e anáfase II podem ser analisados. Dados dessa natureza para *E. involucrata* são inexistentes na literatura e limitam-se somente à determinação do número cromossômico, como a descrição realizada por Costa (2004).

b) Observação do índice meiótico - refere-se a uma análise rápida e precisa a respeito do desempenho reprodutivo de um ou mais indivíduos de uma espécie em relação ao processo de formação de tétrades e conseqüentemente, dos grãos de pólen. Trabalhos dessa natureza foram realizados por Franzon e Raseira (2004) no qual foi avaliado o índice meiótico de algumas espécies representantes de Myrtaceae nativas da região Sul, tais como *Acca sellowiana* (goiabeira serrana), *E. pyiformis* (uvaia), *E. uniflora* (pitanga), *Campomanesia xanthocarpa* (gurabiroba) e *E. involucrata* (cerejeira-do-mato). Dentre as referidas espécies, a goiabeira-serrana apresentou elevada estabilidade citológica, enquanto que as demais apresentam estabilidade razoável. Foi relatado também nesse estudo que a anormalidade mais comum foi a ocorrência de tríades.

c) Avaliação da viabilidade polínica - refere-se à avaliação do percentual de grãos de pólen viáveis e inviáveis ao final da meiose. Tais análises podem ser realizadas por meio de métodos colorimétricos ou por meio da análise da germinação dos grãos de pólen em meio de cultura. Considerando os métodos colorimétricos, diferentes corantes celulares podem ser utilizados para esse fim. O corante carmim acético 2%, por exemplo, reage corando em tons avermelhados os grãos de pólen viáveis, em seus diferentes estágios de maturação. Grãos de pólen incolores são considerados inviáveis (STANLEY; LINSKENS, 1974).

Outra técnica que pode ser empregada é a coloração com a solução de Alexander. Esta é composta por dois corantes: o verde malaquita e a fucsina ácida. O primeiro reage com a parede celular corando-a de verde, e a fucsina ácida ao reagir com o protoplasma do grão de pólen adquire coloração violeta. Grãos corados somente de verde são considerados inviáveis e os grãos corados de azul-vináceo são considerados viáveis. Esse corante diferencia os grãos de pólen maduros daqueles que foram abortados no início do desenvolvimento e desse modo não apresentam protoplasma (ALEXANDER, 1969; HOFFMAN; VERASSIM, 2011). Não há relatos na literatura sobre o emprego desses corantes para a determinação da viabilidade polínica para *E. involucrata*.

Assim, informações referentes ao comportamento e índice meióticos e viabilidade polínica são imprescindíveis para um melhor conhecimento dos aspectos reprodutivos de uma espécie, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de programas de melhoramento, conservação de germoplasmas e possibilitando o entendimento dos aspectos evolutivos e sistemáticos. Como tais dados são praticamente inexistentes para *E. involucrata*, essas análises são essenciais.

2.3 PALINOLOGIA DA FAMÍLIA MYRTACEAE E DO GÊNERO *EUGENIA*

A Palinologia é a ciência que estuda os grãos de pólen e os esporos das samambaias e licófitas. Essa pode ser aplicada à taxonomia porque os grãos de pólen e esporos conservam características de sua camada externa (exina), devido à presença de um polímero muito estável quimicamente, chamado de esporopolenina. Detalhes estruturais e esculturais da exina, assim como os padrões de aberturas, são muito conservados e geralmente mantidos numa mesma linha evolutiva, auxiliando na caracterização e distinção taxonômica (STANSKI, 2014).

De acordo com Thornhill (2010), pólenes de mirtáceas são geralmente caracterizados como sincolpados (quando, sob visão polar, suas aberturas alongadas se unem nos pólos, pelas suas extremidades sem a ocorrência de espaço entre elas - Figura 3a) ou parassincolpados (quando, sob visão polar, suas aberturas alongadas se ramificam antes de se unirem, deixando uma área entre elas - Figura 3b).

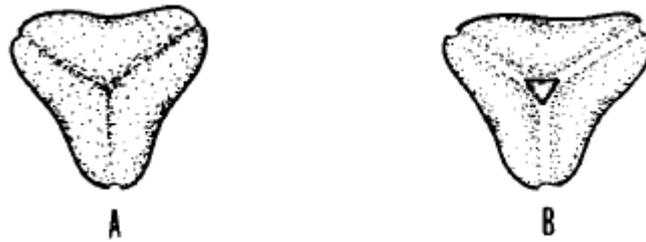


Figura 3. Visão polar de grãos de pólen indicando a união das aberturas do tipo sincolpado (A) e parassincolpado (B). Fonte: Mauro Ramalho (www.webbee.org.br/pesquisa/palinologia.pdf)

Relatos sobre a morfologia polínica de espécies do gênero *Eugenia* foram realizados por STANSKI (2014). Em seu trabalho foram avaliados grãos de pólen de espécies da subtribo Eugeniinae (*E. arenosa* Mattos; *E. handroana* D. Legrand.; *E. hiemalis* Cambess.; *E. pitanga* (O. Berg) Nied.; *E. puniceifolia* (Kunth) DC. e *E. uniflora* L. provenientes de diferentes regiões do Estado do Paraná. De acordo com a autora, o gênero *Eugenia* pode ser considerado euripolínico onde a morfologia dos grãos de pólen, na maioria das vezes, caracteriza gêneros e famílias. Além disso, os grãos de pólen das espécies estudadas foram caracterizados como mônades, isopolares; de simetria radial; com âmbito triangular, quadrangular ou raramente pentagonal; de tamanho pequeno (raramente médio); com forma oblata-esferoidal, suboblata, prolata esferoidal ou subprolata; 3-4-(5)-colporados ou irregularmente parassincolporados; a ornamentação da exina se mostrou areolada, psilada a escabrada, granulada ou rugulada.

Para *E. involucrata* DC há relatos de que os grãos de pólen são peroblatos ($< 0,50 \mu\text{m}$) com $P/E = 0,38$ (TAKEDA, 2002). Entretanto, JUNIOR *et al.* (2006) classificaram os grãos de pólen dessa espécie como mônades, pequenos, psilados, prolatos, sincolpados e de âmbito triangular. Considerando que variações palinológicas são frequentemente observadas em espécies que possuem variações cromossômicas intra-específicas (COOPER *et al.*, 2000; CUADRADO, 2003; SOUSA *et al.*, 2013) mais estudos dessa natureza são relevantes para essa espécie, já que a presença de citótipos para espécies desse gênero já foi relatada.

Grãos de pólen maduros, além de serem importantes para a reprodução, atuam também como sítios de armazenamento de substâncias de reserva como carboidratos, lipídeos e proteínas os quais são essenciais, dentre outras funções, para a iniciação do crescimento do tubo polínico durante sua germinação (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2003). A quantidade e a natureza do armazenamento dessas substâncias pode diferir entre diferentes espécies de plantas (ELISEU; DINIZ, 2008). Tais estudos são úteis para o entendimento do desenvolvimento dos grãos de pólen, bem como dos fatores que podem influenciar na sua viabilidade. Análises citoquímicas dos grãos de pólen de espécies do gênero *Eugenia*, incluindo a espécie em questão, são inexistentes na literatura.

2.4 CITOGENÉTICA

Vale a pena ressaltar que do ponto de vista citogenético, são escassas as informações a respeito da biodiversidade nativa tropical. De acordo com Singh (1993), avaliações citológicas podem trazer importantes contribuições no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e em trabalhos de melhoramento de plantas.

Dentre estas avaliações, pode-se citar a citogenética, a qual compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação quanto sua variação e evolução, consistindo desta maneira em uma ferramenta relevante no que refere-se à complementação de informações obtidas por meio dos métodos morfológicos e moleculares para o estudo da sistemática e evolução das plantas (GUERRA, 2008).

Desde o início do século XX, a citogenética vem sendo amplamente utilizada em trabalhos que envolvem caracterização taxonômica e estudos de evolução e filogenia. O destaque principal é a citotaxonomia clássica que se caracteriza pela observação do número e da morfologia dos cromossomos mitóticos e de seu comportamento meiótico.

A análise do comportamento meiótico esclarece possíveis erros apresentados durante as fases da meiose I e II. Esses erros meióticos causam

anormalidades, que, por sua vez, acarretam em disfunções na formação e viabilidade do grão de pólen, que podem esclarecer sobre a qualidade de propagação da espécie e conservação na região de estudo (GODOY; PEREIRA; SANTOS, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL VEGETAL

Amostras de inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas de quatro indivíduos presentes em uma propriedade situada no município de Campo Erê, no Estado de Santa Catarina, Brasil. Estas foram fixadas em Carnoy (solução de etanol: ácido acético na proporção de 3:1).

Posteriormente, os materiais foram levados ao laboratório de Biologia Celular, da Universidade Federal de Santa Catarina, no Campus de Curitibanos, para a realização das análises citogenéticas e palinológicas previstas na metodologia de estudo.

3.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

3.2.1. Análise Meiótica e determinação do nível de ploidia

Para a obtenção de células meióticas, anteras fixadas em diferentes estágios de desenvolvimento foram maceradas em solução enzimática e, em seguida, submetidas à técnica de suspensão celular adaptada a flores de tamanho reduzido (VICCINI *et al.*, 2006).

Primeiramente, com o auxílio de estiletes adaptados, botões florais foram abertos, a fim de separar as anteras. Essas foram colocadas em um microtubo de 0,3mL adaptado com uma tela de poliéster (malha de 60 μ m) contendo água destilada. As anteras foram lavadas para a retirada do excesso de fixador e posteriormente foi adicionada a solução enzimática Pectinase: celulase (2: 20). As amostras foram acondicionadas em banho-maria por 4 horas e 30 minutos a 37^oC. Após a maceração enzimática, retirou-se o excesso da enzima e foi realizada outra lavagem em água destilada. O microtubo adaptado foi colocado em outro microtubo (0,5mL) contendo água destilada. As anteras maceradas foram então fragmentadas mecanicamente com o auxílio de um estilete adaptado para a liberação dos meiócitos. A suspensão celular restante foi centrifugada duas vezes a 3000 rpm. Após a primeira centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionou-se água destilada, enquanto que posteriormente a segunda centrifugação descartou-se o sobrenadante e adicionou-se o fixador (etanol: ácido acético 3:1). As amostras foram armazenadas em freezer até o preparo das lâminas. Diversas suspensões celulares foram realizadas para a obtenção de meiócitos em diferentes fases da meiose.

Para o preparo de lâminas, a suspensão celular foi ressuspensa com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro a fim de homogeneizar a solução. Foram adicionadas de 3 a 5 gotas da suspensão/lâmina e as mesmas foram secas ao ar e em placa aquecedora. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido acético 45% gelado por 10 segundos. Após secar as lâminas ao ar e em placa aquecedora, as mesmas foram coradas em solução de Giemsa 5% por quatro minutos. Posteriormente, para as análises de rotina, as lâminas foram observadas sob microscópio de luz de campo claro Olympus CX2.

A fim de analisar o processo meiótico, todas as células encontradas em diferentes fases da divisão meiótica consistiram em objeto de análise. O nível de

ploidia foi verificado pela contagem de cromossomos bivalentes presentes na diacinese (prófase I).

O índice meiótico (IM) foi estimado de acordo com a seguinte fórmula proposta por LOVE (1949):

$$\left(\frac{\text{Número de tétrades normais}}{\text{Número de tétrades analisadas}} \right) \times 100$$

Na análise, tétrades com quatro células de tamanho igual foram consideradas normais, e qualquer desvio como anormal. Foram analisadas aproximadamente 1480 células.

As melhores imagens foram digitalizadas em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmara digital Olympus DP73.

3.2 PALINOLOGIA

3.2.1 Viabilidade Polínica

Para o estudo da viabilidade polínica, os grãos de pólen foram corados com as soluções de carmim acético 2% (KEARNS; INOUE, 1993) e Solução de Alexander (ALEXANDER, 1980).

Anteras oriundas de botões florais previamente fixados em etanol: ácido acético (3:1) foram fragmentadas sobre as lâminas a fim de dispersar os grãos de pólen. Em seguida, estes foram corados com os referidos corantes e cobertos por lamínulas. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz de campo claro Olympus CX2.

Tendo por objetivo a obtenção de uma amostragem a mais fidedigna possível dos grãos de pólen corados, lançou-se mão do método de varredura, a fim de se alcançar o número total de 300 grãos de pólen por lâmina. Após a contagem, o percentual de coloração dos grãos de pólen foi calculado. Os dados obtidos, por sua vez, foram empregados a fim de determinar o percentual de viabilidade polínica.

Para lâminas coradas com carmim acético, foram considerados viáveis, os grãos de pólen corados em vermelho, ao passo que os grãos incolores foram considerados inviáveis. Já em lâminas coradas com a Solução de Alexander, grãos com coloração arroxeadada foram considerados viáveis e os de coloração esverdeada, inviáveis.

As melhores imagens foram digitalizadas em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

3.2.2 Citoquímica

Para análise citoquímica, foram realizados testes colorimétricos com Lugol e Sudan IV que objetivam descobrir quais substâncias de reserva os grãos de pólen possuem. O corante Lugol tem afinidade pelo amido, tornando os grãos com coloração marrom, enquanto que o Sudan IV tem afinidade por lipídios, tornando os grãos de pólen com coloração avermelhada.

Primeiramente, selecionaram-se as anteras com coloração amarelo intensa para obtenção de grãos de pólen maduros. Estas foram fragmentadas sobre lâminas sob estereomicroscópio Leica EZ. Após a retirada dos grãos de pólen foi adicionada uma gota de corante e o material foi coberto com lamínula 20x20. As lamínulas foram seladas com esmalte incolor. Após aproximadamente 10 minutos, as mesmas foram analisadas sob microscópio de luz de campo claro Olympus CX2. Foram analisadas 5 lâminas/ corante e 5 campos/ lâmina.

As melhores imagens foram digitalizadas em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

3.2.3 Morfologia

Para a análise da morfologia polínica os grãos de pólen foram acetolisados de acordo com o protocolo convencional descrito por Erdtman (1960).

Para a obtenção dos grãos de pólen, anteras extraídas das inflorescências previamente fixadas em ácido acético P. A. foram separadas sob estereoscópio Leica EZ. O conteúdo foi macerado com o auxílio de um alfinete adaptado a fim de liberar os grãos de pólen. Na sequência, os grãos de pólen foram submetidos a diversas etapas de centrifugação, que tiveram a duração de 10 minutos, em velocidade de 2500 rpm.

No decorrer das referidas etapas de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados, respectivamente: 1) Água destilada; 2) Solução acetolítica contendo anidrido acético: ácido sulfúrico (9:1). Nessa etapa, os microtubos foram submetidos à temperatura de 85°C por 2 minutos em banho-maria; 3) Água destilada com duas gotas de álcool etílico; 4) Água destilada; 5) Água glicerinada (solução contendo água destilada: glicerina 1:1). Após a última centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o pellet contendo grãos de pólen, foi utilizado para a montagem das lâminas.

Para a montagem das lâminas, fragmentos cúbicos de gelatina glicerinada foram colocados em contato com o pellet de grãos de pólen. Estes fragmentos contendo amostras de grãos de pólen foram depositados sobre as lâminas. Após

cobrir com lamínula, as mesmas foram colocadas em placa aquecedora a 110°C por aproximadamente 10 segundos, a fim de garantir a fusão da gelatina. Foi utilizado um fragmento por lâmina. Após a fusão da gelatina glicerinada, as lamínulas foram seladas com esmalte. As análises de rotina foram realizadas uma semana após a montagem das lâminas em microscópio de luz de campo claro Olympus CX2.

As imagens foram digitalizadas em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73 e a mensuração dos grãos de pólen foi realizada através do software Olympus CellSens. Os eixos polar (P) e equatorial (E) foram medidos a partir de 25 grãos de pólen maduros. Valores de P/E foram calculados para cada grão de pólen medido.

As terminologias e as classificações do tamanho e formato dos grãos de pólen, da morfologia da superfície polínica na visão equatorial e do número de aberturas foram adotados de acordo com as definições de Erdtman (1952), citado por Willard *et al.*, (2004) e de Punt *et al.*, (1994). Medidas da espessura da exina também foram realizadas para 10 grãos de pólen.

Para análise mais detalhada da ornamentação da exina foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. Para uma visualização detalhada da escultura da parede dos grãos de pólen, anteras provenientes de botões florais fixadas em etanol: ácido acético (3:1) foram transferidas para microtubos contendo álcool etílico P.A.

Para o preparo das amostras, uma gota de álcool etílico contendo as anteras foi depositada sobre stubs ou suportes metálicos contendo uma fita de carbono. Sob microscópio estereoscópio Leica EZ, cada antera foi seccionada longitudinalmente, com o auxílio de agulhas histológicas, para a liberação dos grãos de pólen. Foi adicionada, sobre os grãos de pólen uma gota de HDMS (Hexamethyldisilazane) para auxiliar na desidratação dos mesmos. Posteriormente, foram colocados para secar no dessecador. Após a secagem os suportes foram levados ao Sputtering (SCD050) para a metalização com ouro. As imagens digitalizadas foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

4.1.1 Comportamento meiótico e determinação do nível de ploidia

A meiose é um evento de alta estabilidade evolutiva que culmina na redução do número cromossômico. Uma meiose com curso normal e harmonioso assegura a viabilidade dos gametas (PAGLIARINI, 2002). Além disso, os eventos citológicos da gametogênese são controlados geneticamente (PIERRE, 2004).

As imagens que consistiram em objeto de análise para realização deste estudo evidenciam que o comportamento meiótico dos indivíduos de *E. involucrata* analisados é regular, devido à inexistência de irregularidades meióticas.

As figuras 4 a 7 mostram algumas fases da meiose observadas em *E. involucrata* onde foi possível observar células desde a prófase I até a formação de micrósporos e grãos de pólen

Para entrar na meiose, a célula-mãe do grão de pólen inicia o período denominado de intérfase, que é caracterizado por ser um período de preparação para a divisão celular. Considera-se este um período de longa duração, tendo em vista, que é compreendido por três subfases: G1, S e G2, que, no geral, podem ser caracterizadas pela intensa atividade metabólica, aumento do volume celular e elevada síntese de constituintes celulares.

Neste período, é possível identificar citologicamente os cromocentros e nucléolo; não sendo possível identificar os cromossomos individualmente, pois nesse período é encontrada a cromatina. É relevante destacar que, na fase “S” da intérfase ocorre a replicação do DNA, processo de extrema importância para a divisão celular subsequente.

Na figura 4A é possível visualizar o primeiro estágio da prófase I, denominado leptóteno. Neste momento, os cromossomos tornam-se visíveis como finos filamentos longos devido ao processo de condensação da cromatina. Após o leptóteno, a célula entra em zigóteno (Figura 4B), etapa no qual se inicia o pareamento dos cromossomos homólogos. É possível reconhecer esta fase devido à formação de uma estrutura conhecida como “bouquet”, na qual cromossomos se

arranjam próximo ao envoltório nuclear e suas extremidades se estendem radialmente.

Após essa etapa, os cromossomos alongados pareiam-se completamente, caracterizando o paquíteno (Figura 4C). Nessa fase, os cromossomos são mais espessos e estão em sinapse. Os nucléolos são, em geral, pronunciados. Além do pareamento cromossômico, ocorre nessa fase o *crossing over*, ou permuta genética, na qual os homólogos trocam partes entre si.

Após o paquíteno, a célula passa pelo diplóteno (Figura 4D). Nesta etapa da prófase I, é possível observar a terminalização do *crossing over*. Neste momento, o pareamento entre os homólogos torna-se menos intenso, e à medida que estes se separaram, há o surgimento, entre as cromátides não-irmãs, de uma estrutura denominada quiasma. Vale acrescentar que, geralmente, cada par de cromossomos apresenta uma ou mais desta estrutura em formato de cruz (quiasma). Ao final da prófase I ocorre a diacinese (Figura 5A).

Nesse período, ocorre uma maior condensação cromossômica, sendo possível observar a presença dos pares de cromossomos homólogos ou bivalentes. Essa fase é utilizada para a determinação do número cromossômico e do nível de ploidia. Para *E. involucrata* foi possível observar nessa fase o nucléolo, com dois pares de cromossomos associados e a presença de 9 bivalentes, que, conseqüentemente, possibilitou determinar um número cromossômico de $2n=2x=18$ cromossomos, com $x=n=9$ cromossomos. Tendo em vista que, para a família admite-se um número básico $x = 11$, (ATCHINSON, 1947; RAVEN, 1975; FORNI-MARTINS e MARTINS, 2000; COSTA, 2004) a presente análise sugere o reconhecimento de um citótipo (ou raça cromossômica) para a espécie.

De acordo com Rye (1979) apud SILVEIRA *et al.* (2006) geralmente a família Myrtaceae apresenta pequena variação no número cromossômico, observando-se $x=11$ na maioria dos gêneros pertencentes às diferentes subfamílias e tribos. Além disso, a disploidia que corresponde ao aumento ou redução do número cromossômico sem ocorrência de alterações quantitativas ou qualitativas no material hereditário devido a rearranjos cromossômicos (GUERRA, 1988) já foi relatada para algumas espécies do gênero *Eugenia* (MOUSSEL, 1965 apud MOORE, 1977).

Nesse caso, há relatos de $x=12$ cromossomos e $2n=24, 32, 42, 45, 46$ e 54 cromossomos.

Estas informações reforçam os resultados obtidos no presente estudo, já que foi encontrado um citótipo com $n=x=9$ cromossomos. A diferenciação de raças cromossômicas ou citótipos pode ser entendida como uma etapa intermediária e importante, pois leva ao isolamento genético, fornecendo uma barreira ao fluxo gênico, atuando na diferenciação e favorecendo o processo de especiação (STACE, 1991; BRIGGS; WALTERS, 1997 apud SILVEIRA *et al.*, 2006). As variações intra-específicas relatadas para o gênero *Eugenia* podem ter influência de fatores ambientais e de alterações genéticas. As aneuploidias são geradas a partir de mecanismos tais como as fissões e fusões cêntricas que alteram o número cromossômico, mas não alteram a quantidade de DNA.

A figura 5B representa a metáfase I. Neste estágio, o envoltório nuclear e os nucléolos já não são mais observados, e os cromossomos atingem o grau máximo de condensação. Cada par de homólogos alinha-se no plano equatorial.

Após essa etapa, a célula passa para a anáfase I (Figura 5C) na qual ocorre a separação dos cromossomos homólogos. Em seguida, na telófase I (Figura 5D). Os cromossomos localizados nos pólos opostos da célula se descondensam gradualmente, há a reorganização do nucléolo e a reconstituição do envoltório nuclear, o que permite a observação de dois núcleos-filhos que possuem metade do número cromossômico (n) da célula-mãe. Vale ressaltar que, geralmente, após a telófase I, há uma etapa do ciclo celular similar a intérfase, chamada de intercinese, na qual não ocorre a síntese de DNA e o estado genético dos cromossomos não é alterado.

Na figura 6A observa-se a metáfase II, período no qual os cromossomos atingem o grau máximo de condensação e se alinham no plano equatorial. Posteriormente, a célula prossegue para a anáfase II onde ocorre a separação das cromátides-irmãs (Figura 6B), culminando na telófase II (Figura 6C). Em plantas, a telófase II também é chamada de tétrade onde são observadas as quatro células-filhas provenientes da divisão meiótica. Cada célula-filha, ou micrósporo (haploide) (Figuras 6D e 7A) originará um grão de pólen (Figura 7B).

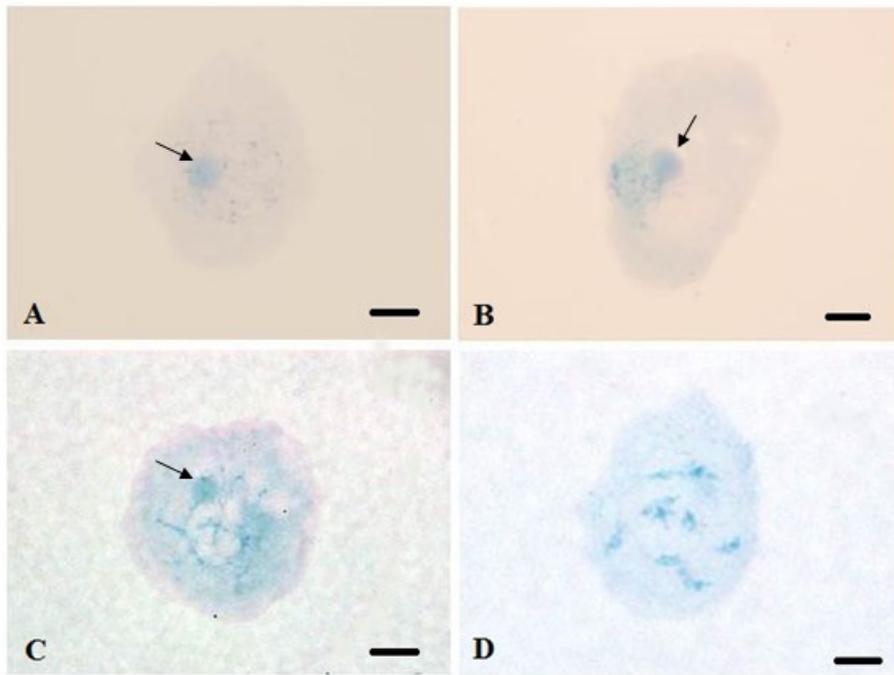


Figura 4. Comportamento meiótico de *Eugenia involucrata*. A) Leptóteno. B) Zigóteno. C) Paquíteno. D) Diplóteno. As setas indicam os nucléolos. Barra=10 μ m

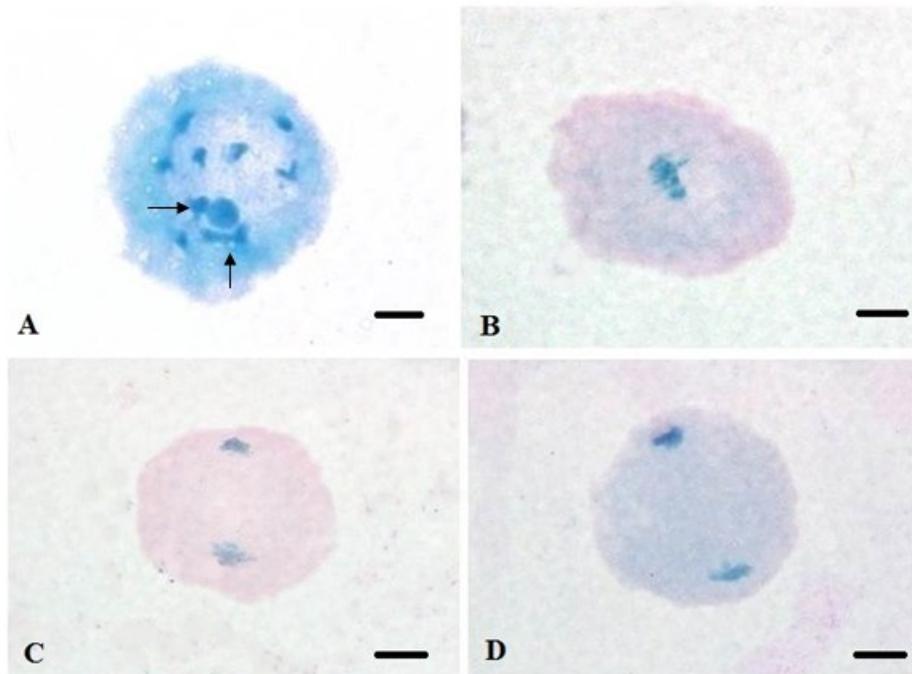


Figura 5. Comportamento meiótico de *Eugenia involucrata*. A) Diacinese com 9 bivalentes e dois pares de cromossomos associados ao nucléolo (setas). B) Metáfase I. C) Anáfase I tardia. D) Telófase I. Barra=10 μ m

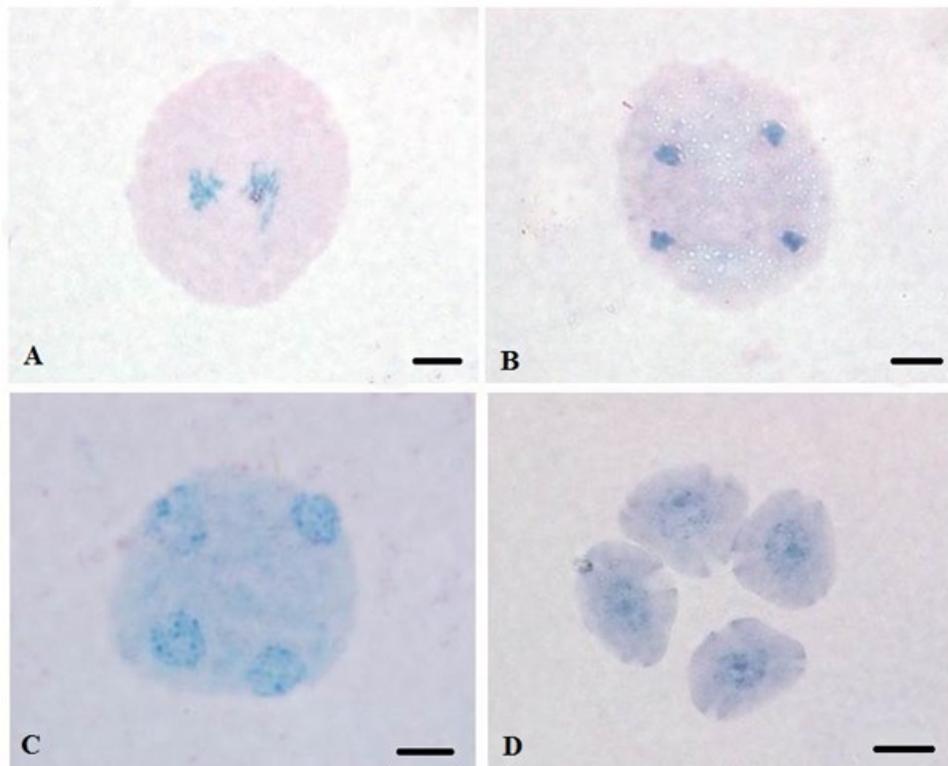


Figura 6. Comportamento meiótico de *Eugenia involucrata*. A) Metáfase II. B) Anáfase II tardia. C) Tétrade. D) Micrósporos. Barra=10µm

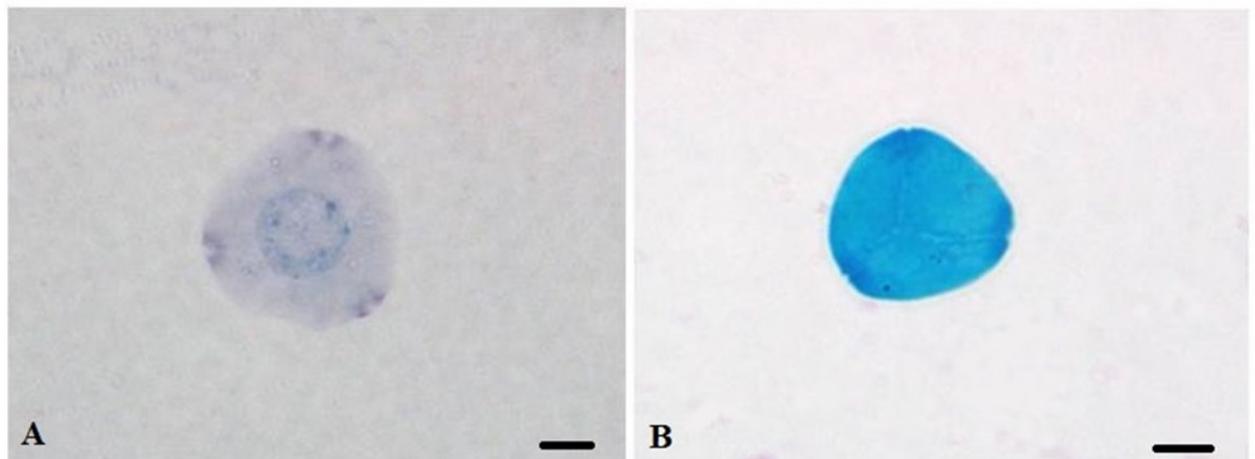


Figura 7. Comportamento meiótico de *Eugenia involucrata*. A) Micrósporo. B) Grão de pólen imaturo. Barra=10µm.

De acordo com Love (1949) plantas que apresentam índices meióticos superiores a 90% podem ser consideradas citologicamente estáveis. A espécie *Eugenia involucrata* apresentou, no presente estudo, índice superior a 95%. Quanto maior o índice meiótico, mais normal é o comportamento dos cromossomos, como evidenciado pelas análises do comportamento meiótico que apresentou regularidade nas fases da meiose. Estudos realizados por Franzon e Raseira (2004) com cerejeiras-do-mato provenientes do Rio Grande do Sul indicaram que a espécie apresentou índice meiótico de 87,3%. No mesmo trabalho foram identificados percentuais de tétrades normais para outras mirtáceas nativas, nos quais encontraram-se valores variando de 84,8% a 96,3%.

Considerando a família Myrtaceae, análises envolvendo o comportamento meiótico durante a microsporogênese e a viabilidade polínica em nove acessos de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) (Skeels), provenientes do Rio Grande do Sul, verificaram que os indivíduos analisados apresentaram meiose regular, com índices meióticos superiores a 91% e índices de viabilidade polínica variando entre 93,19% e 96,5% (LOGUERCIO; BATTISTIN, 2004).

O índice meiótico é um dado complementar à análise meiótica, sendo portanto, um indicador de regularidade (POZZOBON, 2011). Assim, o presente estudo possibilita inferir que os indivíduos de *E. involucrata* analisados são meioticamente estáveis com produção de gametas masculinos balanceados.

De acordo com Pagliarini (2001), a análise do comportamento meiótico por meio da citogenética revela características e comportamentos cromossômicos visualizados somente neste tipo de divisão celular. Além disso, a variabilidade dos gametas e a fertilidade do grão de pólen são altamente dependentes da regularidade e da eficiência desse processo de forma que, se ocorrerem irregularidades durante a meiose, estas, poderão levar à formação de micrósporos anormais que apresentarão problemas de fertilidade do pólen. Elevadas instabilidades meióticas associadas à anormalidades cromossômicas resultam na formação de plantas atípicas, macho-estéreis ou incapazes de formação de grãos de pólen, podendo prejudicar a obtenção dos padrões mínimos exigidos para a produção de sementes assim como afetar a polinização (POZZOBON, 2011).

Ainda segundo o mesmo autor, a estabilidade meiótica e a produção de gametas viáveis são aspectos diretamente associados à reprodução e manutenção

das plantas dessas espécies por meio de sementes. A identificação de genótipos mais estáveis mediante análise citológica permite, portanto, o planejamento de programas de produção de sementes das cultivares em vias de lançamento, como também, auxilia na eventual utilização destes, para a produção de novas populações.

Desse modo, as irregularidades passam a ter reflexo na viabilidade de pólen que, por sua vez, podem exercer influência na taxa de pegamento de frutos em cruzamentos e autofecundações e, conseqüentemente, a produção de sementes híbridas ou de sementes autofecundadas.

Diegues (2015) relata que estudos de estabilidade meiótica e viabilidade dos grãos de pólen permitem indicar o potencial de cruzamento da planta, de modo que, por meio dos dados de viabilidade polínica, é possível obter correlações com anormalidades meióticas, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre a eficiência de cruzamentos.

Considerando o exposto anteriormente, a análise do comportamento meiótico é uma ferramenta muito utilizada para estudos evolutivos, assim como na escolha de genótipos a serem utilizados em programas de melhoramento genético, uma vez que, permite que a planta seja avaliada quanto à sua estabilidade genética e fertilidade, que pode auxiliar na seleção dos genótipos de interesse (GRANATO, 2010).

4.1.2 Viabilidade dos grãos de pólen

Informações sobre a viabilidade do pólen são essenciais para a conservação e caracterização de germoplasma, assim como para o melhoramento genético, uma vez que as taxas de viabilidade polínica estão associadas ao comportamento meiótico.

Os resultados obtidos indicam que os corantes empregados foram eficientes para a determinação dos índices de viabilidade polínica. De um total de 2016 grãos de pólen avaliados com auxílio do método de coloração com Carmim acético 2% obteve-se um percentual de viabilidade igual a 96%. No teste colorimétrico com Alexander observaram-se 2521 pólenes, dos quais se obteve um valor de viabilidade

igual a 98%. A figura 8 mostra grãos de pólen de *E. involucrata* submetidos aos diferentes corantes. Os altos índices de viabilidade estão de acordo com a regularidade do processo meiótico observado para a espécie no presente estudo.

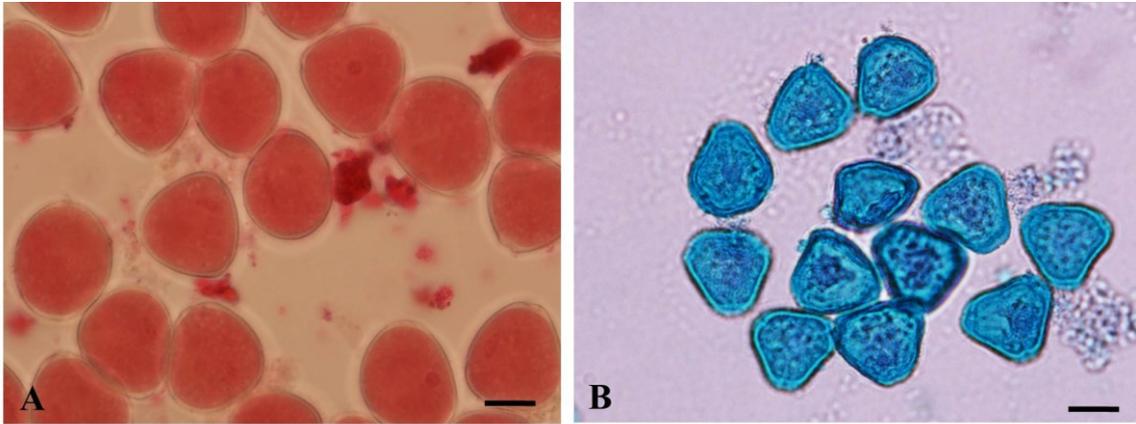


Figura 8. Testes colorimétricos de viabilidade polínica em *Eugenia involucrata*. A) Grãos de pólen viáveis corados com Carmim acético 2%. B) Grãos de pólen corados com solução de Alexander. Barra = 10 μ m.

4.2 PALINOLOGIA

4.2.1 Caracterização citoquímica

Os testes colorimétricos com Lugol e Sudan IV possibilitaram constatar que os grãos de pólen de *E. involucrata* apresentam amido como substância de reserva, uma vez que com o lugol, os grãos de pólen adquiriram coloração marrom-avermelhada (Figura 9A). A coloração com Sudan IV permitiu identificar que os grãos de pólen são lipídios negativos, já que os grãos permaneceram incolores, mesmo após o tratamento com o corante (Figura 9B).

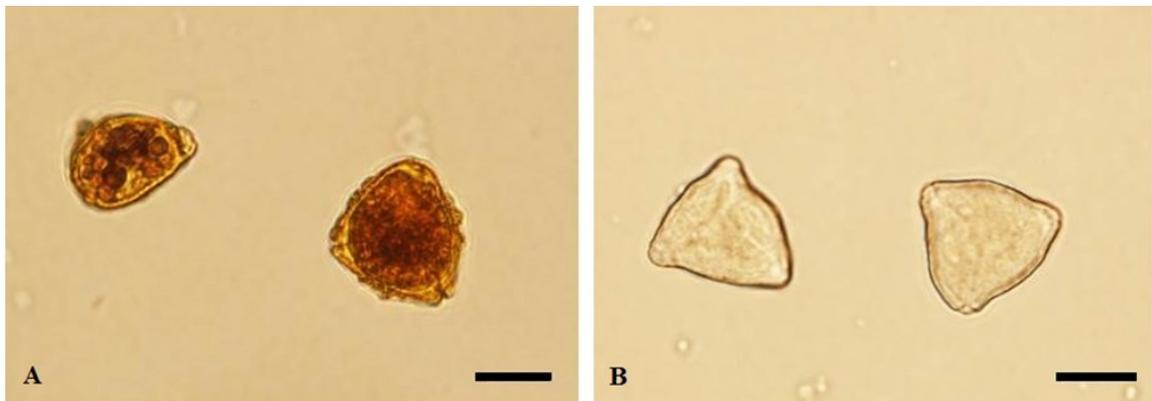


Figura 9. Testes citoquímicos em grãos de pólen de *Eugenia involucrata*. A) Grãos de pólen amido positivos corados com Lugol. B) Grãos de pólen lipídeos negativos tratados com Sudan IV. Barra = 10µm.

A presença de amido como substância de reserva parece ser importante na manutenção da viabilidade do grão de pólen, pois o amido é totalmente ou parcialmente convertido em glicose, frutose, sacarose e pectinas que aumentam a sua resistência em ambientes hostis, bem como auxiliam na germinação do tubo polínico (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2003; PACINO; GUARNIERI; NEPI, 2006). Já a presença de lipídeos está relacionada à garantia de adesão dos grãos de pólen à antera e ao estigma, protege os grãos de pólen contra a perda de água e radiação UV e mantém os grãos de pólen unidos durante o transporte (PACINI; HESSE, 2005).

4.2.2 Morfometria

As análises morfométricas possibilitaram a descrição dos grãos de pólen de *E. involucrata* como indicados nas Tabelas 1 e 2. Grãos acetolisados em visão polar e equatorial estão representados na Figura 10.

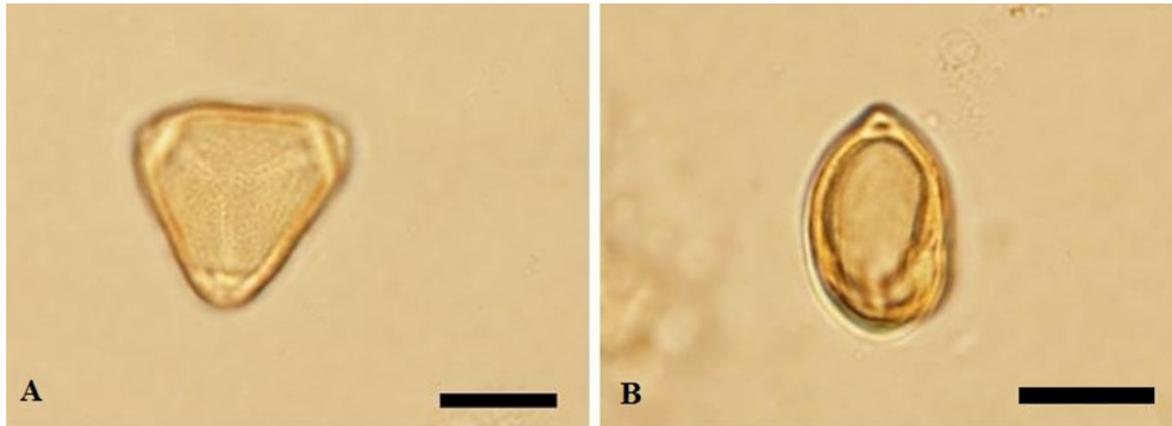


Figura 10. Grãos de pólen acetolisados de *Eugenia involucrata*. A) Visão polar. B) Visão equatorial. Barra = 10 μm .

Tabela 1. Valores médios dos eixos, espessura da exina e comprimento do colpo de grãos de pólen de *Eugenia involucrata*.

Características	Valores médios (μm)
Eixo Polar (P)	20,77 (11,75 – 23,81)
Eixo equatorial (E)	12,47 (9,11 – 17,97)
P/E	1,66
Espessura da exina	1,62 (1,26 – 2,10)
Comprimento do colpo	3,61 (2,47 – 4,35)

Tabela 2. Aspectos morfológicos de grãos de pólen de *Eugenia involucrata*.

Características	Morfologia
Agrupamento	Mônade
Tamanho	Pequeno
Forma	Prolato
Polaridade	Isopolar
Simetria	Bilateral
Âmbito	Triangular
Tipo de Abertura	Sincolpado
Escultura	Psilado

Os estudos com grãos de pólen são altamente confiáveis no que se refere à taxonomia em virtude da estabilidade da morfologia polínica, já que esta não está sujeita às alterações ambientais. Desta forma, estas informações colaboram na tentativa de compreensão das relações entre os diferentes grupos de plantas, bem como no estudo evolutivo dos táxons (GASPARINO; CRUZ-BARROS, 2006).

Descrições morfométricas de grãos de pólen dessa espécie já foram realizadas por Takeda *et al.* (2012). Os resultados do presente estudo contrastam com a caracterização realizada por estes autores devido à classificação da forma como peroblatos.

A análise de microscopia eletrônica de varredura possibilitou reconhecer que os grãos de pólen de *Eugenia involucrata* apresentam a ornamentação da exina verrugada (Figura 11).

Os dados do presente estudo corroboram com a descrição realizada por Junior *et al.* (2006) em relação à descrição do agrupamento, tamanho, formato, âmbito e tipo de aberturas, mas difere quanto a escultura, já que o referido autor relata que os grãos de pólen são psilados.

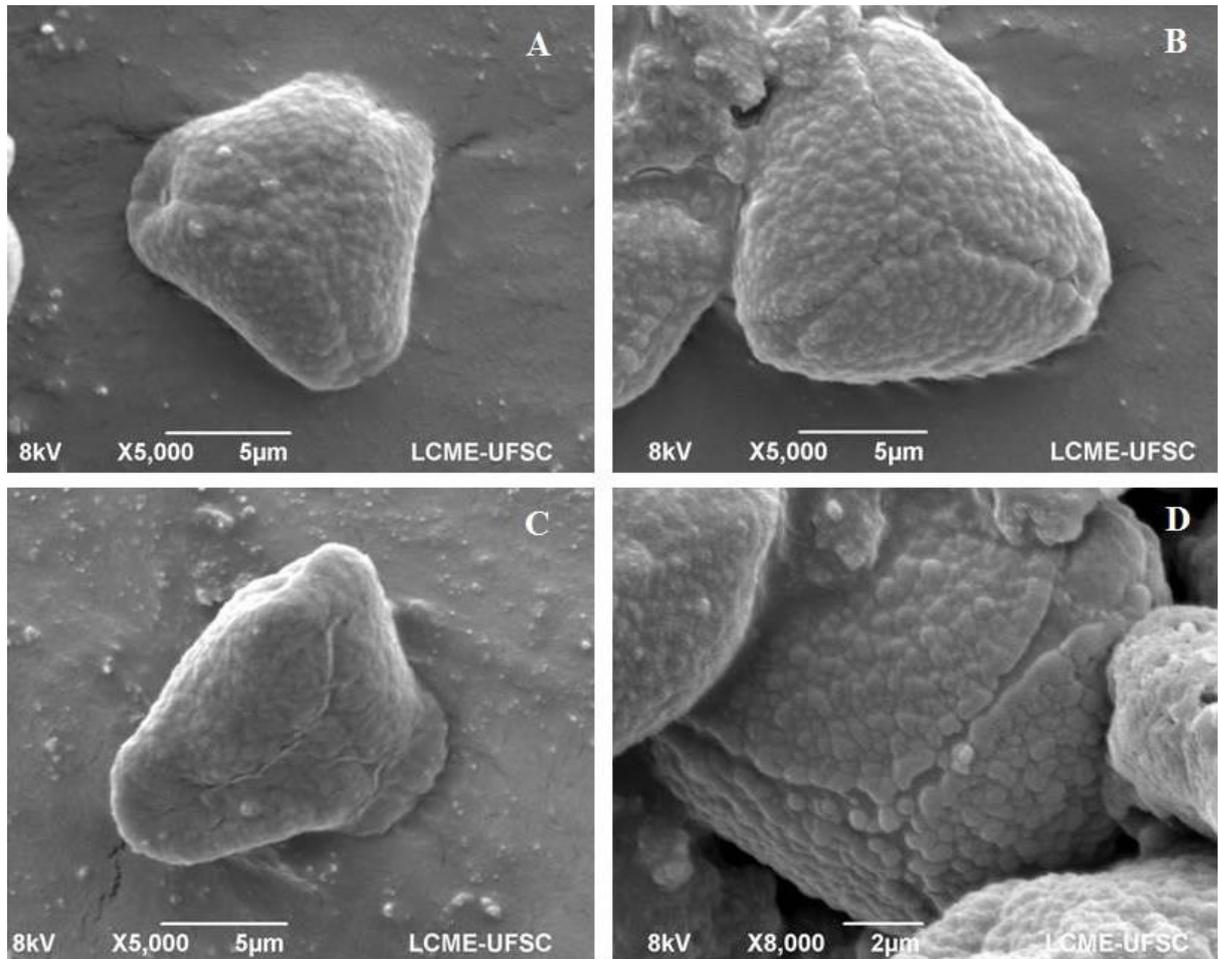


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura de grãos de pólen de *Eugenia involucrata*. Barras (figuras A a C) = 5 µm e figura D = 2 µm.

A figura 11 A apresenta o grão de pólen em visão polar, evidenciando a sua superfície verrugada. A figura 11 B demonstra o padrão de aberturas do pólen, em que a abertura dos colpos é encontrada no pólo sem deixar espaço (sincolpado). A figura 11 C mostra o pólen em visão equatorial e a figura 11 D evidencia detalhes da abertura de um dos colpos do grão de pólen.

A adesão dos grãos de pólen ao estigma pode ser favorecida pela presença de lipídeos como substâncias de reserva (PACINI; HESSE, 2005).

De acordo com alguns autores, a presença de ornamentações na exina está relacionada ao tipo de polinização. Considera-se que a exina psilada (lisa) está

relacionada à polinização pela água (hidrofilia) ou pelo vento (anemofilia), ao passo que plantas que apresentam grãos de pólen com a superfície ornamentada com espinhos, estrias, entre outras projeções, são polinizadas por animais (zoofilia), já que essas apresentam aderência ao corpo do animal, permitida e facilitada por tais ornamentações (LORSCHREITER, 2006; JUDD *et al.*, 2009 *apud* COSTA, 2014).

Como foi comentado anteriormente, os indivíduos analisados no presente estudo não apresentaram lipídeos em sua constituição. Considerando que a espécie é autógama, a ausência dessas substâncias pode não exercer influências sobre o processo de polinização devido à proximidade das anteras em relação ao estigma. No entanto, a presença da superfície verrugada da exina, evidenciada pelas análises na Microscopia Eletrônica de Varredura pode colaborar para a adesão dos mesmos ao estigma da flor durante o processo de polinização. Considerando-se que dados sobre mecanismos de polinização em *E. involucrata* são escassos, sugere-se que mais estudos sejam realizados.

4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho têm aplicação direta em estudos biossistemáticos e evolutivos, bem como podem corroborar com informações auxiliares em futuros programas de melhoramento genético, tendo em vista que, o processo meiótico e a viabilidade polínica dos indivíduos analisados são regulares. Sobretudo, a realização desta pesquisa com a espécie *Eugenia involucrata* configura mais uma forma estratégica de promover a conservação por meio do uso de recursos genéticos nativos do Brasil.

Estudos posteriores que contemplem análises morfométricas do cariótipo e o emprego de técnicas de bandeamentos cromossômicos, que evidenciem blocos heterocromáticos bem como regiões ricas em adenina/timina e citosina/guanina, são essenciais para o entendimento dos processos que levaram à formação de citótipos na espécie.

Acrescentado aos possíveis estudos, diante dos relatos disponíveis na literatura e, sobretudo as informações decorrentes do presente trabalho, sugere-se que análises sejam realizadas com outros indivíduos representantes de outras populações, preferencialmente, de diversas regiões onde há registro de sua ocorrência a fim de que seja possível estabelecer um perfil citogenético a respeito da espécie.

Damasceno et al. (2010), infere que é esperado que espécies não melhoradas geneticamente, sendo estas consideradas ainda espécies silvestres ou de domesticação incipiente, apresentem comportamento meiótico oscilante entre os genótipos e muitas irregularidades nas fases da meiose e pós-meiose, o que poderá resultar em uma fertilidade limitada quando se considera gametas masculinos. Nesse sentido, pesquisas que envolvem estes recursos genéticos são relevantes, uma vez que a caracterização citogenética de espécies de interesse para agricultura ou espécies de uso potencial, é capaz de gerar dados que podem ser direcionados ao melhoramento genético e auxiliar na identificação de genótipos superiores, para possível utilização em cruzamentos específicos.

5 CONCLUSÃO

A análise do comportamento meiótico de *E. involucrata* possibilitou inferir que a meiose é regular para os indivíduos analisados, não sendo observadas alterações cromossômicas em todas as fases avaliadas. Desse modo, a mesma apresenta alta estabilidade meiótica.

A estabilidade meiótica foi confirmada pelo índice meiótico e pela viabilidade polínica que apresentaram-se superiores a 95%.

O presente estudo permitiu a identificação de um novo citótipo ou raça cromossômica para *E. involucrata* DC com $2n=2x=18$ cromossomos.

A morfometria dos grãos de pólen contrastou com dados previamente relatados na literatura para a espécie, mostrando que a mesma apresenta grãos caracterizados como mônades, pequenos, verrugados, prolatos, sincolpados, de simetria bilateral e âmbito triangular.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, n.1, p. 13-18, 1980.
- ATCHINSON, E. Chromosome numbers in the Myrtaceae. **American Journal of Botany**, v. 34, n.3, p. 159-164, 1947.
- BARROSO, G. M. **Myrtaceae**. In: Sistemática de Angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. v. 2, p. 114-126. 1991.
- CALIARI, C. P. **Estudos em Myrtaceae do Estado de São Paulo: Myrcia seção Gomidesia**. 2013.129 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2013.
- CAMLOFSKI, A. M. O. **Caracterização do fruto de Cerejeira (*Eugenia involucrata* DC) visando seu aproveitamento tecnológico**. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- COOPER, R.L.; OSBORN, J.M.; PHILBRICK, C.T. Comparative pollen morphology and ultrastructure of the Callitrichaceae. **American Journal of Botany**, v.87, n.2, p.161-175, 2000.
- COSTA, I. R. **Estudos cromossômicos em espécies de Myrtaceae Juss. no sudeste do Brasil**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.
- COSTA, I. R. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. 2009. 244f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.
- COSTA, V. F. **Descrição morfológica dos tipos polínicos das angiospermas que oferecem recursos florais no Campus de Patos, CSTR, UFCG**. 2014. 51 f. Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas.
- CUADRADO, G.A. Palinologia de los géneros *Modiola*, *Modiolastrum* y *Tropidococcus* (Malvaceae). **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas - Universidad Nacional del Nordeste**, v.12, n.1-4, p.67-82, 2003.
- DAMASCENO, J. CORRÊA, P.; PEREIRA, T. N. S.; NETO, M. F.; PEREIRA, M. G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**. Vol. 63, n. 1, p. 229-236, 2010.
- DEGENHARDT, J.; FRANZON, R. C.; COSTA, R. R. **Cerejeira-do-Mato (*Eugenia involucrata*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007, 22 p.

- DIEGUES, I. P.; JUNIOR, P. C. D.; RIBEIRO, N.V. S.; REIS, M. V. M.; ABOUD, A. C. S. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 36, n. 1, p. 141-150, jan./fev. 2015
- ELISEU, S.A., DINIS, A.M. Ultrastructure and cytochemistry of *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) pollen grain. *Grana*, v. 47, n. 1, p. 39–51, 2008.
- ERDTMAN, G. The acetolysis method, a revised description. *Svensk Bot. Tidskr.*, v. 54, p. 561-564, 1960.
- FARIA JÚNIOR, J. E. Q. **Revisão taxonômica e filogenia de *Eugenia* sect. *Pilothecium* (Kiaersk.) D. Legrand (Myrtaceae)**. 2014. 215 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- FORNI-MARTINS, E. R & MARTINS, F. R. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 4, p. 947-955, 2000.
- FRANZON, R. C. **Caracterização de mirtáceas nativos do sul do Brasil**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.
- FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B. Meiotic index in Myrtaceae native fruits trees from southern Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. v.4, p. 344-349, 2004.
- GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia**. Estágio de Docência: Curso para Capacitação de Monitores. Instituto de Botânica. São Paulo. 2006, 9 p.
- GODOY, S. M.; PEREIRA, A. R. A.; SANTOS, S. P. **Caracterização citogenética e morfológica de algumas espécies de plantas nativas da floresta semidecidual na estação ecológica do Caiuá, Paraná**. 2010.
- GRANATO, L. M. **Comportamento meiótico em híbridos de café arabusta (*C. Arabica* cv Borbon Vermelho x *C. Canephora* cv Robusta)**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 2010.
- GRIFFITHS, A.J.; WESSLER, S.R.; LEWOTIN, R.C.; CARROL, S.B. **Introdução à Genética**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009. 712p.
- GROSSI, J. A.; GODOY, S. M.; MACEDO, C. R.; PAULA, G. B. N.; ROMAGNOLO, M. B.; RISSO-PASCOTTO, C. Comportamento meiótico durante a microsporogênese. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* UNIPAR, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 51-56, 2011.
- GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.
- GUERRA, M. Chromosome number in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, v.120, p.339-350, 2008.

- GUERRA, M. Cytotaxonomy: The end of childhood. **Plant Biosystems**, v.146, n.3, p. 703–710, 2012.
- HOFFMANN, G. M.; VARASSIN, I. G. Variação da viabilidade polínica em *Tibouchina* (Melastomataceae). **Rodriguésia**, v.62, n.1, p. 223-228, 2011.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F. & DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético**. 3 ed. Editora Artmed, Porto Alegre. 632 p., 2009.
- JUNIOR, M. A. P.; CÔRREA, M. V. G.; MACEDO, R.B.; CANCELLI, R. R.; BAUERMANN, S. G. Grãos de pólen: Usos e aplicações. In: XVII Jornada Acadêmica da Biologia. Canoas. 2006.
- KEARNS, C.A. & INOUE, D.W. 1993. **Techniques for pollination biologist**. University of Colorado, Niwot, 583 p.
- LIMA, D. F. S. **Estudos taxonômicos e biosistemáticos sobre o complexo *Myrcia laruotteana* Cambess. (Myrtaceae)**. Curitiba, PR. 2011, 11 p.
- LORENZI, H. et al. *Eugenia involucrata* DC. In: Lorenzi, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**: de consumo in natura. Nova Odessa: Plantarum, 2006. p. 198-199.
- LORENZI, H. *Eugenia involucrata* DC. In: LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. p. 287.
- LORSCHUITTER, M. L. Contribuição da palinologia aos estudos Filogenéticos das Angiospermas. In: **Conferência Plenária e Simpósios do 57^o Congresso Nacional de Botânica**. MARIATH, J. E. A. & SANTOS, R. P. (orgs.). Anais do LVII Congresso Nacional de Botânica. Porto Alegre. P. 43-48, 2006.
- LOVE, R.M. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**. Porto Alegre: Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio. 23p. 1949.
- LUCAS E. J.; HARRIS, S. A.; MAZINE, F. F.; BELSHAM, S. R.; NIC LUGHADHA, E. M.; TELFORD, A.; GASSON, P. E.; CHASE, M. W. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). 2007. **Taxon**, Utrecht, v. 56, p. 1105-1128.
- MARIA, F. J.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Variability of the chromosomal number and meiotic behavior in populations of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) from southern Brazil. **Caryologia**, v.61, n.2, p.164-169, 2008.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C.; SOBRAL, M.; FOREST, F.; LUCAS, E. A preliminar phylogenetic analysis of *Eugenia* (Myrtaceae: Myrteae), with a focus on Neotropical species. **Kew Bulletin**, v.69, 2014, 14 p.

MCVAUGH, R. Tropical American Myrtaceae: Notes on generic concepts and descriptions of previously unrecognized species. *Fieldiana: Botany*, n. 29, p.145-228. 1956.

MCVAUGH, R. The Tropical American Myrtaceae – An interim report. **Taxon**, n.17, p.354-418. 1968.

MENDES-BONATO, A. B.; VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S.; PENTEADO, M. I. O. **Caracterização Citogenética de Acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae)**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 31 p.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, G. M.; NASCIMENTO, J. M. Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.1, n.01, p.317-346, 2014.

MOORE, R. J. Index to plant chromosome numbers. **International Association for Plant Taxonomy**. p. 1967-1971, 1977.

MUNHOZ, M.; LUZ, C. F. P.; FILHO, P. E. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.2, p.209-214, 2008.

PACINI, E.; GUARNIERI, M.; NEPI, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**, v.228, p.73-77, 2006.

PACINI, E., HESSE, M. Pollenkitt – its composition and functions. **Flora**. Aschaffenburg, v. 200, p. 399-415, 2005.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 91-96, 2000.

PIERRE, P. M. O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br (VERBENACEAE)**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2004.

POZZOBON, M.T.; SOUZA, K.R.R.; CARVALHO, S.I.C.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p.212-216, 2011.

POZZOBON, M. T.; BIANCHETTI, L. B.; SANTOS, S.; CARVALHO, S. I. C.; REIFSCHNEIDER, J. B.; RIBEIRO, C. S. C. Comportamento meiótico em acessos de *Capsicum chinense* Jacq. do Banco de Germoplasma da Embrapa, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 96-100, 2015.

PRADO, A. P. **Aspectos autoecológicos e silviculturais de *Eugenia involucreta* DC.** 2009. 134 f. Dissertação de mestrado (em Silvicultura) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS. 2009.

RAVEN, P. H. The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. **Annals of the Missouri Botanic Garden**, v.62, p.724-764, 1975.

REGO, G. M. **Cerejeira-do-mato.** Colombo, PR. 2006.

REGO, G. M.; LAVORANTI, O. J.; NETO, A. A. **Monitoramento dos Estádios Fenológicos estágios fenológicos reprodutivos da Cerejeira-do-Mato.** Colombo, PR, 2006, 24 p.

RYE, B. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. **Australian Journal of Botany**, v.27, p.547-573, 1979.

RODRIGUEZ-GUARCIA, M. I., RANI-ALAOUI, M., FERNANDEZ, M. C. Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Protoplasma**, v. 221, p.237–244, 2003.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta bot. bras.** v.20, n.3, p.529-548, 2006.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. Contribuição à palinologia dos cerrados. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. 291p. 1973.

SANTOS, K. L.; STEINER, N.; DUCROQUET, J. P. H. J; GUERRA, M. P.; NO DARI, R.O. Domesticação da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) no sul do Brasil. **Agrociencia**. v.9, n.2, p. 29–33, 2005.

SARMENTO, M. B.; SILVA, A. C. S.; SILVA, C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no Sul do Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 24, n.4, p. 250-262, 2012.

SHARPE, R. H.; SHERMAN, W. B.; BENDER, R. J. Cherry of Rio Grande. **Proceedings of Florida State Horticulture Society**, v.109, p.220-221, 1996.

SILVA, J. O. N. **A Família Myrtaceae no Parque Estadual das Dunas do Natal – RN, Brasil.** 2009. 60 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2009.

SILVEIRA, F. T.; ORTOLANI, F. A.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J.R. Caracterização citogenética em duas espécies do gênero Myrciaria. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, n.2, p. 327-333, 2006.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. 2015. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

SOUSA, S.M.; PIERRE, P.M.O.; TORRES, G.A.; DAVIDE, L.C.; VICCINI, L.F. **Relationship between pollen morphology and chromosome numbers in Brazilian species of *Lippia* L.** (Verbenaceae), v.85, n.1, p.147-157, 2013.

STANSKI, C. **Catálogo polínico de espécies de Myrtaceae e Solanaceae da região dos Campos Gerais- Paraná, Brasil.** 2014. 183 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal, área de concentração em Conservação da Natureza) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2014.

SUMNER, A. T. **Chromosomes Organization and Function.** North Berwick, United Kingdom: Blackwell Publishing, 2003, 294 P.

TAKEDA, I. J. M.; SOUZA, M. K. F.; FARAGO, P. V.; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do parque estadual de Vila Velha, Paraná – 3ª parte. **Arq. Ciênc. Saúde**, Unipar, v.6, n.1, p.61-66, 2002.

THORNHILL, A. H. Can Myrtaceae pollen of the Holocene from Bega Swamp (New South Wales, Australia) be compared with extant taxa? In: HABERKE, S.; STEVENSON, J.; PREBBLE, M. (Org.) **Altered Ecologies: Fire, Climate and Human Influence on Terrestrial Landscapes.** Canberra: Terra Australis, v. 32, 2010. p. 405-427.

TIANG, C.; HE, Y.; PAWLOWSKI, W. P. Chromosome Organization and Dynamics during Interphase, Mitosis, and Meiosis in Plants. **Plant Physiology**, v.158, p.26-34, 2012.

WILLARD, D.A.; BERNHARDT, C.E.; WEIMER, L.; COOPER, S.; GAMEZ, D.; JENSEN, J. Atlas of pollen and spores of the Florida everglades. **Palynology**, v.28, p.125-227, 2004.

WILSON, P. G.; O' BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v.251, p.3-19, 2005.

YOSHITOME, W. M. Y.; SOUZA, M. F. P.; KARSBURG, I. V. Caracterização dos cromossomos mitóticos e índice meiótico de *Theobroma speciosum* (L.). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.6, n.1, p.21- 28, 2008.