

POLLEN GRAIN VIABILITY IN ACCESSIONS OF *Crotalaria juncea* L. (FABACEAE)

VIABILIDAD DEL GRANO DE POLEN EN ACESIONES DE *Crotalaria juncea* L. (FABACEAE)

Ana P. D. Coelho¹, Katiule P. Morais¹, Haywood Dail Laughinghouse IV², Sandro J. Giacomini¹, Solange B. Tedesco^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, 1000, Cidade universitária, CEP 97105-900, Santa Maria-RS. (apauladurand@yahoo.com.br). ²MEES Program, College of Computer, Mathematical and Natural Sciences, University of Maryland, College Park, MD, USA. (stedesco@smail.ufsm.br).

ABSTRACT

Studies on pollen viability are useful for breeding *Crotalaria juncea* L. since they provide information that will increase the chance of successful intraspecific crossing. The aim of this study was to evaluate pollen viability in *C. juncea* accessions cultivated in Rio Grande do Sul, Brazil. Inflorescences of 10 accessions of *C. juncea* were collected, fixed in absolute ethanol: glacial acetic acid (3:1) for 72 h at room temperature and placed in 70 % ethanol. Analysis of pollen viability was performed with slides of anthers using the squashing technique and staining with acetic orcein 2 % and Alexander's stain. Means were compared using the Tukey test ($p \leq 0.05$). Pollen viability was high and significantly different among the accessions; the highest value was 99.67 % and the lowest 45.34 %. However, unviable pollen grains were also observed in all accessions.

Key words: *Crotalaria juncea* Alexander's stain, acetic orcein, pollen viability, plant cytogenetics.

INTRODUCTION

In an attempt to minimize the accelerated degradation of soil fertility, green manure crops are used to maintain the physical, chemical and biological properties of the soil. Among these crops, *Crotalaria juncea* L. is frequently used due to its precocity and high green mass production; moreover, it produces highly smooth fiber which

RESUMEN

Los estudios de la viabilidad del polen son útiles para el mejoramiento genético de *Crotalaria juncea* L., porque proveen información que aumentará la oportunidad de cruces intraespecíficos exitosos. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad del polen de accesiones de *C. juncea* cultivadas en Rio Grande do Sul, Brasil. Las inflorescencias de 10 accesiones de *C. juncea* fueron recolectadas, fijadas en etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1) por 72 h a temperatura ambiente, y colocadas en etanol al 70 %. El análisis de viabilidad del polen se realizó en rebanadas de anteros mediante la técnica de aplastado y teñidas con orceína acética al 2 % y tinción de Alexander. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La viabilidad del polen fue alta con diferencias significativas entre las accesiones; el valor más alto fue 99.67 % y el menor 45.34 %. Sin embargo, en todas las accesiones se observaron granos de polen no viable.

Palabras clave: *Crotalaria juncea*, tintura de Alexander, orceína acética, viabilidad de polen, citogenética vegetal.

INTRODUCCIÓN

Para minimizar la degradación acelerada de la fertilidad del suelo, los abonos verdes se usan para mantener las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Entre estos cultivos, *Crotalaria juncea* L. se usa frecuentemente dada su precocidad y alta producción de biomasa; además produce fibra lisa que tiene importancia económica (Mozambani *et al.*, 1993). Esta especie es originaria de la India y bien adaptada a las regiones tropicales. La planta es un arbusto con crecimiento erecto, produce fibra y pulpa de alta calidad apropiadas para

* Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: June, 2011. Approved: July, 2012.

Published as NOTE in *Agrociencia* 46: 481-487. 2012.

is economically important (Mozambani *et al.*, 1993). This species is originally from India and is well adapted to tropical regions. The plant is shrub-like, growing erect; its fiber and high quality pulp are appropriate for the paper industry. It is also recommended as green manure for crops interspersed in cane sugar (*Saccharum officinarum*) or in rotation in grain cultures. It shows fast initial growth reaching 3.0 to 3.5 m in height under normal weather conditions; it is also considered a poor host of galls and cyst-forming nematodes (Braga *et al.*, 2010).

The study of pollen viability is used in plant breeding for various species because of the ease, speed, low cost, and reliability of the technique. An individual's genotype comes from a male and a female gamete; therefore, the higher the pollen viability, the greater the probability of obtaining different combinations of alleles, and genetic variability (Souza *et al.*, 2002). According to Ferreira (2009), pollen grains showed low viability in two out of three species of *Crotalaria*; this finding could be extended to all the species of the genus such as *C. juncea*. The determination of pollen viability can be carried out by direct methods, such as *in vivo* or *in vitro* induction of pollen germination, and by indirect methods based on cytological variables such as staining (Dafni, 1992; Shivanna and Rangaswamy, 1992; Kearns and Inouye, 1993). According to Techio *et al.* (2006), there is no description of a universal test of pollen viability using a specific stain.

It is important to verify pollen viability due to the direct link to fertilization efficiency, since they contribute to taxonomic, ecological and palynological studies. These studies also provide information for practical application in genetic conservation and plant breeding (Arroyo, 1981; Guinet, 1989; Auler, 2004). Therefore, the objective of this study was to evaluate pollen grain viability of *Crotalaria juncea* using two different stains to indicate which one is more efficient.

MATERIALS AND METHODS

The analyses were performed at the Laboratory of Cytogenetics and Plant Genotoxicity, Department of Biology, Center of Natural and Exact Sciences, of the Federal University of Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brazil.

la industria papelera. También se recomienda como abono verde en cultivos intercalados con caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) o en rotación con cultivos de granos. Muestra un crecimiento inicial rápido y alcanza 3.0 a 3.5 m de altura en condiciones normales; además, se considera un hospedero pobre para nematodos que forman agallas y quistes (Braga *et al.*, 2010).

El estudio de viabilidad del polen se usa en el mejoramiento de plantas de varias especies debido a la facilidad, rapidez, bajo costo y confiabilidad de la técnica. El genotipo de un individuo proviene de un gameto masculino y uno femenino; por tanto, entre más viable el polen, la probabilidad de obtener diferentes combinaciones de alelos y variabilidad genética es mayor (Souza *et al.*, 2002). Según Ferreira (2009), los granos de polen mostraron baja viabilidad en dos de tres especies de *Crotalaria*; esto podría extenderse a todas las especies del género, como *C. juncea*. La determinación de la viabilidad del polen puede realizarse por métodos directos como la inducción de la germinación *in vivo* o *in vitro*, y por métodos indirectos con base en variables citológicas como el color (Dafni, 1992; Shivanna y Rangaswamy, 1992; Kearns e Inouye, 1993). Según Techio *et al.* (2006), no hay una descripción de una prueba universal de la viabilidad del polen que use una tintura específica.

Dada la conexión directa con la eficiencia de la fecundación y su contribución a los estudios taxonómicos, ecológicos y palinológicos es importante verificar la viabilidad del polen. Estos estudios también proveen información para su aplicación práctica en la conservación y mejoramiento de plantas (Arroyo, 1981; Guinet, 1989; Auler, 2004). Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de granos de polen de *Crotalaria juncea* usando dos diferentes tinturas para determinar cuál es más eficiente.

MATERIALES Y METODOS

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Citogenética y Genotoxicidad Vegetal, Departamento de Biología, Centro de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Federal de Santa María (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil.

Las inflorescencias de 10 accesiones fueron plantadas el 17 de enero de 2010 en el área experimental del Departamento de Tierras de la UFSM, con coordenadas geográficas UTM

Flower buds of 10 accessions of *C. juncea* were sown on 17 January, 2010, in the experimental area of the Department of Lands–UFMS, with UTM coordinates UTM 6709849/238028. This area is characterized by yellow dystrophic arenic Acrisol soil type, gentle undulating topography and Cfa climate according to Köppen climate classification (Köppen, 1936). The flower buds were cultivated in 5×10 m plots, where they served as a summer cover crop (SCC). The 10 accessions were planted randomly within the plots.

For the pollen viability study, the flower buds were collected in April 2010, fixed in ethanol-acetic acid (3:1 v: v), kept at 23 °C for 72 h, transferred to 70 % ethanol (v/v) and kept under refrigeration. The slides for the analysis were prepared with the technique of squashing the anthers (Guerra and Souza, 2002), and two slides per *C. juncea* accession. In each type of staining 300 grains of pollen per slide were counted and the variable was the number of viable or nonviable grains. The viability of the pollen was determined comparing the stains: 2 % acetic orcein (w/v) and Alexander's stain: 5 mL ethanol, 0.5 mL green malachite, 25 mL distilled water, 12.5 mL glycerol, 2.5 mL acid fuchsine, 1.5 mL glacial acetic acid and 2.5 g chloral hydrate (adapted from Alexander, 1980). Pollen grains of all accessions of *C. juncea* were analyzed using light microscopy at 400x and photographed with a digital Cannon camera. A completely randomized design was used and means were analyzed with the Tukey test ($p \leq 0.05$) using the program Assistat version 7.6.

RESULTS AND DISCUSSION

The grains treated with acetic orcein and showing weak or no staining were considered nonviable (Figure 1A) and those that stained were viable (Figure 1B).

6709849 N, 238028 S. El área se caracteriza por suelos amarillos de tipo Acrisol distrófico arenoso, topografía suavemente ondulada, y clima Cfa de acuerdo con la clasificación de Köppen (Köppen, 1936). Las yemas florales se cultivaron en parcelas de 5×10 m, sirviendo como cultivos de cobertura de verano (CCV). Las 10 accesiones se colocaron al azar dentro de las parcelas.

Para el estudio de viabilidad del polen, las inflorescencias fueron recolectadas en abril de 2010, fijadas con ácido acético-etanol (3:1 v:v), mantenidas 72 h a 23 °C, transferidas a etanol al 70 % (v/v) y refrigeradas. Las rebanadas para el análisis se prepararon mediante la técnica de aplastado de las anteras (Guerra y Souza 2002), y dos rebanadas por accesión de *C. juncea*. Para cada tipo de tinción se contabilizaron 300 granos de polen por rebanada y la variable fue el número de granos viables e inviables. La viabilidad del polen se determinó comparando las tinciones de orceína acética al 2 % (w/v) y la tinción de Alexander: 5 mL etanol, 0.5 mL malaquita verde, 25 mL agua destilada, 12.5 mL glicerol, 2.5 mL ácido fucsina, 1.5 mL ácido acético glacial y 2.5 g hidrato cloral (adaptado de Alexander, 1980). Los granos de polen de todas las accesiones de *C. juncea* se analizaron con un microscopio de luz a 400x y se fotografiaron con una cámara digital Cannon. El diseño experimental fue totalmente aleatorio y las medias se analizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) en el programa Assistat, versión 7.6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los granos tratados con orceína acética con tinción débil o que no se tiñeron fueron considerados inviables (Figura 1A) y aquellos con tinción fueron viables (Figura 1B). Los granos teñidos

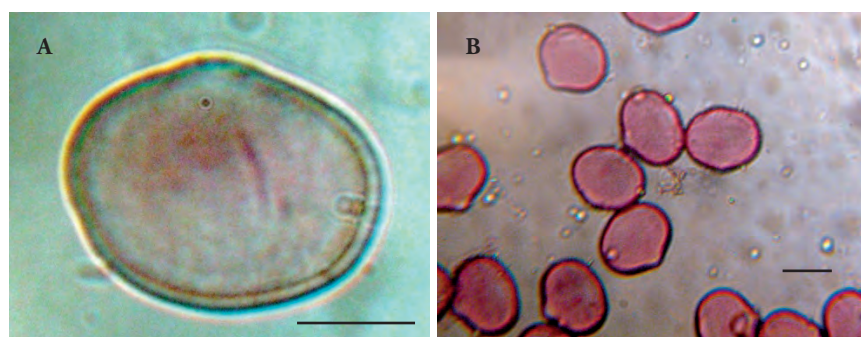


Figure 1. Pollen viability of *Crotalaria juncea* stained with 2 % acetic orcein. A: nonviable pollen from accession 5; B: viable pollen from accession 1. (Scale: 10 μ m).

Figura 1. Viabilidad de polen de *Crotalaria juncea* teñido con orceína acética al 2 %. A: polen inviable de accesión 5; B: polen viable de accesión 1. (Escala: 10 μ m).

The grains stained with the Alexander's stain were nonviable when the pollen was colored blue-green (Figure 2A) or blue, and partially stained (Figures 2B and 2C); and viable when the pollen stained purple (Figure 2D).

The results of *C. juncea* pollen grain viability study using acetic orcein and Alexander's stain on the 10 accessions are shown in Table 1. In accessions 1, 7 and 10 there were significant differences between both stains, which could be due to the different mode of action of each stain on the cytological structure of the pollen grains. The values varied between 96 and 100 % viable pollen grains using acetic orcein. Auler (2004) report 97 to 98 % pollen viability with populations of *Baccharis trimera* Less (DC), which is as high as in our study.

The analysis of pollen viability with Alexander's stain (Table 1; 45.34 to 99.67 %) shows that acetic orcein overestimated pollen viability. Techio *et*

con la tinción Alexander se consideraron inviables cuando el polen se tiñó azul verdoso (Figura 2A) o azul, y parcialmente teñido (Figuras 2B y 2C); y viable cuando el polen se tiñó morado (Figura 2D).

Los resultados del estudio de viabilidad de polen de *C. juncea* usando orceina acética y tinción Alexander en las 10 accesiones se muestran en el Cuadro 1. En las accesiones 1, 7 y 10 hubo diferencias significativas entre tinciones, las cuales pueden deberse al modo de acción específico de cada tinción en la estructura citológica de los granos de polen. Los valores variaron de 96 a 100 % de granos de polen viable usando orceina acética. Auler (2004) reporta 97 a 98 % de viabilidad en poblaciones de *Baccharis trimera* Less (DC), similares a los del presente estudio.

El análisis de viabilidad del polen con la tinción de Alexander (Cuadro 1; 45.34 a 99.67 %) muestra

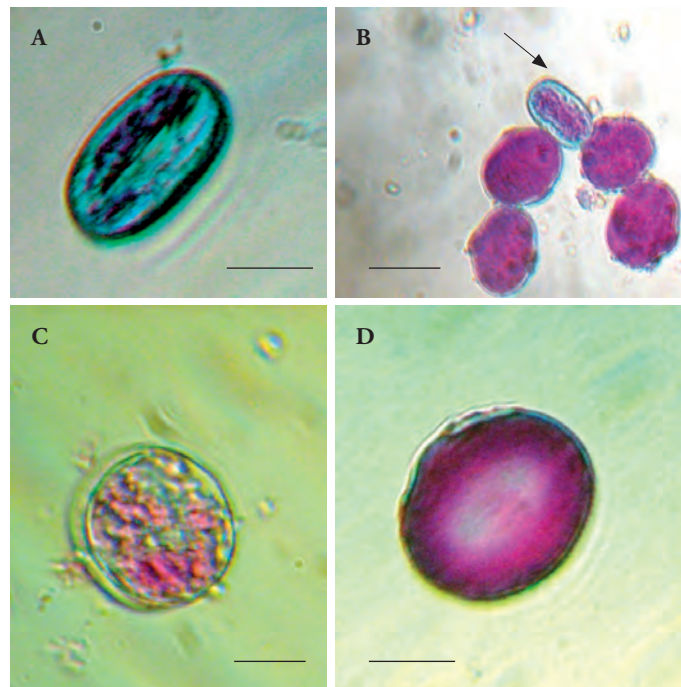


Figure 2. Pollen viability of *Crotalaria juncea* stained with Alexander's stain. A: nonviable pollen from accession 1; B: central pollen (indicated by an arrow) nonviable and the others viable from accession 6; C: nonviable pollen from accession 7; D: viable pollen from accession 4. (Scale: 10 μ m).

Figura 2. Viabilidad de polen de *Crotalaria juncea* teñido con tinción de Alexander. A: polen inviable de accesión 1; B: polen central (indicado por una flecha) inviable y los otros viables de accesión 6; C: polen inviable de accesión 7; D: polen viable de accesión 4. (Escala: 10 μ m).

Table 1. Means of pollen viability (%) of 10 accessions of *Crotalaria juncea* determined by two stains. (Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil).
Cuadro 1. Medias de viabilidad (%) de polen de 10 accesiones de *Crotalaria juncea* determinada por dos tinciones. (Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil).

Accessions	Acetic orcein 2 %		Alexander's stain	
	N ^{¶¶}	Viability, %	N [§]	Viability, %
1	300	100a †	146	48.68d
2	300	100a	298	99.34a
3	300	100a	294	98 a
4	299	99.67a	298	99.34a
5	298	99.34a	292	97.34a
6	297	99a	251	83.34b
7	288	96a	136	45.34d
8	295	98.34a	279	93a
9	300	100a	299	99.67a
10	292	97.34a	209	69.67c
Treatment means		98.96A		83.37B

¶¶ Number of viable pollen grains stained with acetic orcein. § Number of viable pollen grains stained with Alexander's stain. † Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). Lowercase letters compare columns and capital letters compare rows. CV = 16.61 ¶¶ Número de granos de polen viable teñidos con orceína acética. § Número de granos de polen viable teñidos con tinción de Alexander. † Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Letras minúsculas comparan columnas y letras mayúsculas comparan filas. CV = 16.61.

al. (2006) report that there is no description of a universal test for viability using a specific stain and that Alexander's stain (malachite green + acid fuchsin) was more accurate in differential staining where malachite green has an affinity with the cell wall cellulose and stains it green, while the protoplasm is stained pink by the fuchsin acid.

According to Alexander (1980), pollen grains without protoplasm are stained green indicating that some stains have limited application because they stain only functional or viable pollen, while the nonviable pollen grains do not stain. Therefore, such stains are not adequate for species with pollen grains having thick walls which make stain penetration difficult and prevent coloration.

Munhoz *et al.* (2008) studied the pollen viability of papaya (*Carica papaya* L.) cv. Sunrise Solo using *in vitro* germination and colorimetric tests, as well as validation of colorimetric tests compared with that of the germination test. The two culture media differed basically in concentration of essential nutrients and agar. The culture media without essential elements and with a higher concentration of agar had the best pollen germination index (65 %) and the five

que orceína acética sobreestimó la viabilidad del polen. Techio *et al.* (2006) reportan que no hay una descripción de una prueba universal de viabilidad usando una tinción específica y que la tinción de Alexander (malaquita verde + ácido fucsina) fue más precisa en la tinción diferencial, donde la malaquita verde muestra una alta afinidad con la pared celular tiéndola de verde, mientras que el protoplasma se tiñe de rosa con el ácido fucsina.

De acuerdo con Alexander (1980), los granos de polen sin protoplasma se tiñen de verde indicando que algunas tinciones tienen aplicación limitada porque tiñen sólo polen funcional o viable, mientras que el polen inviable no muestra coloración. Por tanto, dichas tinciones no son adecuadas para especies con granos de polen que tienen paredes celulares gruesas que dificultan la penetración de la tintura, previniendo la coloración.

Munhoz *et al.* (2008) estudiaron la viabilidad del polen de papaya (*Carica papaya* L.) cv. Sunrise Solo usando germinación *in vitro* y pruebas colorimétricas, así como la validación de las pruebas colorimétricas comparadas con las pruebas de germinación. Ambos medios de cultivo se diferenciaron

tested stains were 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), Alexander, acetic carmine, lugol, and Sudan IV. The colorimetric test with TTC supplied a viability estimate (67.5 %) equivalent to the *in vitro* germination test, and therefore, it is reliable for testing pollen viability. The other stains overestimated pollen viability (>90 %), but they were efficient for determining cellular constituents of the pollen grain.

Pollen viability was high for *Crotalaria spectabilis* (99.3 %), *C. zanzibarica* (98.6 %) and *C. micans* (98 %) according to the different stains, including Alexander's stain, but it was not possible to detect the nonviability with the differential Alexander's stain (Ferreira *et al.*, 2009). According to Twell (1995), pollen can become nonviable during microgametogenesis, where errors in meiotic behavior result in gametes with unbalanced, or anucleate, chromosomes or in pollen grains with a retracted cytoplasm.

Based on the results of our study, acetic orcein showed a higher percentage of viability for all accessions, while Alexander's stain showed lower percentages for 3 accessions but higher for 7 of the 10 accessions. These results illustrate the occurrence of genetic variability in the accessions because most likely in those accessions showing significant difference between the acetic orcein stain and Alexander's stain, the grain wall is probably thicker. Souza *et al.* (2002), Meletti *et al.* (2003) and Corrêa *et al.* (2005) report that pollen viability can vary considerably among individuals of a single species and among samples of an individual.

CONCLUSIONS

Acetic orcein overestimated pollen viability for *Crotalaria juncea*, whereas Alexander's stain minimized the problems for obtaining data on pollen viability. Due to the gradual decrease of pollen grain viability and the reduction of fertilization efficiency, understanding the specific characteristics of pollen viability will contribute to plant breeding and seed production programs.

LITERATURE CITED

Alexander, M. P. A. 1980. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. *Stain Technol.* 5(1): 13-18.

básicamente por la concentración de nutrientes esenciales y agar. Así, los medios de cultivo sin elementos esenciales y con una concentración de agar mayor tuvieron los mejores índices de germinación de polen (65 %) y las cinco pruebas de tinción fueron cloruro 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTT), tinción de Alexander, carmina acética, lugol, y Sudán IV. La prueba colorimétrica con CTT dió una estimación de viabilidad (67.5 %) equivalente a la prueba de germinación *in vitro* y, por tanto, confiable para probar viabilidad de polen. Las otras tinciones sobreestimaron la viabilidad del polen (>90 %) pero fueron eficientes para determinar los constituyentes celulares del grano de polen.

La viabilidad de polen fue alta para *Crotalaria spectabilis* (99.3 %), *C. zanzibarica* (98.6 %) y *C. micans* (98 %) usando diferentes tinciones, incluyendo la tinción de Alexander, pero no fue posible identificar el polen inviable mediante la tinción diferencial de Alexander (Ferreira *et al.*, 2009). De acuerdo con Twell (1995), el polen puede volverse inviable durante la microgametogénesis, donde los errores en el comportamiento meiótico pueden generar gametos con cromosomas anucleados o desbalanceados, o en granos de polen con citoplasma contraído.

De acuerdo con los resultados de este estudio, la orceína acética dió un porcentaje de viabilidad mayor en todas las accesiones, mientras que la tinción de Alexander muestra los porcentajes más bajos para 3 accesiones y los más altos para 7 de las 10 accesiones. Estos resultados ilustran la ocurrencia de variabilidad genética en las accesiones, porque es muy probable que en las accesiones que muestran una diferencia significativa entre la orceína y la tinción de Alexander, la pared del grano es más gruesa. Souza *et al.* (2002), Meletti *et al.* (2003) y Corrêa *et al.* (2005) reportan que la viabilidad del polen puede variar considerablemente entre individuos de la misma especie y entre muestras de un mismo individuo.

CONCLUSIONES

La orceína acética sobreestimó la viabilidad del polen de *Crotalaria juncea*, mientras que la tinción de Alexander minimizó los problemas para obtener datos sobre viabilidad de polen. Debido al decremento gradual de la viabilidad del grano de polen y a la reducción de la eficiencia de fertilización, entender las características específicas de la viabilidad del polen

- Auler N., M. F. 2004. Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharis trimera* (Less) DC. (Carqueja) no Sul do Brasil. PhD thesis. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 108 p.
- Arroyo, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: Polhill, M., and P. H. Raven (eds). Adv. in Legumes Systematic 2: 723-769.
- Braga, N. R., M. A. C. de Miranda, E. B. Wutke, E. J. Ambrosano, and E. A. Bulisani. 2010. <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Crotalaria/Crotalaria.htm>. (Accessed: April, 2010).
- Corrêa, M. G. S., J. Viégas, J. B. Silva, P. F. V. Ávila, G. R. Busato, and J. S. Lemes. 2005. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. Acta Bot. Bras. 19(2): 295-303.
- Dafni, A. 1992. Pollination Ecology: A Practical Approach. University Press. New York. 250 p.
- Ferreira, K., G. A. Torres, I. V. Carvalho, and L. C. Davide. 2009. Comportamento meiótico anormal em três espécies de *Crotalaria*. Pesq. Agropec. Bras. 44(12): 1641-1646.
- Guerra, M. S., and M. J. Souza. 2002. Como Observar Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. FUNPEC. Ribeirão Preto. 191 p.
- Guinet, P. H. 1989. Advances in Legume Biology-Structure Evolution and Biology of Pollen in Leguminosae. Missouri Botanical Garden. 842 p.
- Kearns, C. A., and D. Inouye. 1993. Techniques for Pollination Biologists. University Press of Colorado. Niwot. 583 p.
- Köppen, W. 1936. Das Geographische Climate das System der Klimate. In: Köppen, W. and R. Geiger (eds). Handbuch der Klimatologie, Band 5, Teil C. Gebrüder Bornträger. Berlin. 44 p.
- Meletti, L. M. M., L. C. Bernacci, and M. D. Soares-Scott. 2003. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). ver. Bras. Frut. Jaboticabal 25 (2): 275-278.
- Mozambani, A. E., R. Sader, and L. R. Pinto. 1993. A maturação fisiológica e retardamento de colheita de sementes de crotalária (*Crotalaria juncea* L.). ver. Bras. Sementes 15(1): 55-62.
- Munhoz, M., C. F. P. da Luz, P. E. Meissner Filho, O. M. Barth, and F. Reinert. 2008. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. ver. Bras. Bot. 31(2): 209-214.
- Shivanna, K. R., and N. S. Rangaswamy. 1992. Pollen Biology. A Laboratory Manual. Springer-Verlag. Berlin/New York. 119 p.
- Souza, M. M. de, T. N. S. Pereira, and E. R. Martins. 2002. Microsporogênes e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). Ciênc. Agropec. 26(6): 1209-1217.
- Techio, V. H., L. C. Davide, C. A. Pedrozo, and A. V. Pereira. 2006. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante×milho). Acta Scientiarum Biol. Sci. 28(1): 7-12.
- Twell, D. 1995. Diphtheria toxin-mediated cell ablation indeveloping pollen: vegetative cell ablation blocks generativecell migration. Protoplasma 187: 144-154.

—Fin de la versión en Español—

