



DAYANNE MEDRADO SILVA

**MICROSPOROGÊNESE, VIABILIDADE E MORFOLOGIA
DO GRÃO DE PÓLEN EM ACESSOS DE *Cynodon* L. C. Rich.
(Poaceae)**

**LAVRAS – MG
2017**

DAYANNE MEDRADO SILVA

**MICROSPOROGÊNESE, VIABILIDADE E MORFOLOGIA DO GRÃO
DE PÓLEN EM ACESSOS DE *Cynodon* L. C. Rich. (Poaceae)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica Aplicada, para a obtenção
do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Coorientador: Dr. Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

LAVRAS- MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Dayanne Medrado.

Microscopogênese, viabilidade e morfologia do grão de pólen
em acessos de *Cynodon* L.C. Rich. (Poaceae) / Dayanne Medrado
Silva. - 2017.

43 p.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Flávio Rodrigo Gandolfi Benites.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Gramíneas forrageiras. 2. Grão de Pólen. 3. Meiose. 4. Grama
Bermuda. 5. Grama Estrela. I. Techio, Vânia Helena. II. Gandolfi
Benites, Flávio Rodrigo. III. Título.

DAYANNE MEDRADO SILVA

**MICROSPOROGÊNESE, VIABILIDADE E MORFOLOGIA DO GRÃO DE PÓLEN
EM ACESSOS DE *Cynodon* L. C. Rich. (Poaceae)**

**MICROSPOROGENESIS, POLLEN GRAIN VIABILITY AND MORPHOLOGY IN
ACCESSIONS OF *Cynodon* L. C. Rich. (Poaceae)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica Aplicada, para a obtenção
do título de Mestre.

APROVADO em 02 de março de 2017.

Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira UFLA

Dra. Andrea Beatriz Mendes-Bonato UEM

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Coorientador: Dr. Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

**LAVRAS- MG
2017**

À minha mãe Glória pelo amor, ajuda e compreensão. Aos meus pais adotivos Maria e Rufino por toda ajuda e incentivo. À minha madrinha Luciana por me inspirar e por todos os conselhos. À minha avó Maria Francisca (in memoriam) por todos os ensinamentos, amor e dedicação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me capacitar e me fortalecer.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Botânica Aplicada, pela oportunidade. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado. Às agências de fomento FAPEMIG e CNPq pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

À Embrapa Gado de Leite, por doar as plantas para realização deste trabalho.

À professora Dra. Vânia, pela orientação, dedicação e paciência, por todos os abraços que me deu quando precisei, pelo carinho e por me incentivar e me fazer acreditar que sou capaz.

À professora Dra. Larissa, por sempre me inserir nas confraternizações de seu grupo de pesquisa, me fazendo sentir acolhida.

Ao professor Dr. Evaristo, coordenador do programa de Botânica, por sempre ser tão receptivo e nos acolher como um pai.

A todos os funcionários e colegas do DBI/UFLA, em especial aos Técnicos do Laboratório de Citogenética Felipe e Iara, por todo auxílio na realização do meu trabalho. À Dona Iron, pelo chazinho todos os dias e por me tratar como filha.

Ao professor Dr. Eduardo Alves e as técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural DFP/UFLA, pelo auxílio com a preparação e análises de MEV.

À amiga Graciele, que foi a primeira pessoa a falar comigo quando cheguei no seminário de Botânica, por ter me ajudado e nunca desamparado ao longo desses anos, pela ajuda financeira que sempre me deu, os conselhos verdadeiros e pelos abraços quando eu pensava que nada mais tinha solução.

À Ludmila, que também se tornou uma grande amiga, obrigada por sempre me fazer rir e acreditar que o mundo tem pessoas lindas tanto por dentro quanto por fora, pelas caminhadas na UFLA para acalmar meu coração desesperado.

À Raquel que além de colega, irmã de orientação, também se tornou uma amiga, me salvando várias vezes das ciladas da vida, me aturando com o choro de falta de resultados, me ensinando a ouvir, me ajudando com as pranchas, com as redações que as vezes nem eu entendia.

À Naty, por me apresentar aos grupos de Dança da UFLA e também me oferecer apoio quando precisei, fazendo perdurar nossa amizade apesar de todos os problemas.

À colega de laboratório Kátia por compartilhar de sua experiência com acetólise entre outros métodos, sempre tirando dúvidas. À Yasmim por me auxiliar com coletas, por me lembrar várias vezes protocolos, por sofrer comigo sempre que os resultados eram estranhamente diferentes. À Ana Luísa por me ensinar montar lâminas e também por sempre rir comigo quando nosso experimento nos surpreendia, fosse com resultados, fosse com a falta deles.

Aos colegas do grupo Citogenética de Forrageiras, pela boa convivência, pelas risadas e por todo sorvete da Casa da Goiaba, vocês fizeram desses dois anos dias melhores.

À Flavinha, por sempre me socorrer, tanto financeiramente, quanto psicologicamente, pois me aturar chorando por tantos motivos não deve ter sido fácil.

Aos colegas de curso da Botânica, obrigada pelos momentos que passamos juntos durante as aulas e seminários, pelas risadas na mesa do R.U.

Aos amigos de SE que ganhei, vocês também iluminaram minha vida. Aos colegas e amigos do Dança Compasso UFLA e Incorpore UFLA, por oferecer tanto atividade física, quanto diversão durante as aulas, vocês contribuíram muito para minha saúde mental.

As amigas Gisely, Gisele, Gleicy e Stefânia, pelo apoio e pelas risadas noite a fora, quando eu estava tendo minhas crises existenciais, muito obrigada Bryetes!!! À Mainy, além de amiga, uma mãe, obrigada por sempre se lembrar de mim em suas orações.

Ao Dr. Alexandre Bryan, pela orientação de estágio, pois foi onde tudo começou. À Dra. Anna Cristina da Embrapa Arroz e Feijão, por sempre acreditar em mim, por me inspirar, incentivar e aconselhar.

Aos meus pais adotivos Maria e Rufino, pelo auxílio financeiro, pelo incentivo e amor.

À minha mãe Glória, pelo amor incondicional, por me ajudar nos momentos de decisões e por me amparar sempre.

Aos meus irmãos Johnathan, Diogo, Aline e Julie pelo apoio. Aos meus primos Gabriel, Juliana, Kleber e Lilian por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. À minha querida madrinha Luciana, por sempre se fazer presente, mesmo em meio a tantas ocupações.

Ao Elvis meu gatinho, por encher minha vida de alegria desde o momento em que foi adotado, por ficar ao meu lado durante todas as noites em claro.

À todos que de alguma forma me influenciaram, apoiaram e ajudaram a chegar até aqui.

MUITO OBRIGADA!

“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

O gênero *Cynodon*, foi comumente conhecido como planta daninha por diversos anos, contudo, houve um interesse crescente em estudar e utilizar as espécies após ser verificado a sua versatilidade, como a utilização para forragem animal e também na recuperação de áreas degradadas. O estudos sobre meiose em *Cynodon* são escassos, uma vez que as inflorescências são de tamanho reduzido, sendo difícil a padronização do estágio da coleta das espiguetas para observação. O objetivo deste estudo foi avaliar a microsporogênese, a viabilidade e a morfologia do grão de pólen de quatro acessos de *Cynodon*. Foram avaliados dois acessos tetraploides de *Cynodon dactylon* var. *dactylon* (L.) Pers. (grama bermuda) e dois acessos diploides de *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* Vanderyst, (grama estrela) onde foram empregadas técnicas de citogenética clássica para observação da meiose, avaliação da viabilidade polínica utilizando corantes: Carmim Propiônico 2% e Corante de Alexander e técnica de acetólise e análise de microscopia eletrônica de para avaliação da morfologia do grão de pólen. As anormalidades observadas nas análises de microsporogênese foram inferiores a 2% em todos os acessos avaliados, contudo os testes de coloração mostraram variações na taxa de viabilidade entre as espécies diploides e tetraploides. *C. dactylon* var. *dactylon* apresentou maior viabilidade que os acessos de *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* e ambos os corantes foram eficientes nas classificações. Os grãos de pólen foram classificados como oblatos esferoidais, monoaperturados e sem ornamentações na exina.

Palavras-chave: Gramíneas forrageiras. Grão de pólen. Meiose. Grama bermuda. Grama estrela.

ABSTRACT

The *Cynodon* genus was commonly known as weed for several years, however an increasing interest in studying and using these species has been observed due to their versatile usage, such as for animal forage and also for recovering degraded areas. There are few meiosis studies for *Cynodon* spp, once the inflorescences are of reduced size, making difficult the standardization of spikelet sampling for observation. The aim of this study was to evaluate the microsporogenesis, pollen grain viability and morphology of four *Cynodon* accessions. We analyzed two tetraploid accessions of *Cynodon dactylon* var. *dactylon* (L.) Pers. (Bermuda grass) and two diploid accessions of *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* Vanderyst (African Bermuda grass) for assessment using classical cytogenetic techniques for meiosis observation and pollen grain viability using both 2% Propionic Carmine and Alexander stain, and acetolysis and scanning electron microscopy to examine the pollen grain morphology. Less than 2% of meiosis abnormalities were observed in the microsporogenesis analysis for all accessions evaluated, nevertheless, the staining tests showed variations for the viability rate between diploid and tetraploid species. *C. dactylon* var. *dactylon* pollens showed higher viability rate than the accessions of *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* and both dyes were efficient for this analysis. The assessment of acetolysis and scanning electron microscopy allowed classifying the pollen grains as spheroidal oblates, monoporates and with no ornaments in the exine.

Keywords: Forage Grass. Pollen grains. Meiosis. Bermuda grass. Star grass.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 O gênero <i>Cynodon</i> L. C. Rich: Origem, aspectos taxonômicos, caracterização botânica e importância	13
2.2 Aspectos citogenéticos de <i>Cynodon</i> spp.	15
2.3 Estudos sobre o grão de pólen	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Local.....	20
3.2 Material vegetal	20
3.3 Avaliação da meiose e viabilidade do grão de pólen	20
3.5 Análise de ultraestrutura do grão de pólen por meio de microscopia eletrônica de varredura	22
4 RESULTADOS	23
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cynodon* L. C. Rich. pertence à família Poaceae e suas espécies apresentam valor econômico considerável, devido ao seu uso em diversas finalidades, tais como: forragem para alimentação animal, proteção contra erosão e cobertura de campos esportivos (NEIVA et al., 1999; TALIAFERRO; ROUQUETTE-JR; MISLEVY, 2004; WU; TALIAFERRO, 2009).

As plantas do gênero *Cynodon* são agrupadas em gramas bermudas que contêm estolões e rizomas e gramas estrelas que apresentam apenas estolões. As gramas estrelas também apresentam folhas e talos maiores do que as das gramas bermudas (HARLAN, 1970; ANDRADE et al. 2009).

Tratam-se de gramíneas perenes de climas tropicais e subtropicais, com ampla distribuição, chegando a serem consideradas cosmopolitas, como *Cynodon dactylon* (L.) Pers. var. *dactylon* (CARO; SANCHEZ, 1972; NEIVA et al., 1999; WU; TALIAFERRO, 2009). As espécies são bastante difundidas na África e possuem representantes na América do Sul. No Brasil, encontram-se em praticamente todo o território (CARO; SANCHEZ, 1969; HARLAN et al., 1970, FILGUEIRAS; VALLS, 2015). *C. Dactylon*, é conhecida popularmente como grama bermuda, sendo a espécie mais importante do gênero devido à sua prevalência, ampla distribuição geográfica e seus variantes morfológicos: var. *afghanicus*; var. *aridus*; var. *dactylon*; var. *coursii*; var. *elegans* e var. *polevansii*. Em *C. dactylon* var. *dactylon* são encontradas três raças: tropical, temperada e selêcida (WU; TALIAFERRO, 2009). A espécie *Cynodon nlemfuensis* é a mais promissora do grupo de gramas estrelas, pois apresenta características favoráveis como forrageira e é geneticamente relacionada à *C. dactylon* (WU; TALIAFERRO, 2009).

Até meados dos anos de 1940, as plantas de *Cynodon* foram consideradas como plantas daninhas, devido sua alta capacidade de adaptação, crescimento e estabelecimento no ambiente, bem como pela competitividade. Ainda em 1950, os agricultores tentavam o seu controle por métodos diversos, como capina, controle animal e químico (HOROWITZ, 1996). De acordo com Wu e Taliaferro (2009), importantes características observadas nesse gênero, despertaram o interesse em desenvolver cultivares, sobretudo devido à resistência ao frio, fator limitante para diversas espécies, adaptação ao clima temperado e eficiência no pastejo.

Em virtude do alto potencial expansivo, *Cynodon* spp., vem se tornando uma opção para agricultores (NEIVA et al., 1999), uma vez que o pastejo é uma fonte de alimentação com menor custo (PRIMAVESI et al., 2004). No Brasil, as plantas desenvolvem-se satisfatoriamente até mesmo em solos com baixa fertilidade (SOUSA; CARVALHO; ARAÚJO-FILHO, 1998).

Apesar da importância, ainda há controvérsias quanto ao número de espécies pertencentes ao gênero, pois há relatos de 20 espécies (CARO; SANCHEZ, 1969); nove espécies e dez variedades (HARLAN et al., 1970a) e, mais recentemente, 10 espécies (CLAYTON et al. 2009) e treze espécies (“*The Plant List 2016*”). Além disso, estudos citogenéticos para esse grupo ainda são escassos, resumindo-se, sobretudo em alguns envolvendo contagens cromossômicas. Quanto ao nível de ploidia, há variações de diploide a hexaploide, números cromossômicos entre 16 a 54 (AVDULOW, 1931; TALIFERRO; ROUQUETTE-JR; MISLEVY, 2004; AKSHITA, DHALIWAL; GUPTA, 2011) e número básico cromossômico $x=9$ (AVDULOW 1931; FORBES; BURTON, 1963) e $x=8$ (AKSHITA, DHALIWAL; GUPTA, 2011).

Os estudos de meiose para o gênero são raros e alguns muito antigos. Este tipo de estudo se torna um importante aliado para entender e acompanhar todo o processo para formação dos gametas. Durante as fases da meiose, ocorre o pareamento, a permuta genética, orientação e segregação cromossômica (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007), que são eventos fundamentais associados à variabilidade genética e que, portanto, devem ocorrer com normalidade e precisão. Contudo, durante os diferentes estágios da meiose, podem ocorrer falhas, que resultam em problemas com pareamento, orientação e segregação de cromossomos/cromátides levando a formação de gametas com número não balanceado de cromossomos e, geralmente, inférteis (PAGLIARINI, 2000; PAGLIARINI; FUZINATTO; VALLE, 2007).

Adicionalmente, o acompanhamento dos eventos pós-meióticos que resultam na formação do grão de pólen também é fundamental. Estudos envolvendo o grão de pólen permitem avançar em conhecimentos aplicados à taxonomia, palinologia, melhoramento genético e o conhecimento sobre o potencial de propagação que garante o sucesso da espécie. De acordo com Knox (1984), estudos do grão de pólen são primordiais para manipulação e hibridação de novas plantas, trabalhos onde envolvem também a ultraestrutura facilitam apontar alterações morfológicas e deficiências que por ventura possam existir e comprometer o sucesso reprodutivo das espécies.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a microsporogênese, a viabilidade e a morfologia do grão de pólen de quatro acessos de *Cynodon*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Cynodon* L. C. Rich: Origem, aspectos taxonômicos, caracterização botânica e importância

As espécies de *Cynodon* pertencem à família Poaceae, tribo Cynodonteae e subfamília Chloridoideae (WU, 2011), com provável origem na África (HARLAN et al, 1970). Informações quanto ao número de espécies são divergentes, Caro e Sanchez (1969) realizaram um estudo com plantas vivas e com exsicatas provenientes de herbário, onde realizaram cortes anatômicos e se basearam em chaves de identificação postulando 20 espécies para o gênero *Cynodon*. Harlan et al (1970a) avaliaram 700 acessos de *Cynodon* de uma coleção viva e agruparam nove espécies e dez variedades de acordo com a distribuição geográfica, outros autores como Clayton, Harman e Williamson (2009) dez espécies.

O “*The Plant List*” (2016) descreve que 13 espécies estão estabelecidas: *Cynodon aethiopicus* Clayton e Harlan, *Cynodon barberi* Rang. e Tadul., *Cynodon coursii* A. Camus, *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Cynodon flexicaulis* (Schwägr.) Steud., *Cynodon inclinatus* (Hedw.) Brid., *Cynodon incompletus* Nees, *Cynodon x magennisii* Hurcombe, *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst, *Cynodon parviglumis* Ohwi, *Cynodon plectostachyus* (K. Schum.) Pilg., *Cynodon radiatus* Roth, *Cynodon transvaalensis* Burt Davy. A lista ainda descreve 126 táxons que são sinônimas e cinco táxons que apresentam classificação irresoluta. Estes são fatores que contribuem para que a delimitação taxonômica do grupo fique comprometida.

As plantas do gênero apresentam folhas e hastes finas, o colmo é ereto e fino, de coloração verde escuro ou claro, porte médio e alcança até um metro de altura, as inflorescências podem ser roxas ou verdes, com espiguetas fechadas em duas linhas e anteras pendulas vermelhas (ATHAYDE et al., 2005; SIMPSON 2006; SEGHESE, 2009). As plantas de *Cynodon* podem ser genericamente divididas em rizomatosas e não rizomatosas com base na presença ou a ausência de rizomas na plantas adultas. As formas não rizomatosas são conhecidas como gramas estrela e as rizomatosas como gramas bermuda (HARLAN, 1970; ANDRADE et al., 2009). Geralmente, *C. dactylon* var. *dactylon* é referida como grama bermuda comum; a variedade *aridus* é frequentemente denominada como grama bermuda gigante e *C. transvaalensis*, como grama bermuda africana (KNEEBONE, 1966; TALIAFERRO, 1992; BURTON; HANNA, 1995; WU, 2011). Taliferro; Rouquette-Jr; Mislevy, (2004) usaram a denominação grama estrela para se referirem às espécies do Leste Africano *C. aethiopicus*, *C. nlemfuensis* e *C. plectostachyus*. *C. nlemfuensis* é a mais

promissora entre as gramas estrela, pois possui características favoráveis como forrageira e é geneticamente relacionada com *C. dactylon* (WU; TALIAFERRO, 2009)

A enorme variabilidade genética entre as espécies de *Cynodon* é derivada da reprodução sexual. Embora a capacidade de produção de sementes seja baixa, a maioria das plantas tem potencial para produzir alguma semente, permitindo assim a recombinação genética e segregação. A reprodução também se dá assexuadamente, por meio de partes vegetativas como estolões, rizomas, rebentos e gemas (WU; TALIAFERRO, 2009).

A polinização cruzada e a auto-incompatibilidade favorecem os cruzamentos entre as espécies, fator que contribui com o fluxo gênico. Ainda em relação à reprodução, foi relatado caso de apomixia na espécie *Cynodon aethiopicus* de acordo com Taliaferro e Lamle (1997) e Bogdan, (1977) ambos citados por Wu et al, (2006).

As gramíneas do gênero *Cynodon* são amplamente difundidas em áreas pastoris, mesmo tendo sido consideradas invasoras e esquecidas por algum tempo (LANGDON, 1954; NEIVA et al., 1999). A capacidade dessa gramínea de restabelecer-se em campo e a ótima proporção folha/colmo, despertou o interesse dos produtores que começaram a utilizá-la como forma de pastejo, pois observaram que alguns animais consumiam a forragem tão bem quanto outras espécies, haja visto que um dos fatores limitantes da produtividade de rebanhos é a escassez de pastagem (LEITE; MACHADO, 1999). Contudo, a produtividade pode variar de acordo com fatores como o solo, clima, disponibilidade de nutrientes e outros (SOUSA; CARVALHO; ARAÚJO-FILHO, 1998).

Antes mesmo de iniciarem os trabalhos de melhoramento genético com espécies de *Cynodon*, os pesquisadores e agricultores já haviam percebido que certos clones diferenciavam-se entre si e dependendo do grupo apresentavam características distintas, além de serem resistentes a doenças, pragas, pisoteio animal, devido à região do meristema apical encontrar-se escondida no solo que a protege contra o pisoteio facilitando seu restabelecimento (LEITE; MACHADO, 1999).

A partir do interesse para forragicultura, diversas cultivares foram desenvolvidas na Universidade da Geórgia e na Universidade da Flórida nos EUA. As plantas melhoradas deste gênero apresentam tolerância à diversidade de pH e alterações climáticas (HILL; GATES; WEST, 2001), e com correções do solo tem estabelecimento vigoroso (LEITE; MACHADO, 1999).

Seghese (2009), refere-se às cultivares Coastal, Coastcross1, Coastcross 2, Tifton 44, Tifton 68, Tifton 78 de *Cynodon dactylon* como as de maior destaque para o grupo de grama bermuda, sendo essas mais cultivadas nos EUA. Para as do grupo estrela pertencentes à espécie

Cynodon nlemfuensis, as cultivares Florona, Florico e Estrela Roxa são as mais destacadas. A Estrela Roxa é a mais cultivada no Brasil, pois apresenta resistência à pragas, adaptação à diferentes ambientes e também pela aceitação dos animais sob pastejo.

De acordo por Beard (1973), citado por Wu e Taliaferro, (2009), plantas de *Cynodon* são utilizadas em jardinagem e cobertura de gramados, nos mais diversos locais, como, campos de golfe, campos esportivos, beira de estradas e até mesmo em cemitérios. Essas plantas são bastante difundidas por possuírem diversas características de interesse, variando de formas pequenas a mais robustas e por suas raízes funcionarem como filtros para absorção de nutrientes do solo, atuando também na eliminação de alguns resíduos (TALIAFERRO; ROUQUETTE-JR; MISLEVY, 2004). As gramas bermudas, são utilizadas na estabilização de solos, uma vez que são tolerantes tanto a seca quanto inundações e também por possuírem alta capacidade de estabelecimento em campo, elas fornecem proteção contra água, vento e erosão, além de serem perenes, espalharem-se rapidamente e possuírem poucas pragas e insetos prejudiciais (WU e TALIAFERRO, 2009). Os autores mencionaram que as gramas bermuda são mais adequadas para controle de erosão, pois crescem inclusive em áreas degradadas, conforme já havia sido reportado por Tracy (1917) que de a gramas bermuda, eram a melhor encontrada para se controlar a erosão do solo.

2.2 Aspectos citogenéticos de *Cynodon* spp.

Os aspectos citogenéticos podem ser de inestimável importância para auxiliar na identificação, classificação e conservação das espécies (GUERRA, 1988; AULER; BATTISTIN; REIS, 2006). Estudos envolvendo o gênero *Cynodon* são insuficientes, restringindo-se a informações sobre contagens cromossômicas por meio de citogenética convencional. Nesse sentido, além das divergências quanto ao número de espécies, pesquisas mostram também controvérsias para o número cromossômico (variando de 16 a 54) e o nível de ploidia das plantas do gênero *Cynodon*, variando de diploides a hexaploides (TALIAFERRO; ROUQUETTE-JR; MISLEVY, 2004; AKSHITA; DHALIWAL; GUPTA, 2011).

Conforme relatos de Avdulow (1931) o número básico cromossômico seria $x=9$, porém Hunter (1934) sugeriu que o número básico cromossômico seria $x=10$. Forbes e Burton (1963) ao analisarem 35 acessos de *Cynodon*, confirmaram o número básico $x=9$, afirmando que a proposta de número $x=10$, provavelmente seria devido à contagem equivocada de satélites desprendidos como cromossomos inteiros. No trabalho realizado por Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), foi relatado número básico cromossômico $x=8$, sendo um número inédito para o gênero.

Gupta e Srivastava (1970) relataram a ocorrência natural de triploidia com número $2n=3x=27$ em *Cynodon dactylon* presumindo que poderia vir de um cruzamento entre uma espécie diploide $2n=18$ e uma tetraploide $2n=36$.

Segundo Wu e colaboradores (2006), em função da auto-incompatibilidade, ocorrem polinizações cruzadas entre as plantas de mesma espécie, o que resulta em fluxo gênico, colaborando para formação de espécies com diferentes ploidias, no entanto casos de hexaploidia ou pentaploidia são raros. De acordo com os resultados obtidos por Harlan, De Wet e Richardson (1969) em um estudo de hibridação, podem ocorrer cruzamentos interespecíficos entre diferentes táxons de *Cynodon*. Esses autores observaram que a maioria das espécies (*C. aethiopicus*, *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*, *C. nlemfuensis* var. *robustus*, *C. dactylon* var. *aridus*, *C. dactylon* var. *coursii* e *C. dactylon* var. *dactylon*) apresenta facilidade de se hibridar, difundindo a ideia de que as mesmas compartilham de um mesmo genoma, porém os híbridos constituíram-se estéreis.

No que se refere a quantidade de DNA, em análises de citometria de fluxo realizadas por Wu e colaboradores (2006), em 132 acessos de *Cynodon* provenientes da China e ainda quatro acessos comerciais, variando de plantas triploides a hexaploides, observaram que a quantidade de DNA difere entre as ploidias e entre as plantas com número igual de cromossomos, onde a quantidade de DNA variou entre 1.55pg/2C nos acessos triploides e 3.15 pg/2C nos acessos hexaploides.

Em relação à meiose, Gupta e Srivastava (1970) avaliaram acessos diploides e triploides de *Cynodon* e observaram que nos diploides, a meiose foi normal, com formação de nove bivalentes durante a diacinese e na metáfase I. Nos acessos triploides foram observados bivalentes e trivalentes na metáfase I e nos casos em que foram observados cromossomos atrasados na anáfase I, estes, posteriormente, foram incluídos ao núcleo.

Posteriormente, Brilman, Kneebone e Endrizzi (1982) avaliaram a meiose de clones diploides entre *C. dactylon* var. *aridus* e *C. dactylon* var. *afghanicus* x var. *aridus* e observaram paquítenos com cromômeros e “*knobs*” proeminentes.

Em uma pesquisa um pouco mais recente de Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), em que também foram utilizados acessos diploides ($n=8$ e $n=9$) e tetraploides ($n=18$) de *Cynodon dactylon*, constatou-se oito bivalentes durante a diacinese nos diploides e os demais estágios permaneceram normais. O tetraploide ($2n=4x=36$) apresentou meiose anormal devido à presença de cromossomos atrasados (12,4%) e também pontes nas anáfases (7,7%).

2.3 Estudos sobre o grão de pólen

O grão de pólen é o microgametófito que permanece armazenado nas anteras até o amadurecimento, possui morfologia diferenciada e pode ser classificado de acordo com a abertura, por onde o tubo polínico emerge (JUDD et al, 2009).

Segundo Ferguson (1985), parte do genoma é expresso através do grão de pólen, sendo utilizado em estudos com diversas finalidades como taxonomia, sistemática e evolução. Ao estudar grãos de pólen fossilizados é possível, por exemplo, observar a sua evolução ao longo do tempo. Observações quanto à forma, tamanho e espessura da parede do grão de pólen podem ser caracteres auxiliares para estudos taxonômicos. Os objetivos destes estudos agregam interesse em explorar a biologia das espécies, sobretudo as de importância comercial e também o lado conservacionista.

Perveen (2006) avaliou a morfologia do grão de pólen de 20 espécies de gramíneas, utilizando microscópio de luz e de varredura, onde verificou, de forma geral, que os grãos possuem tamanho médio 18,7- 72 μm de diâmetro, esferoidais, mono-aperturado e raramente tricolpado e geralmente apresentam exina mais espessa que a nexina. Além da classificação, de modo geral, o pesquisador subdividiu as espécies em grupos baseando-se no tamanho dos grãos. Uma das espécies avaliadas foi *Cynodon radiatus* que foi agrupada no grupo tipo II, em que o tamanho do grão de pólen está entre 13,3 e 50,99 μm de diâmetro, classificando-os como esferoidais, operculados e não operculados, com anel reduzido, exina espessa (0,84-4,11 μm).

Estudos de fertilidade do pólen são um importante aliado do melhoramento genético, uma vez que tendo informações quanto à viabilidade do pólen podem auxiliar na seleção de espécies candidatas a cruzamentos (TECHIO et al, 2006). Segundo Shivanna e Rangaswamy (1992) a viabilidade do grão de pólen pode ser influenciada por diferentes condições, como o período de floração, abertura da antera, nutrição da planta e armazenagem do material coletado, ocorrendo assim diversas variações na resposta do pólen, entre espécies e até mesmo entre o mesmo genótipo.

Para estudos de viabilidade polínica há uma diversidade de técnicas que podem ser utilizadas, tais como testes *in vivo* ou *in vitro* (TECHIO et al., 2006; SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992). Para Shivanna e Rangaswamy (1992), quando empregada a técnica de germinação *in vivo* devem ser aplicados testes primários, visando informações das condições apropriadas para a eficácia da técnica, por se tratar de um procedimento de polinização controlada que necessita que o estigma esteja receptivo para a introdução do pólen. Por outro lado, a germinação *in vitro* permite a reprodução das condições naturais em meio de cultura,

induzindo a germinação do tubo polínico, sendo que as condições de temperatura e teor de água influenciam nesse tipo de teste (FERREIRA et al., 2007). Observações a partir de teste de germinação *in vitro*, permitem verificar o tamanho do tubo polínico sendo. Quando o tamanho do tubo polínico é maior que o diâmetro do grão de pólen, considera-se que germinou, ou seja, é viável, quando o comprimento do tubo é menor ou inexistente é considerado inviável (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992).

Ao serem empregados os testes de viabilidade por meio de coloração, a determinação de grãos de pólen viáveis e inviáveis depende do tipo e concentração do corante, além de outros detalhes como espessura da parede do grão de pólen e a presença ou não de espículas. Esses detalhes na morfologia refletem na penetração do corante e na eficácia da técnica em determinar a viabilidade. A exemplo disso, o corante de Alexander, a base de verde malaquita e fucsina ácida, permite corar diferencialmente os grãos abortados e não abortados, facilitando a identificação e prevenindo classificação equivocada (ALEXANDER, 1980). Outros fatores como temperatura, umidade e idade do grão de pólen podem afetar a fertilidade do grão e conforme a espécie permanecendo viáveis por horas e até mesmo por anos (JUDD et al., 2009).

Peculiaridades na estrutura do grão de pólen como número de aberturas e tamanho conferem mais chances de propagação, além de anexos que permitem fixação ao corpo de insetos polinizadores, dispersão por anemofilia, hidrofília, estruturas essas que resultam de adaptação ao longo do tempo (KNOX, 1984). Análises realizadas com microscopia eletrônica podem contribuir para o conhecimento da morfologia do pólen. Nunes et al (2012) avaliaram a ultraestrutura do grão de pólen em acessos de *Lolium* e observaram através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), características relacionadas a ornamentação da exina e o número de aberturas no grão de pólen. Segundo esses autores, quando há um maior número de aberturas, pode haver maior sucesso na emergência do tubo polínico e, conseqüentemente, aumentar as chances de fertilização da oosfera. Além desta informação prática, o número de aberturas do grão de pólen pode também ser usado para importantes inferências evolutivas, pois, conforme Miranda e Andrade (1990), grão de pólen com apenas uma abertura são mais primitivos do que aqueles com três aberturas. Uma técnica também aliada aos estudos do grão de pólen tradicionais, é a acetólise que trata de destruir toda as substâncias não esporopolenina (HESSE E WAHA, 1989).

Para *Cynodon*, há poucos estudos encontrados na literatura, elucidando a viabilidade polínica, sendo estes em sua maioria complemento de estudos de meiose que também são raros e quanto à ultraestrutura do grão de pólen não foram encontradas descrições. Gupta e Srivastava (1970) avaliaram espécies diploides ($2n=2x=18$) e triploides ($2n=3x=27$) de *Cynodon dactylon*

e relataram que a fertilidade do grão de pólen foi maior em espécies diploides (93,6%) do que em triploides (73,6%). No trabalho de Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), também foi observado uma taxa de viabilidade inferior em acessos tetraploides (27,9%) em relação aos diploides (63,7%).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As análises de microscopia eletrônica foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFLA.

3.2 Material vegetal

As técnicas para avaliação da meiose, viabilidade e ultraestrutura do grão de pólen foram aplicadas em quatro acessos de *Cynodon* (TABELA 1), cedidos pela da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG.

Tabela 1 – Acessos utilizados, apresentando espécie e ploidias.

Acesso	Código	Espécie	Número cromossômico*
PI 224141-29	EGL 9	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	2n=4x=36
PI 29117102 PL 18	EGL 10	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i>	2n=4x=36
**	ERX 7	<i>Cynodon nlemfuensis</i> var. <i>nlemfuensis</i>	2n=2x=18
**	ERX 21	<i>Cynodon nlemfuensis</i> var. <i>nlemfuensis</i>	2n=2x=18

*CHIAVEGATTO et al., 2016. **Acessos oriundos de programa de melhoramento, desenvolvido pela Embrapa Gado de Leite.

Fonte: Do Autor (2017).

3.3 Avaliação da meiose e viabilidade do grão de pólen

As espiguetas jovens para análise da meiose e maduras para análise da viabilidade de pólen, foram coletadas e fixadas em: álcool etílico: ácido acético: ácido propiônico (6:3:2)

armazenados em microtubos a -4°C . As espiguetas foram mensuradas com auxílio de um paquímetro.

Para análise meiótica, as espiguetas foram excisadas, sob microscópio estereoscópio, para extração das anteras, as quais foram cortadas e maceradas sobre a lâmina com uma gota de ácido acético 45%. Posteriormente, as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (GUERRA; SOUSA, 2002) e coradas com Carmim propiônico 2%.

Para viabilidade de pólen, o procedimento foi similar ao da meiose, mas utilizaram-se dois corantes: Carmim propiônico 2% e Alexander 2% (ALEXANDER, 1980). Foram avaliados 200 grãos de pólen/lâmina e 5 lâminas por corante. Para a coloração com Alexander foram considerados viáveis os grãos corados de roxo e inviáveis os grãos fracamente corados na cor verde. Para a coloração com Carmim propiônico, os grãos de pólen que apresentaram citoplasma corado fortemente de vermelho foram considerados viáveis e os incolores, inviáveis.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Carl Zeiss, AxioLabA1), equipado com microcâmera (AxioCam ICc1), para captura das imagens. Foi aplicado teste estatístico Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003) nas análises de viabilidade polínica.

3.4 Avaliação do grão de pólen por meio da técnica de acetólise

A técnica empregada seguiu as recomendações de Erdtman (1960), modificado por Melhem et al. (2003). As espiguetas coletadas foram maceradas com auxílio de agulha em microtubo contendo ácido acético 45% e centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e substituído por água destilada e novamente centrifugado por 10 min à mesma velocidade, e descartado ao final. Foi acrescentada solução acetolítica 1mL (1 ácido sulfúrico: 9 anidrido acético puro) e colocado em banho-maria à 87°C por dois minutos. O material foi então novamente centrifugado, por duas vezes, retirando o sobrenadante após cada centrifugação. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi substituído por água glicerinada 50%. O material foi armazenado em microtubo a 10°C por 24h até o momento de preparo da lâmina.

A água glicerinada foi descartada e o material colocado em lâminas com porções de gelatina glicerinada (100 mL de água destilada, 100 mL de glicerina, 17 g de gelatina incolor e 1 g de fenol) submetidos a aquecimento em chapa aquecedora, coberto com lamínulas, vedadas para observação.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Carl Zeiss, AxioLabA1), equipado com microcâmera (AxioCam ICc1), para captura das imagens. Para cada acesso, foram avaliadas cinco lâminas e as medidas do eixo polar (P), eixo equatorial (E) e espessura da exina foram realizadas em dez grãos de pólen por lâmina através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.). Os grãos de pólen foram classificados de acordo com Erdtman (1943) Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste Scott -Knott ($p < 0,05$) utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

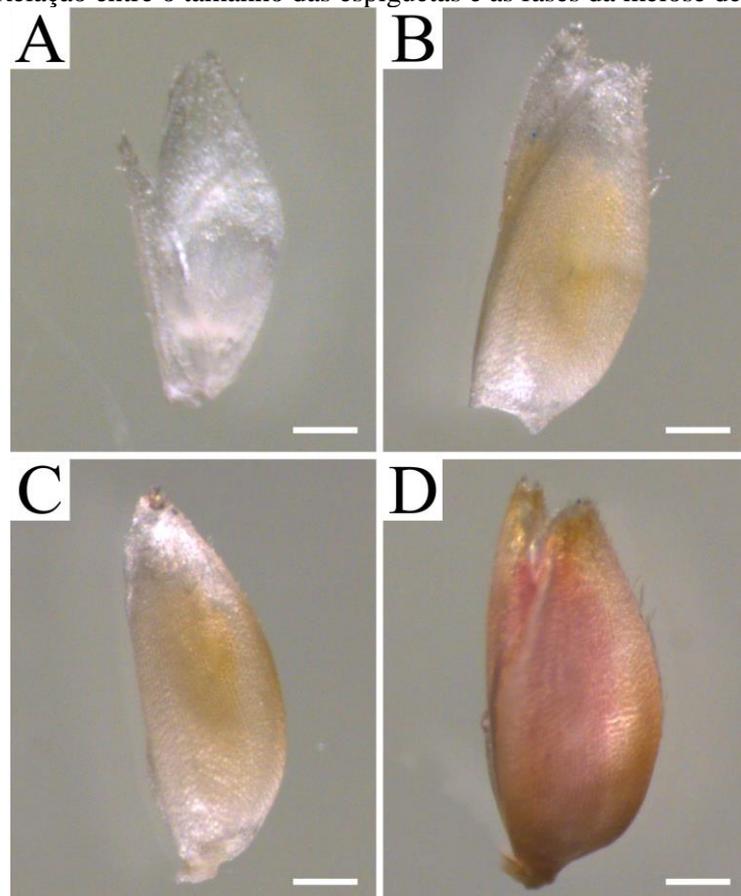
3.5 Análise de ultraestrutura do grão de pólen por meio de microscopia eletrônica de varredura

Para observação da superfície do grão de pólen, amostras foram fixadas em solução Karnovsky, até o momento das análises. As amostras passaram por lavagens em tampão cacodilato a 0,05M (3 vezes - 10 minutos cada) e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, durante 4 horas, à temperatura ambiente. Então submetidas a desidratação em acetona em uma série progressiva (25%, 50%, 75%, 90% e 100% - 3 vezes por 10 minutos), submetidas ao ponto crítico de dessecação de CO₂ em equipamento BAL-TEC, CPD-030, fixadas em suporte metálico com cola de prata e recobertas com ouro metálico (10 nm) em aparelho BAL-TEC, SCD-050. O material das anteras preparado foi observado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO 40, XVP. Os grãos de pólen foram classificados de acordo com o número de aberturas (ERDTMAN, 1943).

4 RESULTADOS

A análise da meiose requer inicialmente a definição dos horários de coleta dos botões florais e definição do tamanho e morfologia que sejam ideais para obtenção dos meiócitos em diferentes estágios. Para os acessos de *Cynodon* analisados, não houve diferença quanto ao horário de coleta realizada entre 9 e 16 horas, com temperaturas variando entre 25 e 35° C. Quanto à escolha da espiguetas (FIGURA 1), observou-se um gradiente relacionado ao tamanho, morfologia e coloração, pois nas menores, com cerca de 1 mm, e que apresentavam coloração mais clara foram encontrados os estágios iniciais da prófase I (FIGURA 1A); nas espiguetas de tamanhos intermediários, entre 1,5 e 2 mm, encontravam-se os estágios entre metáfase I à metáfase II (FIGURAS 1B) e as maiores com 2,5 mm a 3mm e mais escuras apresentavam meiócitos entre os estágios de anáfase II até a tétrade (FIGURA 1C) e grãos de pólen, respectivamente (FIGURA 1D).

Figura 1 – Relação entre o tamanho das espiguetas e as fases da meiose de *Cynodon* sp.



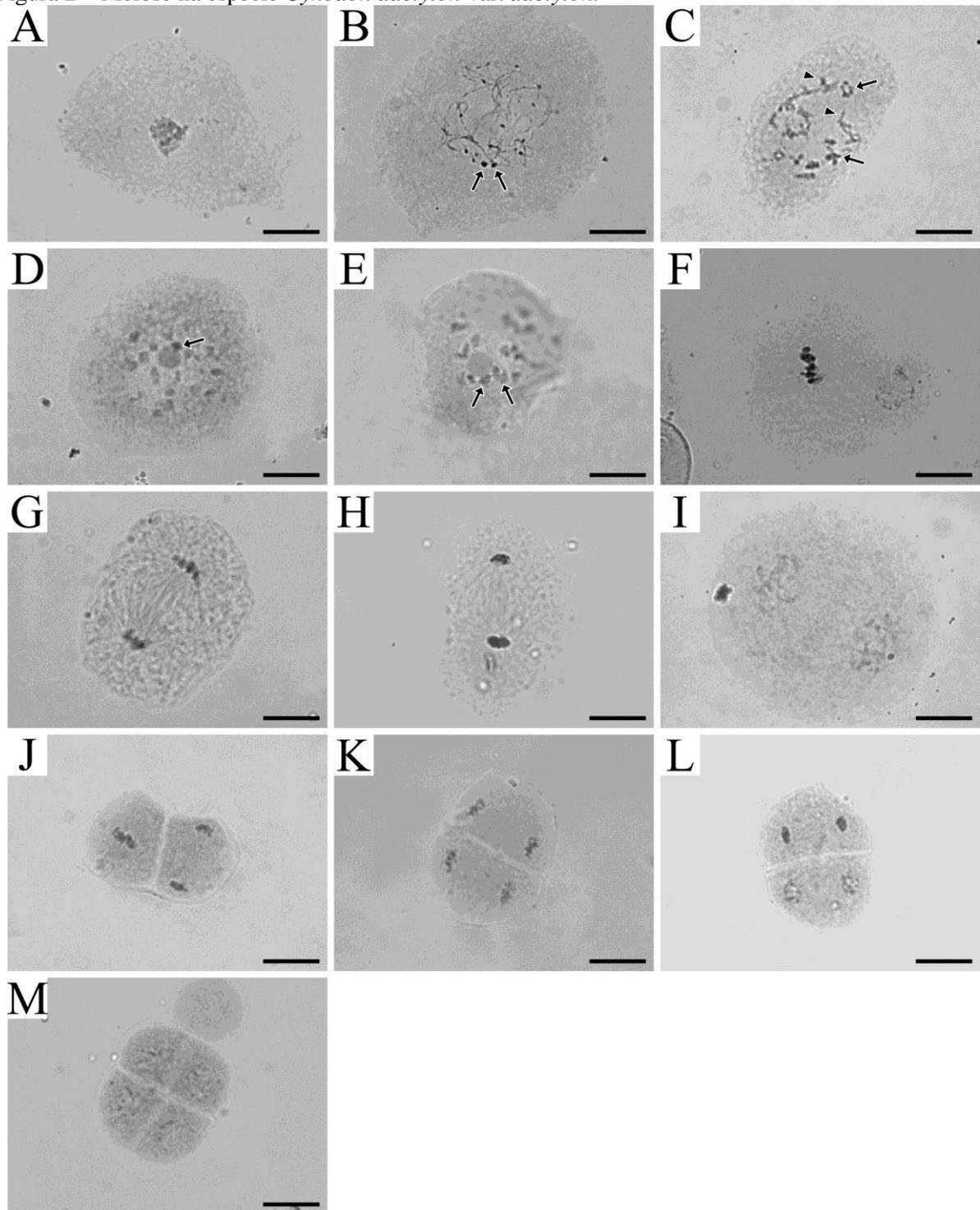
Legenda: Nas espiguetas com (A) 1 mm encontravam-se estágios de prófase I; (B) 1,5 a 2 mm, de metáfase I até metáfase II; (C) 2,5 a 3 mm: anáfase II até a tétrade; (D) >3 mm: grão de Pólen. (Barra= 500 μ m)

Fonte: Do Autor (2017).

Para ambos acessos de *C. dactylon* var. *dactylon* (EGL 9 e EGL 10) foi confirmada a tetraploidia ($2n=4x=36$), com diacineses e metáfases I apresentando configurações univalentes, bivalentes e tetravalentes (FIGURA 2C), sendo um bivalente ligado ao nucléolo e raramente dois ou três (FIGURA 2D-E). Para *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* foram identificados, invariavelmente, 9 bivalentes em diacineses e metáfases I (FIGURA 3C-D), confirmando a diploidia ($2n=2x=18$), com um bivalente ligado ao nucléolo (FIGURA 3C) e, em menor frequência, dois e três bivalentes ligados.

No acesso EGL 10 de *C. dactylon* var. *dactylon* foram observados dois *knobs* terminais e 12 cromômeros em cromossomos paquitênicos (FIGURA 2B), sendo isso observado também nos outros acessos (EGL9, ERX7 e ERX 21). No entanto, o acesso ERX 21 de *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* apresentou uma variação no número de cromômeros entre 10 e 16, sendo mais frequente 12 cromômeros (FIGURA 3B).

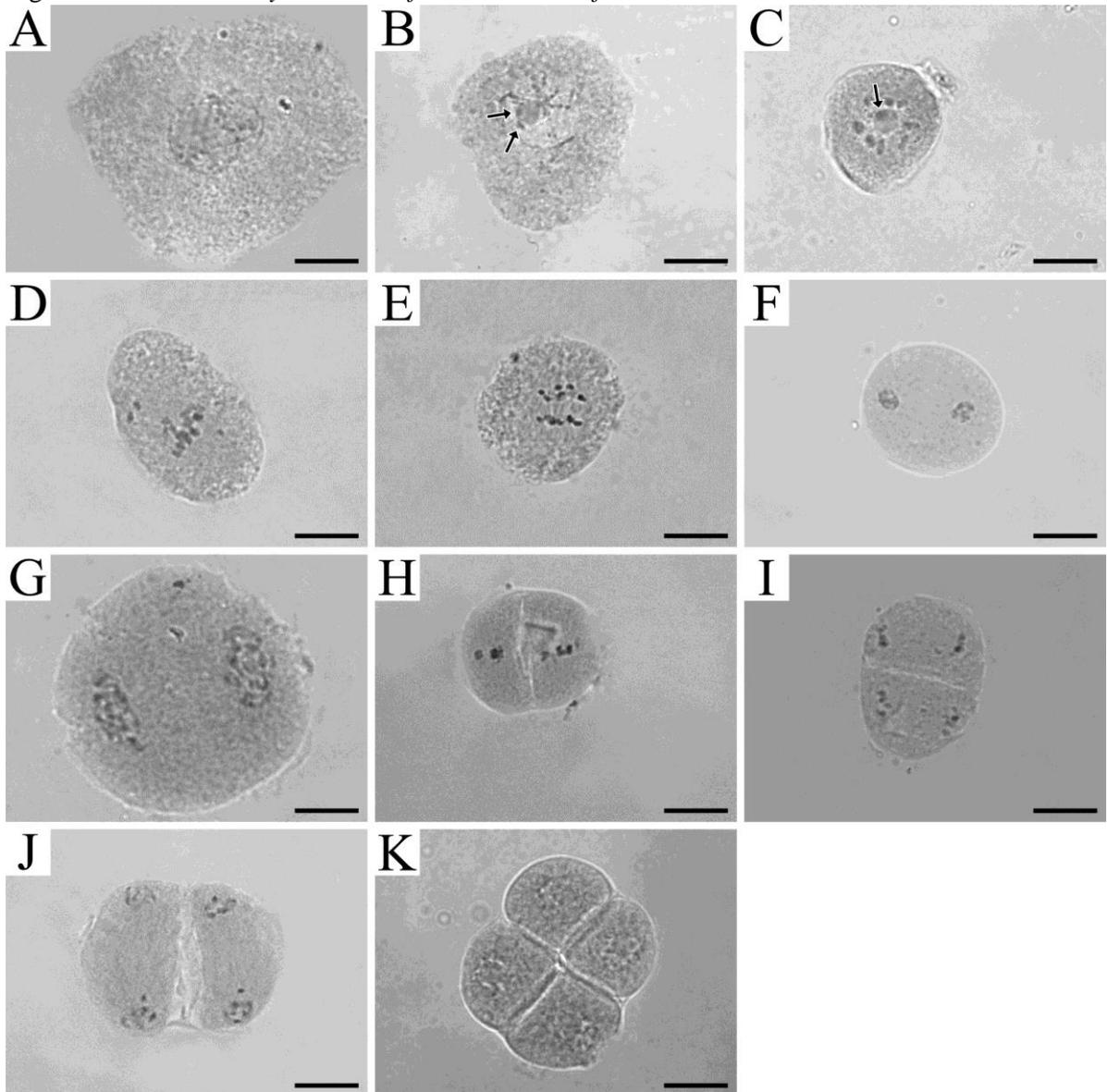
Figura 2 – Meiose na espécie *Cynodon dactylon* var. *dactylon*.



Legenda: (A) Leptóteno, (B) Paquíteno, setas indicam *knobs* terminais (C) Diplóteno/Diacinese, seta: indica configuração tetraivalente, ponta de seta: configuração univalente, (D-E) Diplóteno/Diacinese, seta indica bivalente ligado ao nucléolo, (F) Metáfase I, (G) Anáfase I, (H) Telófase I, (I) Prófase II, (J) Metáfase II com núcleos assincrônicos, (K) Anáfase II, (L) Telófase II com núcleos assincrônicos, (M) Tétrade. (Barra 10 μ m)

Fonte: Do Autor (2017).

Figura 3 – Meiose em *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis*.



Legenda: (A) Leptóteno, (B) Paquíteno, seta indica *knobs* terminais, (C) Diacinese, seta indica bivalente ligado ao nucléolo, (D) Metáfase I com cromossomos não orientados, (E) Anáfase I, (F) Telófase I, (G) Prófase II, (H) Metáfase II, (I) Anáfase II, (J) Telófase II com micronúcleo, (K) Tétrade. (Barra 10 μ m) Fonte: Do Autor (2017).

De modo geral, a meiose dos quatro acessos/espécies avaliados foi regular. O acesso com maior taxa de anormalidades (1,38%) foi ERX 7 (*Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis*) e a menor (0,2%) foi observada em EGL 10 (*Cynodon dactylon* var. *dactylon*) (TABELA 2). Apesar da ocorrência de configuração univalentes e tetravalentes em *C. dactylon* var. *dactylon*, as demais subfases da Prófase I não apresentaram irregularidade. Nas metáfases II e nas anáfases II foram quantificados 7,7 e 1% de núcleos assíncronicos, (FIGURA 2J), assim como cromossomos/cromátides atrasados na telófase II em uma frequência de cerca de 6,2%

(TABELA 2). Contudo, nas tétrades os núcleos mostraram-se completamente normais em ambos acessos.

Os acessos de *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* (ERX 7 e ERX 21), apresentaram a prófase I normal (FIGURA 3A-C). O maior índice de irregularidades foi observado a partir da metáfase I onde foram encontrados cromossomos não orientados (9,4% para o ERX 7 e 0,8% para o ERX 21). Além disso, foram observados cromossomos/cromátides atrasados em telófase I e II em uma frequência de 6 e 4,6% para o acesso ERX 7, respectivamente. O acesso ERX 21 apresentou essa anormalidade somente na telófase I, em uma frequência muito baixa (inferior a 1%). Todas as tétrades avaliadas estavam normais em ambos acessos.

Tabela 2 – Número de meiócitos analisados e porcentagem de meiócitos anormais (entre parênteses) em acessos de *Cynodon* sp.

Fase Meiose	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i> (EGL 9)	<i>Cynodon dactylon</i> var. <i>dactylon</i> (EGL 10)	<i>Cynodon nlemfuensis</i> var. <i>nlemfuensis</i> (ERX 7)	<i>Cynodon nlemfuensis</i> var. <i>nlemfuensis</i> (ERX 21)
PI	537 (0%)	647 (0%)	483 (0%)	308 (0%)
MI	91 (0%)	290 (0%)	96 (9,4%)	254 (0,8%)
AI	44 (0%)	47 (0%)	15 (0%)	38 (0%)
TI	49 (0%)	68 (0%)	50 (6%)	165 (0,6%)
PII	45 (0%)	105 (0%)	105 (0%)	161 (0%)
MII	39 (7,7%)	67 (0%)	82 (0%)	62 (0%)
AII	10 (1%)	3 (100%)	35 (0%)	40 (0%)
TII	32 (6,2%)	21 (0%)	43 (4,6%)	55 (0%)
TET	32 (0%)	99 (0%)	176 (0%)	69 (0%)
Total	879 (0,68%)	1.347 (0,2%)	1.085 (1,38%)	1.152 (0,26%)

Legenda: PI (Leptóteno/Zigóteno, Paquíteno, Diplóteno/Diacinese), MI (Metáfase I), AI (Anáfase I), TI (Telófase I), PII (Prófase II), MII (Metáfase II), AII (Anáfase II), TII (Telófase II), TET (Tétrade).

Fonte: Do Autor (2017).

Os testes colorimétricos mostraram que os acessos de *C. dactylon* var. *dactylon* apresentaram taxas de viabilidade de pólen superiores a 75%. Em *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*, a maior porcentagem (56,02%) foi obtida para o acesso ERX7 com o corante carmim propiônico 2%. (TABELA 3, FIGURA 4A-B)

A taxa estimada com ambos corantes para *C. dactylon* var. *dactylon* mostrou que não há diferenças significativas ($p > 0,05$) para a viabilidade do grão de pólen entre os acessos EGL 9 e EGL 10. Essa mesma observação foi confirmada ao analisar cada acesso na comparação entre os corantes (TABELA 3). Para *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*, a taxa de viabilidade estimada com o corante carmim propiônico mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os

acessos ERX 7 e ERX 21. Como o corante de Alexander, as estimativas não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) para os dois acessos (TABELA 3, FIGURA 4C-D).

A análise dentro de cada acesso na comparação entre os corantes mostrou que somente para o ERX 7 houve diferenças significativas ($p<0,05$) para a viabilidade polínica determinada por ambos corantes. Além disso, nos quatro acessos foram observados, em baixa frequência, grãos de pólen de tamanhos diferentes, viáveis, sendo que os maiores apresentaram, em média, 28,8 μm e os menores, 21,1 μm (FIGURA 4B e 4D).

Tabela 3 – Porcentagem dos grãos de pólen viáveis de *Cynodon dactylon* var. *dactylon* (EGL 9 e EGL 10) e *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* (ERX 7 e ERX 21), usando os testes colorimétricos com os corantes de Alexander e carmin propiônico 2%.

Corante	Viáveis (%)			
	(EGL 9)	(EGL 10)	(ERX 7)	(ERX 21)
Carmin propiônico 2%	87,38 Aa	94,94 Aa	56,02 Ab	18,52 Ac
Alexander	75,81 Aa	88,07 Aa	18,41 Bb	24,08 Ab

Letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente ($p>0,05$) pelo teste de Scott Knott, letras maiúsculas comparam corantes e letras minúsculas comparam espécies.

Fonte: Do Autor (2017).

As observações dos grãos de pólen obtidas a partir da técnica de acetólise evidenciaram que não há diferença estatística ($p>0,05$) para a razão entre eixo polar e equatorial (TABELA 4) entre os acessos, contudo os eixos polares dos grãos de pólen do acesso ERX 21 foram estatisticamente diferentes do ERX 7, ambos *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* e dos dois acessos de *Cynodon dactylon* var. *dactylon*. Quanto à espessura da exina, ectoexina e endoexina, os valores observados para os acessos EGL 10 (*C. dactylon* var. *dactylon*) e ERX 7 (*C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*) foram estatisticamente iguais ($p>0,05$), assim como entre os acessos EGL 9 (*C. dactylon* var. *dactylon*) e ERX 21 (*C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*) (FIGURA 4).

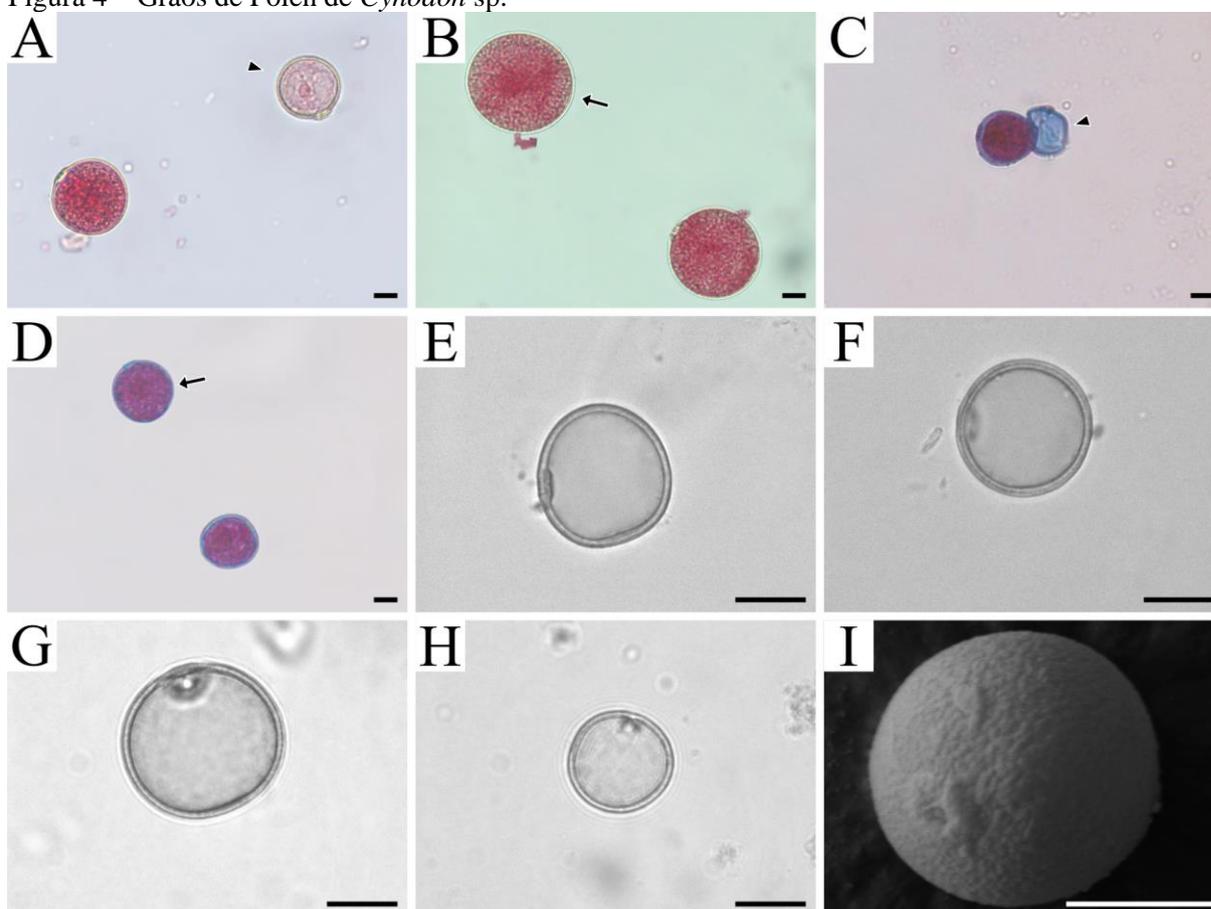
Tabela 4 – Valores médios (μm) das características do grão de pólen de *Cynodon dactylon* var. *dactylon* (EGL 9 e EGL 10) e *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* (ERX 7 e ERX 21).

Acesso	Endoexina	Ectoexina	Exina	Eixo Polar	Razão P/E
EGL 9	0,411 b	0,436 b	0,847 b	19,149 b	1,006 a
EGL 10	0,489 a	0,483 a	0,972 a	19,543 b	1,012 a
ERX 7	0,512 a	0,520 a	1,032 a	22,676 a	0,990 a
ERX 21	0,425 b	0,422 b	0,847 b	16,264 c	1,001 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) pelo teste de Scott Knott.

Fonte: Do Autor (2017).

Figura 4 – Grãos de Pólen de *Cynodon* sp.



Legenda: (A-B) Grão de Pólen corado com corante Carmim propiônico 2%, ponta de seta indica grão de pólen inviável, seta indica grão de pólen de tamanho diferente, (C) Grão de Pólen corado com corante de Alexander, ponta de seta, indica grão de pólen inviável, seta indica grão de pólen de tamanho diferente, (E-F) Morfologia dos grãos de pólen obtida pela técnica de acetólise, acessos EGL 9 e EGL 10 (*C. dactylon* var. *dactylon*), (G-H) Morfologia dos Grãos de pólen obtida pela técnica de acetólise, acessos ERX 7 e ERX 21 (*C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*), (I) Morfologia do Grão de pólen obtida em Microscopia Eletrônica de Varredura (Barra 10 μm)

Fonte: Do Autor (2017).

Os grãos de pólen dos acessos/espécies de *Cynodon* avaliados foram morfológicamente idênticos e apresentaram apenas uma abertura, sendo, portanto, classificados como monocolpados e não apresentaram ornamentações como espículas e outros anexos com exina não rugosa, microreticulada (Figura 4I).

5 DISCUSSÃO

Os dados obtidos em relação ao tamanho e cor das espiguetas, auxiliaram na escolha dessas para as análises meióticas e de viabilidade polínica e poderão subsidiar estudos futuros com espécies do gênero. Estas informações são importantes, pois de acordo com Wu e Taliaferro (2009), os estudos sobre o pareamento e o comportamento meiótico de *Cynodon*, sobretudo dos tetraploides e híbridos, são limitados e, provavelmente, um dos motivos é o tamanho reduzido das inflorescências e a dificuldade para a definição dos estágios de coleta.

A ocorrência de univalentes, bivalentes e tetravalentes nos acessos tetraploides de *C. dactylon* já havia sido descrita por Forbes e Burton (1963); Malik e Tripathi (1968), ambos citados por Wu e Taliaferro (2009) e, ainda, por Hanna e Burton (1977).

Para que ocorra a segregação cromossômica normal, o ideal é que ocorra a formação de bivalentes, pois, de acordo com Obeso, Pezza, e Dawson, (2014), eles contribuem para que ocorra o atachamento bipolar dos centrômeros homólogos e o posterior posicionamento dos cromossomos na placa equatorial da célula, eventos que contribuem para assegurar a regularidade da segregação.

O comportamento clássico dos univalentes é apresentar orientação e segregação irregular observadas sob a forma de cromossomos com ascensão precoce ou retardatários durante as metáfases I e anáfases I, como observado nos resultados desse estudo. Estes univalentes podem se manter nas fases posteriores podendo gerar micronúcleos (PAGLIARINI, 2000). Nas espécies em que ocorre segregação irregular observa-se a correlação entre esta característica e a fertilidade do pólen e a produção de sementes (PAGLIARINI, 2000). Cromossomos em configurações trivalentes e tetravalentes também se caracterizam por apresentarem segregação irregular e resultarem em gametas com número cromossômico não balanceado. Os trivalentes podem segregar II + I ou como III. Os tetravalentes podem segregar como II + II ou como IV. A segregação como II + II é desejável porque pode resultar em gametas balanceados (SYBENGA, 1992).

As falhas no pareamento podem ocorrer devido à alterações cromossômicas numéricas ou estruturais ou ainda devido à combinações híbridas. Neste último caso, o pareamento é dependente do grau de afinidade entre os cromossomos/genomas das espécies parentais envolvidas nos cruzamentos (APPELS et al 1998; SINGH, 2003). Quando os bivalentes estão parcialmente pareados (pareamento homeólogo) é dito que possuem menor afinidade cromossômica, e quanto maior o número de univalentes, menor a afinidade (TECHIO e DAVIDE, 2007).

C. dactylon é reconhecido como alotetraploide (ZHI-YUN et al., 2013), sendo assim, é de se esperar que ocorra em sua meiose a formação de configurações em univalentes e multivalentes, mas com predominância de bivalentes, como observado nas análises realizadas nesse estudo. Essas observações mostram que há uma homologia parcial entre os cromossomos, característica de um aloploiploide segmental. Harlan (1970) e Harlan e De Wet (1969) sugeriram que *C. dactylon* var. *dactylon* (diploide) tenha se originado provavelmente do cruzamento dos parentais diploides *C. dactylon* var. *aridus* e *C. dactylon* var. *afghanicus*. Entretanto, mais recentemente, Wu (2011) sugeriram que a raça tropical da variedade *dactylon* tetraploide provem da fusão de gametas não reduzidos do diploide *C. dactylon* var. *aridus*.

A variação de um a três bivalentes nucleolares não havia sido descrita em *C. dactylon* var. *dactylon* nos trabalhos anteriores. Na análise da morfologia dos cromossomos paquitênicos de plantas diploides de *C. dactylon*, Brilman, Kneebone e Endrizzi (1982) citaram a presença da região organizadora do nucléolo (RON) no par cromossômico 4. Na diacinese do citótipo diploide de *C. dactylon* apresentado por Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), também se observa um bivalente nucleolar. Normalmente, é de se esperar que os tetraploides, tal como avaliado nesse estudo, apresentem mais do que uma RON. Em cromossomos mitóticos, Zhi-Yun et al (2013) foram descritos três e quatro sinais de rDNA 45S em duas linhagens tetraploides de *Cynodon* e em observações feitas por Chiavegatto et al. (dados não publicados) em dois acessos de *C. dactylon* var. *dactylon* foram observados, invariavelmente, quatro sítios de rDNA 45S.

O número variável de bivalentes nucleolares pode indicar locus extras de rDNA 45S nos acessos avaliados nesse estudo. Variações intraespecíficas e intravarietais para esse marcador já foram descritas em outras gramíneas, tais como *Setaria sphacelata* (NANI et al., 2015), *Lolium multiflorum* (BUSTAMANTE et al., 2014), *Lolium perenne* (KŚIAŹCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010), e em *Brachiaria brizantha* (NANI et al., 2016).

As anormalidades verificadas nas análises de meiose nos acessos de *Cynodon dactylon* var. *dactylon* e *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* foram inferiores a 2%, neste caso pode-se inferir que todas posteriormente foram reparadas, pois não foram observados micronúcleos nas tétrades. Nos acessos de *C. dactylon* var. *dactylon* (EGL 9 e EGL 10), a maior frequência de anormalidades ocorreu na meiose II, sobretudo na metáfase II do acesso EGL9 e anáfase II do EGL 10. Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), nas avaliações com citótipos tetraploides de *C. dactylon*, observaram maior índice de anormalidades na meiose I, apresentando cromossomos atrasados em anáfase I (9,8 a 20,3%) e pontes em telófase I (4,8 a 9,5%).

Os acessos diploides (*C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* – ERX 7 e ERX 21), apresentaram maior taxa de anormalidade nas fases de meiose I, sobretudo na metáfase I e telófase I. As

anormalidades observadas somente em telófase II de ERX 7 não se mantiveram nas tétrades, indicando que os cromossomos/cromátides com segregação irregular foram incorporadas aos núcleos.

A presença de cromômeros e *knobs* nos cromossomos paquitênicos já havia sido descrita por Brillman, Kneebone e Endrizzi (1982) em clones diploides de *C. dactylon*, onde observaram *knobs* terminais em quase todos os cromossomos, diferente do que foi visto neste trabalho, onde observou-se apenas dois *knobs* terminais.

Knobs e cromômeros são regiões de heterocromatina constitutiva, altamente condensadas e observadas em cromossomos paquitênicos (SUMNER, 2003; SCHULZ-SCHAEFFER, 1980). A fusão de um ou mais cromômeros pode levar à formação de *knobs*. De acordo com Sumner (2003) há uma estreita correlação entre a localização dos cromômeros e *knobs* paquitênicos com os padrões de bandas G. O autor também cita Ambros e Sumner, (1987) os quais descreveram que as bandas G ricas em AT tendem a formar os cromômeros meióticos, geralmente localizados em posição terminal, e as bandas R ricas em GC formam as regiões intercromoméricas (menos condensadas). Contudo, de acordo com Sumner (2003) ainda são necessários outros estudos para confirmar se as bandas G cromoméricas correspondem às bandas T.

Schulz-Schaeffer (1980) relata que o número e a posição dos *knobs* costumam ser constantes em uma espécie, mas que podem variar de espécie para espécie e também entre raças da mesma espécie, e são mais frequentes em regiões terminais e subterminais. Segundo Fransz et al. (2000), a presença dos *knobs* está associada à baixa atividade de recombinação e transcrição e estas regiões foram denominadas por Petes (2000) como *coldspots*. Em um estudo com milho, Gharrafi et al. (2013) demonstraram que a presença de *knobs* reduziu a recombinação, porém isso depende também do tamanho dos *knobs* e da presença de certos genes. Estes autores descreveram que a presença do gene Ab10, minimiza os efeitos dos *knobs*. Além disso, se os *knobs* forem de fato a junção de vários cromômeros, seu impacto na permuta dependerá diretamente de seu tamanho.

A viabilidade polínica entre os acessos diploides (*C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*) e tetraploides (*C. dactylon* var. *dactylon*) foi estatisticamente diferente ($p > 0,05$). O acesso ERX 7 de *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis* apresentou maior taxa de viabilidade de pólen entre os acessos de *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*, apesar de apresentar maior frequência de anormalidades. Trabalhos de viabilidade polínica com a espécie *C. nlemfuensis* não foram encontrados. As estimativas de viabilidade de pólen observadas nesse estudo para *C. dactylon*

var. *dactylon* foram superiores aos resultados obtidos por Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), com cinco genótipos tetraploides de *C. dactylon*, cuja média foi 46,14%.

Nos trabalhos de Gupta e Srivastava (1970) e Akshita, Dhaliwal e Gupta (2011), também foram mensurados o tamanho dos grãos de pólen, onde encontraram médias de 23,8 e 27,3 μm respectivamente, similar ao observado neste estudo que estiveram entre 21,1 e 28,8 μm .

Para complementação de dados de testes colorimétricos deve-se associar outras técnicas, como testes de germinação *in vitro* ou *in vivo*, dessa maneira a interpretação dos dados torna-se mais confiável. As análises somente com corantes pode levar a interpretações equivocadas, uma vez que a coloração dependerá da penetração deste no grão de pólen (ALEXANDER, 1980). A utilização de dois corantes, por exemplo, permite uma comparação quanto ao índice de viabilidade. O corante carmim propiônico por se tratar de um corante nuclear, geralmente demonstra alta taxa de grãos viáveis, enquanto que o corante Alexander por ser constituído por fucsina ácida e verde malaquita, substâncias com afinidades diferentes, permitem corar onde há parede celular e protoplasma, e na ausência de protoplasma muda a coloração do grão de pólen, sendo mais eficiente na apuração dos dados (ALEXANDER, 1980; TECHIO et al., 2006).

Além disso, é preciso considerar que a viabilidade do pólen pode variar significativamente entre indivíduos de uma mesma espécie assim como amostras vindas de um mesmo indivíduo. Outras variáveis podem interferir, tais como fatores abióticos e a diferença entre os genótipos podem contribuir para a divergência de dados obtidos nos trabalhos (TECHIO et al., 2006). Segundo Silva et al (2012), a diminuição da taxa de viabilidade em Poaceae, isso quando a meiose se constitui normal, provavelmente está relacionada com a incapacidade de suportar a dessecação.

Os grãos de pólen foram classificados como oblatos esferoidais conforme a classificação proposta por Erdtman (1943), onde a razão entre eixo polar e equatorial está entre 0,88 a 1 μm . Em um estudo realizado por Liu, Zhao e Hao (2004), os grãos de pólen de acessos de *Cynodon dactylon* foram classificados como suboblatos, com razão entre eixo polar e equatorial de 0,79 a 1,11 μm , diferente também do que foi relatado por Morgado et al. (2015) em que os grãos de pólen de *C. dactylon* foram classificados como prolatos esferoidais com medida do eixo polar entre 10,0 e 12,0 μm , e eixo equatorial entre 9,0 e 12,0 μm . No mesmo trabalho, Liu, Zhao e Hao (2004), observaram a partir de microscopia eletrônica de transmissão (MET) que os grãos de são insulares, com exina compacta, onde a fusão de grânulos (denominação de insular) aparecem em densidade de 1-2 por μm^2 , relatando que essas características são comuns dentro da subfamília Chloridoideae, na qual o gênero *Cynodon* está inserido.

As variações nos tipos morfológicos observadas em nosso estudo em comparação com outros autores, podem ser explicadas por efeitos sobre o tamanho e estrutura do grão de pólen provocadas pela técnica de acetólise, que também foi empregada por Liu, Zhao e Hao (2004) e Morgado et al. (2015) para avaliar o grão de pólen de *Cynodon dactylon*. De acordo com O'keefe; Wymer (2015), essa técnica é a mais difundida nos estudos de morfologia polínica, mas tem a desvantagem de provocar alterações no tamanho e, em alguns casos, na estrutura de grãos de pólen. Estes autores propuseram uma técnica alternativa baseada em tratamento enzimático em grãos de pólen frescos. Embora aumente o tempo de processamento, é uma técnica não tóxica, de fácil aplicação e comparável em custos à acetólise. Além disso, não causa danos mesmo em grãos de pólen frágeis.

Com base nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os grãos de pólen dos acessos avaliados são monoaperturados, ou seja, possuem apenas uma abertura por onde emerge o tubo polínico, com exina microreticulada (PUNT et al, 2007) e também não apresentaram ornamentações que facilitem dispersão por meio de entomofilia, podendo se inferir que a dispersão neste caso pode ocorrer por anemofilia, pois segundo Culley, Weller e Sakai (2002) esse tipo de dispersão ocorre em cerca de 18% das angiospermas, incluindo a família Poaceae. No trabalho de Nunes et al (2012), com *Lolium multiflorum*, também foi observado apenas uma abertura no grão de pólen, característica compartilhada entre as Poaceae, de acordo com Linder e Ferguson (1985). Esse tipo de abertura caracteriza o pólen como sendo mais primitivo (MIRANDA; ANDRADE, 1990). Contudo, devido ao tipo de ornamentação exibido no grão de pólen, Liu, Zhao e Hao (2004) sugerem, que o tipo insular (fusão de grânulos em espécie de mosaico) propõem tendência evolutiva, onde a exina passa de granulada para insular e que esses indicadores também podem ser utilizados para indicar origem e também distribuição de espécies.

6 CONCLUSÃO

Os acessos de *Cynodon dactylon* var. *dactylon* e *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis* apresentaram meiose regular com baixas taxas de anormalidades.

Os acessos tetraploides de *Cynodon dactylon* var. *dactylon* apresentaram taxas superiores de viabilidade de pólen comparado aos acessos diploides de *Cynodon nlemfuensis* var. *nlemfuensis*.

Os acessos apresentam grãos de pólen oblatos esferoidais, monoaperturados e sem ornamentação na exina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSHITA, DHALIWAL, R. S.; GUPTA, R. C. Cytological study on three cytotypes of bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) From Haryana and Shiwalik Hills. **Journal of Basic and Applied Biology**, Puthalam v. 5, p. 7-12, 2011.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.
- ANDRADE, C. M. S.; et al. **Gramma-estrela-roxa**: gramínea forrageira para diversificação de pastagens no Acre. Embrapa Acre, Rio Branco, 2009, 83p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/663655/gramma-estrela-roxa--graminea-forrageira-para-diversificacao-de-pastagens-no-acre>> Acesso em novembro 2015.
- APPELS, R. et al. **Chromosome biology**. Springer Science & Business Media, Nova York, 1998, 401p.
- ATHAYDE, A. A. R. et al. **Gramíneas do gênero *Cynodon***– cultivares recentes no Brasil. Lavras: Universidade Federal de Lavras. Boletim técnico, v. 73, p. 1-14, 2005.
- AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 55-63, 2006.
- AVDULOW, N. P. Karyosystematische unteruching der familie gramineen. **Bulletin of Applied Botany, Genetics Supplement**, Londres, v. 1, 1931, 428p.
- BURTON, G. W.; HANNA, W. W. Bermuda grass. In: **Forages: The Science of grassland and agriculture**. HUGHES, H. D.; HEATH, M. E.; METCALFE, D. S. Ames: Iowa State University Press, 1995.
- BUSTAMANTE, F. O. L. C. et al. Distribution of rDNA in Diploid and Polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and Fragile Sites in 45S rDNA Regions. **Crop Science**, Madison, v. 54, p. 617-625, 2014. doi:10.2135/cropsci2013.05.0325
- BRILMAN, L. A, KNEEBONE, W. R, ENDRIZZI, J. E. Pachytene chromosome morphology of diploid *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Cytologia**, Tokyo v. 47, n. 1, p. 171–181, 1982.
- CARO, J.A. Cuatro especies y una nueva variedad de *Cynodon* (Gramineae). **Dominguezia**, República Argentina, v. 6, p. 5-20, 1983.
- CARO, J. A.; SÁNCHEZ, E. L. Nuevas especies de *Cynodon* (Gramineae) de la República Argentina. **Kurtziana**, República Argentina v. 5, p. 191-252, 1969.
- CARO, J. A; SÁNCHEZ, E. Novedades em *Cynodon* (Gramineae) de América. **Darwiniana**, República Argentina, 1972.

CHIAVEGATTO, R. B. et al. Karyotype asymmetry in *Cynodon* Rich. (Poaceae) accessions. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto v. 15, n. 4, p. 1-12, 2016.

CLAYTON, W. D.; HARMAN, K.T; WILLIAMSON, H. **GrassBase –the online world grass flora**, Richmond, 2009. Disponível em:< <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>> acesso em Jul 2015.

CULLEY, T. M.; WELLER, S. G.; SAKAI, A. K. The evolution of wind pollination in angiosperms. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 17, n. 8, p. 361-369, 2002.

ERDTMAN, G. The acetolysis method -A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, Uppsala v. 54, p. 561-564, 1960.

ERDTMAN, G. **An Introduction to Pollen Analysis**. Waltham Mass, 1943, 239p.

FERGUSON, I. K. The role of pollen morphology in plant systematics. **Anales de la Asociación de Palinólogos de Lengua Española**, Córdoba, v. 2, p. 5–18, 1985.

FERREIRA, C. A.; et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, p. 159-173, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar[®]. Versão 4.6 (Build 61); **Universidade Federal de Lavras**, Brasil, 2003.

FILGUEIRAS, T. S.; VALLS, J. F. M. *Cynodon* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13144>>. Acesso em: Jun. 2015

FORBES, I.; BURTON, G. W. Chromosome numbers and meiosis in some *Cynodon* species and hybrids. **Crop Science**, Madison v. 3, p. 75–79, 1963.

FRANSZ, P. F. et al. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *Arabidopsis thaliana*: structural organization of heterocromatic knob and centromere region. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 3, p. 367-376, 2000.

GHAFFARI, R. et al. Maize chromosomal knobs are located in gene-dense areas and suppress local recombination. **Chromosoma**, Berlin, v. 122, n. 1-2, p. 67-75, 2013.

GUPTA, P. K.; SRIVASTAVA, A. K. Natural Triploidy in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics** Florença, v. 23, n. 1 p. 29-35, 1970.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara, 1988, 142p.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002, 131p.

HANNA, W. W.; BURTON, G. W. Cytological and fertility characteristics of some hybrid bermudagrass cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 17, n. 2, p. 243-245, 1977.

- HARLAN, J. R.; J. WET, M. J.; RICHARDSON, W. L. Hybridization Studies with Species of *Cynodon* from East Africa and Malagasy. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 56, n. 8, p. 944-950, 1969.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Sources of variation in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Crop Science**, Madison, v. 9, p. 774-778, 1969.
- HARLAN, J. R. *Cynodon* species and their value for grazing and hay. **Herbage Abstracts**, v. 40, p. 233-238, 1970.
- HARLAN, J. R.; et al. Cytogenetic studies in *Cynodon* L. C. Rich (Gramineae). **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 288-291, 1970a.
- HARLAN, J. R.; WET, J. M. J.; RAWAL, K. M. Origin and distribution of the seleucidus race of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. var. *dactylon* (Gramineae). **Euphytica**, Wageningen, v. 19, p. 465-469, 1970b.
- HESSE, M.; WAHA, M. A. new look at the acetolysis method. **Plant Systematics and Evolution**, Berlin, v. 163, n. 3, p. 147-152, 1989.
- HILL, G. M.; GATES, R. N.; WEST, J. W. Advances in bermuda grass research involving new cultivars for beef and dairy production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p. 48-58, Supplement 1, 2001.
- HOROWITZ, M. Bermudagrass (*Cynodon dactylon*): A History of the Weed and Its Control in Israel. **Phytoparasitica**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 305-320, 1996.
- HUNTER, W. S. A karyosystematic investigation in the Gramineae. **Canadian Journal of Research**, Ottawa, v. 11, p. 213-241, 1934.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; PETER F. STEVENS, P. F. & DONOGHU, M. J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009, 632p.
- KNEEBONE, W. R. Bermuda grass – worldly, wily, wonderful weed. **Economic Botany**, Berlin, v. 20, p. 94-97, 1966.
- KNOX, R. B. The Pollen Grain. In: JOHRI, B.M (ED). **Embryology of Angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, p. 197-271, 1984.
- KSIĄŻCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKI, Z. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. **Journal of applied genetics**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 449-460, 2010.
- LANGDON, R. F. N. The origin and distribution of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **The University of Queensland Papers**, Department of Botany, Queensland, v. 4, p. 41-44, 1954.
- LEITE, G. G.; MACHADO, F. O. C. **Capim “Coast-Cross” *Cynodon dactylon* (L.) Pers.** Comunicado Técnico n. 1, ISSN 1517-1469. Embrapa, Planaltina, 1999, 6p.

LINDER, H. P.; FERGUSON, I. K. Notes on the Pollen Morphology and Phylogeny Restionales and Poales. **Grana**, Abingdon, v. 24, n. 2, p. 65-76, 1985.

LIU, Q.; ZHAO, N. X.; HAO, G. Pollen morphology of the Chloridoideae (Gramineae). **Grana**, Abingdon, v. 43, n. 4, p. 238-248, 2004.

MELHEM, T. S.; et al. **Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil)**. Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo, v. 16, p. 1-104, 2003.

MIRANDA, M. M. B.; ANDRADE, T. A. P. **Fundamentos de palinologia**. Fortaleza: UFC, 1990, 99p.

MORGADO, L. N.; et al. Pollen morphology of Poaceae (Poales) in the Azores, Portugal. **Grana**, Abingdon, v. 54, n. 4, p.282-293, 2015

NANI T. F.; et al. Ribosomal DNA in diploid and polyploid *Setaria* (Poaceae) species: number and distribution. **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 9, n. 4, p. 645-660, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i4.5456>> acesso em janeiro 2017.

NANI, T. F.; et al. Physical Map of Repetitive DNA Sites in spp.: Intravarietal and Interspecific Polymorphisms. **Crop Science**, Madison, v. 56, n.4, p. 1769-1783, 2016.

NEIVA, J. N. M.; et al. Avaliação do crescimento e valor nutritivo do capim de burro) *Cynodon dactylon* (L) Pers no litoral cearense. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999, Porto Alegre-RS. **Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Porto Alegre-CE: SBZ, v. 1. p. 1-3,1999.

NUNES, R. C.; et al. Morphology and Pollen Viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180-188, 2012.

OBESO, D.; PEZZA, R. J.; DAWSON, D. Couples, pairs, and clusters: mechanisms and implications of centromere associations in meiosis. **Chromosoma**, Berlin, v. 123, p. 43-55, 2014.

O'KEEFE, J. M. K.; WYMER, C. L. An alternative to acetolysis: application of an enzyme-based method for the palynological preparation of fresh pollen, honey samples and bee capsules. **Palynology**, Abingdon, v. 41, p. 117-120, 2015.

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. 4, p. 997-1002, 2000.

PAGLIARINI, M. S.; FUZINATTO, V. A.; VALLE. C. B. Avaliação da microsporogênese em híbridos sexuais de *Brachiaria* (Poaceae). In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 4, 2007, São Lourenço. **Melhoramento de plantas e agronegócio: anais**. Lavras: UFLA: SBMP, 2007. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/323987>< acesso em Ago 2015.

PERVEEN, A. A contribution of the pollen morphology of family Gramineae. **World Applied Sciences Journal**, v. 2, p. 60-65, 2006.

PETES, T. D. Meiotic recombination hot spots and cold spots. **Nature Reviews Genetics**, New York, v. 2, p. 360-369, 2001.

PRIMAVESI, A. C.; et al. Adubação nitrogenada em capim-coastcross: efeitos na extração de nutrientes e recuperação aparente do nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 68-78, 2004.

PUNT, W.; et al. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Abingdon, v. 143, n. 1, p. 1-81, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7^a.ed. Coord. Trad. KRAUS, J. E. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007, 856p.

SEGHESE, M. A. **Informações sobre gramíneas do gênero *Cynodon***. Maringá: Centro Universitário de Maringá, Comunicado Técnico, 2009, 15p.

SIMPSON, M. G. **Plant Systematics**. Academic Press, Cambridge, 2006, 603p.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology. A laboratory manual**. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 1992, 119p.

SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics: plants, animals, humans**. Springer Science & Business Media, Berlin, 1980, 452p.

SINGH, R. J. **Plant Cytogenetics**. Florida: CRC Press, 2003, 488p.

SILVA, L. A. C.; et al. Chromosome number, microsporogenesis, microgametogenesis, and pollen viability in the Brazilian native grass *Mesosetum chaseae* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 4100-4109, 2012.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Springer Science & Business Media, Berlin, 1992, 478p.

SOUSA, F. B.; CARVALHO, F. C.; ARAÚJO FILHO, J. A. Capim gramão: uma opção para o Nordeste brasileiro. EMBRAPA-CNPQ. Circular Técnica, n. 14, Sobral, 1998.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. John Wiley & Sons, Nova Jersey, 2008, 294p.

TALIAFERRO, C. M. Out to Africa – a new look at “African” bermudagrass. **USGA Green Section Record**, Michigan, v. 30, p. 10-12, 1992.

TALIAFERRO, C. M.; ROUQUETTE JR, F. M.; MISLEVY, P. 2004. Bermudagrass and stargrass. Pages 417–438. In MOSER, L. E.; BURSON, B. L.; SOLLENBERGER, L. E. (Eds.). **Warm-season (C4) grasses**. Monograph 45. American Society of Agronomy, Madison, p. 417-438, 2004.

TECHIO, V. H.; et al. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 7-18, 2007.

THE PLANT LIST: A working list off all plant species. Disponível em:
<<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=cynodon> > acesso em maio 2016.

WU, Y. Q.; et al. Genetic analyses of Chinese *Cynodon* accessions by flow cytometry and AFLP markers. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 917–926, 2006.

WU, Y. Q.; TALIAFERRO, C. M.; Bermudagrass. In: SINGH, R.J. (Ed). **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Forage Crops**. New York: Crc Press, v. 5, p. 233-277, 2009.

WU, Y. *Cynodon*. In KOLE, C (Ed). **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Millets and Grasses**. USA: Institute of Nutraceutical Research, p. 53-71, 2011.

ZHI-YUN, G.; et al. Distribution of rDNA loci and genome differentiation in tetraploid *Cynodon*. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)**, New Delhi, v. 73, n. 4, p. 459-461, 2013.