

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

LAURA APARECIDA CARVALHO DA SILVA

**Citogenética e sistema reprodutivo da grama-do-cerrado
(*Mesosetum chaseae* Luces, Poaceae)**

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
DEZEMBRO DE 2011**

LAURA APARECIDA CARVALHO DA SILVA

**Citogenética e sistema reprodutivo da grama-do-cerrado
(*Mesosetum chaseae* Luces, Poaceae)**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Suely Pagliarini.

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
DEZEMBRO DE 2011

Aos meus pais, Maria Terezinha Carvalho da Silva e Antônio Jorge Apolinário da
Silva.

À família que, com amor e dedicação, construímos: meu, companheiro Bruno
Gadelha Poli e nosso filho, Carlos Otávio Carvalho Poli.

Ao meu irmão, Antônio Luiz Carvalho da Silva.

E às minhas 'mães científicas', doutora Sandra Aparecida Santos e doutora Maria
Suely Pagliarini.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a superação de meus limites e me conceder tantas graças.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade.

À Fundação Araucária, pela bolsa de estudo concedida, e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), pelo apoio financeiro para a pesquisa.

À minha orientadora, professora doutora Maria Suely Pagliarini, acima de tudo, pela compreensão e solidariedade, minha mais sincera gratidão, pois nesses anos de convivência soube com sabedoria o momento exato de exigir, como educadora, e o tempo exato de amparar, como ser humano.

À Coordenadora do curso, professora doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, pela colaboração nos momentos difíceis dessa pesquisa.

À Secretaria do PGM, mais precisamente ao Francisco José da Cruz e à Maria Valquiria Magro, pelo apoio.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Pantanal, pela disponibilidade do laboratório, pelo apoio financeiro e materiais concedidos. Em especial, à Pesquisadora e minha Coorientadora, Dr^a Sandra Aparecida Santos, e aos demais funcionários da Empresa envolvidos nesta pesquisa, principalmente ao João Batista Garcia.

À pesquisadora doutora Cacilda Borges do Valle, da Embrapa Gado de Corte, pela Coorientação em parte da tese.

À Neide da Silva, Técnica do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio indispensável.

Ao Programa de Pós-Graduação em Letras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que possibilitaram, respectivamente, a realização do exame de proficiência em Espanhol e o cumprimento de créditos como aluna não-regular.

A todos os amigos do PGM, que despertaram o meu lado mais irreverente e, sobretudo, transformaram-se na minha segunda família nos momentos em que me distanciei de minhas raízes.

BIOGRAFIA

LAURA APARECIDA CARVALHO DA SILVA, filha de Antônio Jorge Apolinário da Silva e de Maria Terezinha Carvalho da Silva, nasceu em 12 de outubro de 1982, na cidade de Ladário, estado do Mato Grosso do Sul.

Em dezembro de 1996, concluiu o Ensino Fundamental na Escola 2 de Setembro, na cidade de Ladário, estado do Mato Grosso do Sul.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 1999, na Escola Santa Tereza, na cidade de Corumbá, Estado do Mato Grosso do Sul.

Ingressou no Curso de Zootecnia, em março de 2000, na Universidade Católica Dom Bosco, na cidade de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, obtendo o título de Bacharel em Zootecnia em dezembro de 2003.

Em agosto de 2005, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, obtendo o título de Mestre em Zootecnia na área de Pastagem e Forragicultura em janeiro de 2008.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Caracterização do Pantanal.....	3
2.2. A forrageira nativa grama-do-cerrado (<i>Mesosetum chaseae</i> Luces)	4
2.3. Importância de estudos citológicos para o melhoramento	6
2.3.1. Microsporogênese e megasporogênese.....	6
2.3.2. Polinização	7
2.3.3. Receptividade estigmática	8
2.3.4. Viabilidade de pólen.....	10
2.3.5. Microgametogênese	11
2.3.6. Megagametogênese	12
2.3.7. Sistemas de reprodução	12
2.3.8. Programas de melhoramento	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Local de coleta do germoplasma	14
3.2. Microsporogênese.....	14
3.3. Microgametogênese.....	15
3.4. Megagametogênese	15
3.5. Viabilidade do pólen.....	15
3.6. Receptividade do estigma	16
3.7. Sistema reprodutivo	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Número de cromossomos	17
4.2. Microsporogênese.....	17
4.3. Microgametogênese.....	22
4.4. Megagametogênese	23
4.5. Viabilidade do pólen.....	24
4.6. Receptividade do estigma	27
4.7. Sistema reprodutivo	29
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Número dos acessos, local de coleta na sub-região do Pantanal, fitofisionomia e coordenadas geográficas dos pontos de coleta....	14
Quadro 2 - Percentagem de células com anormalidades meióticas nos acessos de <i>M. chuseae</i> analisados.....	21
Quadro 3 - Viabilidade polínica média e erro padrão da média para as três diferentes colorações.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Mesosetum chaseae</i> Luces (Filgueiras, 1989).....	5
Figura 2-	Aspectos do comportamento cromossômico na prófase I em <i>M. chaseae</i>	18
Figura 3-	Aspectos do comportamento meiótico em <i>M. chaseae</i>	20
Figura 4 -	Desenvolvimento do micrósporo até grão de pólen tricelular em <i>M. chaseae</i>	22
Figura 5-	Ovário de <i>M. chaseae</i> evidenciando a célula central do saco embrionário sem (a) e com (b) coloração com lugol.....	24
Figura 6 –	Coloração dos grãos de pólen pelos diferentes corantes.....	25
Figura 7 –	Aparelho reprodutivo feminino mostrando inúmeras bolhas resultantes de reação química com a peroxidase sobre os estigmas.....	28

RESUMO

SILVA, Laura Aparecida Carvalho. Universidade Estadual de Maringá. Dezembro de 2011. **Citogenética e sistema reprodutivo da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces, Poaceae)**. Orientadora: Maria Suely Pagliarini. Coorientadoras: Sandra Aparecida dos Santos e Cacilda Borges do Valle.

A economia do Pantanal concentra-se na exploração da bovinocultura de corte. Dentre as gramíneas forrageiras nativas desta região destaca-se a grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces, Poaceae). Esta gramínea é extremamente tolerante aos longos períodos de seca característicos desta região. Apesar de sua importância, muito pouco é conhecido sobre a biologia desta espécie. É consenso entre os melhoristas que a caracterização de germoplasma (pré-melhoramento) auxilia enormemente nos programas de melhoramento. Assim, o objetivo desta pesquisa foi buscar informação a respeito do número de cromossomos, nível de ploidia, comportamento meiótico, viabilidade do pólen, receptividade do estigma, micro e megagametogênese, modo de reprodução e sistema reprodutivo nesta gramínea. Dez acessos foram coletados em pontos distintos do Pantanal sul-mato-grossense, sub-região de Nhecolândia. O germoplasma foi cultivado na Embrapa Pantanal, Fazenda Nhumirim, Nhumirin, sub-região de Nhecolândia, Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. O material foi analisado por metodologia convencional de citogenética. Os resultados revelaram número de cromossomos $2n = 16$; o pareamento cromossômico na diacinese, essencialmente em bivalentes, indicou que a espécie é diplóide; os bivalentes apresentaram preferencialmente quiasmas terminais; o comportamento meiótico foi levemente anormal com segregações irregulares de cromossomos; a viabilidade do pólen foi variável entre acessos e entre plantas dentro de acessos; o estigma mostrou alta receptividade na antese; a microgametogênese mostrou que os grãos de pólen são liberados na forma tricelular; a megagametogênese mostrou-se típica de plantas com reprodução sexuada; e o sistema reprodutivo foi característico de alogamia. Estas informações contribuirão para o direcionamento dos futuros programas de melhoramento da espécie.

Palavras-chave: *Mesosetum chaseae*, grama-do-cerrado, citogenética, sistema reprodutivo.

ABSTRACT

SILVA, Laura Aparecida Carvalho. Universidade Estadual de Maringá. December, 2011. **Cytogenetic and mating system of the grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces, Poaceae)**. Adviser: Maria Suely Pagliarini. Committee Members: Dr^a Sandra Aparecida dos Santos and Cacilda Borges do Valle.

About 95% of the Pantanal area is destined to beef cattle exploration. The forage grasses are generally native to this region. Among them, the grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces, Poaceae) is the more important one because it is extremely tolerant to the long dry periods. Despite of its importance to this ecosystem, biological data about this species is rare. It is a consensus that germplasm characterization is fundamental to a breeding program. Thus, the aim of this research was to search some information related to microsporogenesis, micro and megagametogenesis, pollen viability, stigma receptivity, and mating system in this species. Ten accessions were collected in distinct places of the sul-mato-grossense Pantanal, Nhecolândia sub-region. The germplasm was cultivated at Embrapa Pantanal, Nhumirim Farmer, Nhumirim, Nhecolândia sub-region, Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. The material was analyzed by conventional cytogenetic methodology. The analyses revealed $2n = 16$; the chromosome associations at diakinesis, essentially in bivalents, indicated diploidy; the chiasmata were preferentially terminal; the meiotic behavior was slightly abnormal, with irregular chromosome segregation; the pollen viability was variable among accessions and among plants within accessions; all the stains revealed the same efficiency in determining pollen viability; the stigma was highly receptive at anthesis; the microgametogenesis revealed that pollen grain is released in the tricellular form; the megasporogenesis showed be typical of a sexual species; and the mating system characterized by allogamy. These informations will contribute to direct the future of breeding program in this species.

Key words: *Mesosetum chaseae*, grama-do-cerrado, cytogenetics.

1. INTRODUÇÃO

O Pantanal é uma planície sedimentar contínua, formada há milhares de anos com o soerguimento da Cordilheira dos Andes. Por apresentar grandes campos de pastagens nativas, a economia da região do Pantanal concentra-se na exploração da bovinocultura de corte. Cerca de 95% de sua área é ocupada por fazendas de criação extensiva de bovinos (Godoi Filho, 1984). Observa-se na região o aumento contínuo de introdução de gramíneas exóticas, considerando-se um contra-senso o descarte de material nativo que sequer foi estudado e cujo potencial de aproveitamento está sendo ignorado (Allem e Valls, 1987). Dentre as gramíneas nativas com potencial de cultivo destaca-se a grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae*), espécie tolerante à seca e com potencial na recuperação de áreas degradadas (Santos et al., 2004). A grama-do-cerrado foi a gramínea mais consumida pelos bovinos nas áreas de campo pouco inundáveis durante a época de anos extremamente secos, localizados nas fitofisionomias mais elevadas da fazenda Nhumirim, sub-região da Nhecolândia, Pantanal, MS (Santos et al., 2002). Esta espécie apresenta plasticidade de hábito e desenvolvimento vegetativo (Santos et al., 2002).

A busca do desenvolvimento sustentável representa um dos maiores desafios para a humanidade e, em especial, para o Brasil. Ao longo dos séculos, o modelo de desenvolvimento no país tem evoluído do extrativismo e da agricultura de subsistência para uma exploração agroindustrial intensa, com a aplicação de tecnologias modernas e, em muitos casos, com ocupação e utilização desordenada dos recursos do ambiente, o que põe em risco a rica base de recursos naturais do Brasil (Fávero et al., 2008).

As atividades de pré-melhoramento são de grande importância para subsidiar a utilização prática de recursos genéticos e ampliar a base genética dos programas de melhoramento (Naas e Paterniani, 2000). Todavia, para maximizar o sucesso dos programas de melhoramento, são essenciais o fortalecimento e a consolidação de redes de pesquisadores multidisciplinares e multi-institucionais (Faleiro et al., 2008).

Apesar de sua importância para as pastagens da região pantaneira, muito pouco se conhece sobre a biologia da grama-do-cerrado, bem como de outras

espécies deste habitat. O sucesso de um programa de melhoramento depende de alguns conhecimentos básicos da espécie, dentre eles, a caracterização do germoplasma disponível, ou seja, do conhecimento das variações biológicas entre espécies no gênero, entre populações dentro de espécies e dentro de populações. Assim, neste estudo foram realizadas a contagem do número de cromossomos, a determinação do nível de ploidia, a avaliação do comportamento meiótico, a viabilidade do pólen, a receptividade do estigma, a micro e a megagametogênese, o modo de reprodução e o sistema reprodutivo, como estratégias de pré-melhoramento desta gramínea.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Caracterização do Pantanal

Formado há milhares de anos com o soerguimento da Cordilheira dos Andes, o Pantanal é uma planície sedimentar contínua. É integrante da bacia do rio Paraguai, abrangendo os estados de Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%), com área aproximada de 140.000 km² e altitude entre 80 a 170 m (Godoi Filho, 1984).

As fazendas de criação extensiva de bovinos ocupam cerca de 95% da área. A declividade da região é muito pequena e contribui para a retenção de água sobre a superfície do solo, por ocasião das inundações fluvial e pluvial. O clima é tropical sub-úmido (Aw, de Koeppen) com temperatura média anual de 26°C (Garcia, 1986). A precipitação média anual na bacia do Alto Paraguai varia de 800 a 1600 mm, e de 800 a 1200 mm na parte mais baixa que engloba toda a área da planície pantaneira (Júnior et al., 1997).

O Pantanal é dividido em dez sub-regiões: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paiaguás, Nhecolândia, Paraguai, Abobral, Miranda, Aquidauana e Nabileque (Allem e Valls, 1987). A sub-região da Nhecolândia, a segunda maior com área de 23.574 km², localiza-se na porção sul do leque aluvial do rio Taquari e apresenta partes mais elevadas (Pantanal alto) e mais baixas (Pantanal baixo), o que contribui para a formação de enorme diversidade de unidades de paisagem denominadas fitofisionomias. Nas partes mais elevadas, as unidades de vegetação, são geralmente dispostas em mosaico e a inundação, quando ocorre, geralmente é de origem pluvial. É observada sucessiva frequência de contrastes altimétricos, de dois a cinco metros, entre o topo das partes mais altas, regionalmente denominadas "cordilheiras", e as áreas mais baixas, denominadas vazantes e baixadas (Cardoso et al., 2004).

A economia da região concentra-se na exploração da bovinocultura de corte do tipo extensiva, por apresentar grandes campos de pastagens nativas, cuja estacionalidade limita o aumento da produção (Allem e Valls, 1987). Por conseguinte, há cerca de duas décadas, foi observado o aumento constante de introdução de gramíneas exóticas, destacando-se a *Brachiaria decumbens* e a

Brachiaria humidicola. Portanto, considera-se um contra-senso o descarte de material nativo que sequer foi estudado, cujo potencial de aproveitamento está sendo ignorado (Allem e Valls, 1987), ameaçando a sustentabilidade do sistema (Santos et al., 2004). A implantação de espécies exóticas para a elevação dos índices zootécnicos não deve ser visualizada da mesma maneira para regiões distintas, e sim considerar as peculiaridades de cada uma delas, especialmente em áreas frágeis e consideradas patrimônio da humanidade, como é o caso do Pantanal.

Entre as inúmeras espécies forrageiras nativas existentes no Pantanal com potencial produtivo destaca-se a grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae*), especialmente devido à produtividade, aceitabilidade pelo animal e resistência à seca (Santos et al., 2002).

2.2. A forrageira nativa grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces)

O termo “*Mesosetum*” provém do grego **Mesos** (colocado no meio) mais **Seta** em provável alusão ao tufo de pêlos (“*Setae*”) situado na porção mediana da primeira gluma de *Mesosetum cayennense*, única espécie reconhecida por Steudel (1854) citado por Filgueiras (1989). Este autor descreve 25 espécies reconhecidas (*Mesosetum cayennense*, *Mesosetum ferrugineum*, *Mesosetum rottboellioides*, *Mesosetum alatum*, *Mesosetum ansatum*, *Mesosetum bifarium*, *Mesosetum chaseae*, *Mesosetum compressum*, *Mesosetum elythrochaetum*, *Mesosetum longiaristatum*, *Mesosetum pittieri*, *Mesosetum schlerochloa*, *Mesosetum annuum*, *Mesosetum arenarium*, *Mesosetum comatum*, *Mesosetum chlorostachyum*, *Mesosetum gibbosum*, *Mesosetum loliiforme*, *Mesosetum pappophorum*, *Mesosetum agropyroides*, *Mesosetum blakei*, *Mesosetum exaratum*, *Mesosetum filifolium*, *Mesosetum penicillatum* e *Mesosetum wrightii*), das quais 20 espécies ocorrem no Brasil. Os estados brasileiros onde indivíduos do gênero foram encontrados são Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Piauí, Rio Grande do Norte, Roraima, São Paulo e Paraná. Exemplos do gênero também ocorrem em outros países como: México, países da América Central (exceto El Salvador), Cuba, Jamaica, Trinidad, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Paraguai e Argentina.

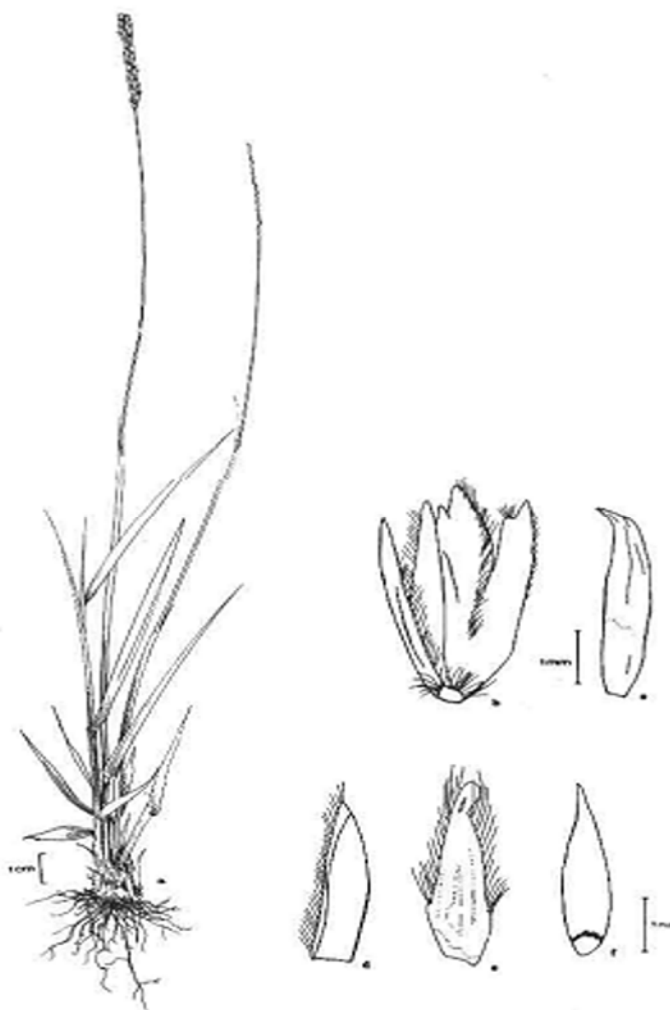


Figura 1 - *Mesosetum chaseae* Luces (Filgueiras,1989).

A espécie *M. loliiforme* ocupa as partes menos alagáveis do mesorelevo pantaneiro, enquanto a espécie *M. cayennense* e *M. chaseae* ocorre com menor frequência na pastagem, restringindo-se aos pantanais mais arenosos (Allem e Valls, 1987). No entanto, em decorrência da confusão taxonômica do gênero e das dificuldades para diferenciação de suas espécies quando encontradas no campo sem estruturas florais, apesar da maior frequência daquela no Pantanal, estes mesmos autores admitiram que parte da informação supostamente obtida sobre *M. loliiforme* possa ser, em realidade, relativa à *M. chaseae*. Portanto, o emprego de técnicas de manejo que permitam o aumento da ocorrência dessas duas espécies do gênero *Mesosetum* nos solos arenosos, onde frequentemente já são dominantes, poderá ampliar ainda mais sua contribuição para a produção de forragem no Pantanal.

Mesosetum chaseae possui hábito perene; rizomas alongados; estolões; colmos eretos com 25-65 cm de comprimento; inflorescência composta por um único racemo unilateral com 3-9 cm de comprimento; espiguetas solitárias e ciliadas com pedicelo fundido ao internódio, apresentando 1 mm de comprimento; as espiguetas apresentam uma flor basal estéril e uma flor fértil, as flores estéreis são masculinas, enquanto as flores férteis, ovaladas e coriáceas, com 3-4 cm de comprimento, são femininas; em cada flor há três anteras púrpuras; o fruto é uma cariopse com hilo linear (Figura 1). A espécie tem ampla distribuição no Pantanal, sendo encontrada principalmente nas áreas de topografia mais elevadas (caronal e campo cerrado) e em campos limpos esporadicamente inundáveis, apresentando plasticidade de hábito e de desenvolvimento vegetativo nesses ambientes (Santos et al., 2002; Alvarez et al., 2004).

2.3. Importância de estudos citológicos para o melhoramento

2.3.1. Microsporogênese e megasporogênese

Para deixar descendentes, os organismos que se reproduzem sexuadamente necessitam de células especializadas, os gametas. Tais células resultam de um tipo de divisão, denominado meiose, em que o número de cromossomos dos parentais é reduzido à metade. A meiose caracteriza-se pela ocorrência de uma série de eventos seqüenciais de elevada complexidade mecânica e bioquímica. Durante a meiose, os pares cromossômicos, conhecidos como cromossomos homólogos, trocam partes entre si, formando novas combinações genéticas antes de serem divididos em conjuntos únicos. Este processo faz com que cada célula haplóide receba uma mistura de genes dos dois genomas parentais da célula ancestral. Estes eventos criam variabilidade genética a cada geração, dando maior flexibilidade evolutiva aos organismos de reprodução sexuada. Esta forma de reprodução é altamente relevante para o melhoramento de plantas, uma vez que permite a recombinação gênica entre parentais com genes distintos e que necessitam ser misturados para obter variabilidade genética (Pagliarini e Pozzobom, 2005).

Embora a meiose seja idêntica em plantas e animais, a produção de gametas difere em alguns aspectos. Enquanto em animais as células haplóides

originadas da meiose sofrem apenas diferenciação celular para dar origem ao gameta masculino (espermatozóide) e feminino (óvulo), nos vegetais, ao terminar a meiose, são produzidos esporos. Os esporos são células haplóides que necessitam sofrer mitoses para dar origem aos gametas. Enquanto o processo que leva à formação de esporos haplóides nos vegetais através da meiose é conhecido como esporogênese, a formação dos gametas através da ocorrência de mitoses nestes esporos é conhecida como gametogênese. De forma análoga aos animais, as células resultantes da meiose nos vegetais são de tamanhos diferentes. Os produtos meióticos femininos são sempre maiores que os masculinos. Assim, por gerar células de diferentes tamanhos, a esporogênese feminina nos vegetais é denominada megasporogênese e a esporogênese masculina, microsporogênese. O produto meiótico da megasporogênese é conhecido como megásporo e o da microsporogênese como micrósporo. A megasporogênese, por ocorrer dentro dos ovários e em um número limitado de células, é muito mais difícil de ser estudada que a microsporogênese. Na parte feminina, para se chegar às células que estão sofrendo meiose, deve-se efetuar cortes histológicos dos ovários em micrótomo, o que consiste em um processo extremamente demorado e laborioso. O estudo da microsporogênese, por outro lado, é extremamente simples. Por ocorrer dentro das anteras, que são órgãos facilmente manipuláveis com técnicas elementares e, por apresentar um grande número de células sofrendo meiose, a microsporogênese tem sido muito mais estudada que a megasporogênese (Pagliarini e Pozzobon, 2005).

Coleções de germoplasma geralmente envolvem uma grande quantidade de acessos de uma ou mais espécies, ou até mesmo gêneros afins. Dentro de uma coleção, geralmente existe variabilidade cariotípica em nível de ploidia e número básico de cromossomos que, muitas vezes, comprometem o uso do germoplasma. Assim, estudos citogenéticos envolvendo a contagem do número de cromossomos, determinação do nível de ploidia, avaliação do comportamento meiótico e fertilidade do pólen são de fundamental importância na caracterização de germoplasma.

2.3.2. Polinização

A polinização é um dos estágios mais críticos no ciclo de vida das plantas superiores, envolvendo uma série complexa de interações célula-célula que constituem a interação pólen-pistilo (Heslop-Harrison, 1978, 2000). Este contato

celular crítico entre o gametófito masculino haplóide (pólen) e as células diplóides (pistilo) do esporófito feminino determina se a fertilização irá ocorrer.

Como um prelúdio para a fertilização, o pólen deve estabelecer compatibilidade molecular com o estigma e então germinar para produzir o tubo polínico que penetra no estigma e cresce dentro do tecido do estilete para localizar o gameta feminino dentro do saco embrionário. O início e o sucesso desta sequência de eventos dependem do estigma e estilete providenciarem os exatos requerimentos para a germinação do pólen e sustentar o seu crescimento e direcionamento do tubo polínico através do pistilo e ovário (Heslop-Harrison, 2000; Herrero, 2003; Swanson et al., 2004). O tempo da polinização é crítico porque a superfície estigmática do pistilo somente é receptiva ao pólen por um período relativamente curto. Polinização fora deste contexto resultará em baixa ou nenhuma produção de sementes (Herrero, 2003).

2.3.3. Receptividade estigmática

Na maturidade, quando os estigmas estão prontos para a polinização, eles são caracterizados por altos níveis de peroxidases (Dupins e Dumas, 1990; Dafni e Motte Maués, 1998) e esterases (Hiscock et al., 1994, 2002). Surpreendentemente, apesar dos esforços concentrados para caracterizar as moléculas do estigma e do pólen que regulam o auto-reconhecimento durante a resposta da auto-incompatibilidade e também a orientação do tubo polínico, virtualmente nada é conhecido sobre a função destas abundantes enzimas estigmáticas. A atividade da esterase não mostra mudança variável durante o desenvolvimento do estigma (Hiscock, 2004), enquanto a atividade da peroxidase aumenta dramaticamente no pistilo maduro, alcançando um pico quando o estigma está mais receptivo ao pólen (Stpiczynska, 2003). Na verdade, o teste mais usado para determinar a receptividade do pistilo envolve medida da atividade da peroxidase usando vários testes para peroxidase (Dafni e Motte Maués, 1998).

Apesar da diversidade morfológica, o estigma das angiospermas pode ser dividido em dois tipos básicos: molhados e secos (Heslop-Harrison e Shivanna, 1977, Edlund et al, 2004). Estigmas molhados produzem uma grande quantidade de secreção que pode ser predominantemente aquosa ou lipídica. De forma contrastante, estigmas secos não apresentam uma superfície de secreção, mas sim

uma película proteínica (Hiscock, 2004). Apesar destas diferenças fundamentais, ambos os estigmas mostram altos níveis de atividade de esterase e peroxidase, sugerindo que estas enzimas sejam fundamentais para a função do estigma (McInnis et al., 2006).

As enzimas peroxidases geralmente catalizam a quebra do peróxido de hidrogênio para produzir produtos intermediários oxidados, que oxidam uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos. Entender a função da peroxidase em plantas tem sido problemático devido à ampla diversidade de substratos em que atuam e a falta de especificidade de tecidos. A maioria das peroxidases em plantas pertence a uma superfamília de enzimas coletivamente conhecidas como peroxidases classe III (Welinder, 1992). As enzimas peroxidases desta classe são expressas em vários tecidos das plantas e tem papel no seu metabolismo e nos processos fisiológicos, tais como resposta a estresse oxidativo, lignificação, metabolismo da auxina, defesa contra ataque de patógenos, entre outros (McInnis et al., 2006). Recentemente, a primeira peroxidase exclusiva do estigma foi identificada em plantas (McInnis et al., 2005). Esta enzima foi denominada 'peroxidase estigma-específica' (SSP: *stigma-specific peroxidase*). Esta peroxidase é expressa nas células secretoras especializadas (papilas) da epiderme do estigma e sua expressão é regulada durante o desenvolvimento. Sua expressão não é detectada em botões florais pequenos, mas aumenta com o desenvolvimento da flor, atingindo seu máximo em flores recém abertas, quando os estigmas estão mais receptivos.

Para o sucesso da polinização, o grão de pólen deve ser transferido ao estigma no momento em que este está receptivo. Em alguns casos, o pólen é depositado antes do período receptivo e deve permanecer viável por um período longo até germinar (Stösser et al., 1997). Para que isto aconteça, o período de receptividade do estigma pode ser facilmente determinado (Thompson e Barret, 1981). Vários testes químicos têm sido desenvolvidos para determinar a receptividade do estigma e um deles envolve a reação enzimática da enzima peroxidase, baseado na hipótese de que a presença desta enzima reflete na receptividade do estigma (Galen et al., 1987). Se a peroxidase estiver presente no estigma, bolhas de oxigênio serão liberadas a partir da reação com o peróxido de hidrogênio.

Muitos estudos usando o método de avaliação da receptividade do estigma pela reação da peroxidase são encontrados na literatura e os resultados bastante

variáveis. Em rosas de jardim, a receptividade foi muito baixa no primeiro dia da abertura da flor, alcançando o máximo entre o quarto e o sexto dia. Em girassol, a receptividade durou até três dias após a abertura da flor. Em marmeleiro, a receptividade variou de 20% um dia antes da antese a 35% no dia desta (Singh e Sirivastava, 2000). Em cebola, a receptividade foi constatada durante seis dias após a antese (Harikarunakar e Haripriya, 2000).

Todo sucesso em experimentos de melhoramento ou procedimento de polinização artificial deve ser acompanhado por testes ao longo do tempo e duração da receptividade dos estigmas (Stone et al., 1995).

2.3.4. Viabilidade de pólen

Viabilidade de pólen refere-se à habilidade do grão de pólen para desenvolver sua função de levar os gametas masculinos até o saco embrionário. O período pelo qual o grão de pólen permanece viável após a sua liberação varia enormemente entre as espécies. Com base em sua longevidade, os grãos de pólen podem ser agrupados em três categorias: (1) pólenes de vida curta; são aqueles que perdem a viabilidade rapidamente (menos de uma hora) ou em poucos dias (membros da família Poaceae); (2) pólenes de vida média; mantêm a viabilidade de 1 – 3 meses (maioria das famílias de angiospermas); (3) pólenes de vida longa; mantêm a viabilidade por mais de seis meses (maioria das gimnospermas e algumas famílias de angiospermas) (Barnabbas e Kovacs, 1987).

A rápida perda de viabilidade dos grãos de pólen em Poaceae está associada com a falta de habilidade de suportar dessecação. Enquanto em outras espécies os grãos de pólen são liberados com menos de 20% de umidade, nas Poaceae a umidade deve ser de 50% (Shivanna, 2003).

A avaliação da viabilidade do pólen é fundamental para muitos estudos e procedimentos. A padronização de um método simples e rápido para avaliar a viabilidade do pólen é importante. Inúmeros testes têm sido desenvolvidos ao longo dos anos para avaliação da viabilidade polínica. Dentre eles destacam-se: a avaliação da produção de frutos e sementes; a germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico no pistilo; testes não vitais, que usam corantes específicos; testes vitais, que usam corantes vitais; e teste de germinação *in vitro* (Shivanna, 2003).

Obviamente, por causa das limitações impostas pela maioria destes testes, os testes com corantes não vitais são os mais usados. Dentre estes, citam-se: iodeto de potássio (lugol), azul de anilina em lactofenol, carmim acético ou propiônico e fucsina ácida (Alexander). Estes corantes mostram a presença de conteúdo no interior do pólen, mas não asseguram que sejam plenamente viáveis (Shivanna, 2003).

A viabilidade do pólen parece estar primariamente associada com a perda da integridade da membrana plasmática (Jain e Shivanna, 1989). A viabilidade do pólen pode ser afetada também por eventos que ocorrem durante a meiose e levam à formação de micrósporos geneticamente desbalanceados. Anormalidades meióticas têm sido demonstradas como causa de redução da viabilidade polínica em inúmeras espécies (Pagliarini, 2000), incluindo membros da família Poaceae, como *Brachiaria* (Mendes-Bonato et al., 2002; Utsunomiya et al., 2005; Pagliarini et al., 2008).

2.3.5. Microgametogênese

O desenvolvimento do gametófito masculino em angiospermas é uniforme (Maheshwari, 1978; Batagyna, 2003). No final da meiose ocorre formação de uma tétrade de quatro células haplóides denominadas micrósporos, que estão envoltos pela parede de calose. Após a dissolução da parede de calose, os micrósporos crescem rapidamente e o núcleo que ocupava posição central migra para a periferia para uma posição oposta ao poro do pólen. Neste período, a parede externa do pólen, a exina, é sintetizada. Uma divisão assimétrica, denominada mitose do micrósporo, ocorre, produzindo duas células com destinos diferentes: uma célula grande, conhecida como célula vegetativa, e uma célula pequena, a célula generativa. O produto bicelular da mitose do micrósporo é, por definição, o grão de pólen (Bedinger, 1992; McCormick, 1993).

A célula generativa tem um núcleo condensado e uma quantidade de citoplasma reduzido quando comparada com a célula vegetativa. Em aproximadamente 70% das famílias de plantas, o grão de pólen é liberado da antera quando está com apenas duas células (Maheshwari, 1978; McCormick, 1993). Nos dias seguintes, ocorrem as próximas etapas da maturação. A célula generativa dentro do grão de pólen jovem se divide novamente para formar duas células

espermáticas. O grão de pólen secreta, então, a camada interna, a intina, a partir de celulose e pectina (Bedinger, 1992). Em muitas plantas, esta segunda mitose ocorre após a germinação do tubo polínico no pistilo da flor feminina. Em outras famílias de plantas, incluindo Poaceae, a segunda divisão ocorre antes que o pólen seja eliminado da planta (Maheshwari, 1978; McCormick, 1993).

2.3.6. Megagametogênese

O tipo mais comum de saco embrionário (tipo *Polygonum*) é aquele que contém oito células e é derivado de um único megásporo funcional. Este tipo é característico da maioria das angiospermas, e também tipifica o saco embrionário sexual das gramíneas (Grenham e Chapman, 1990).

Em um saco embrionário do tipo *Polygonum*, ocorrem três mitoses após a meiose, sendo formado um megagametófito com oito células: três antípodas, duas sinérgides, uma célula ovo (oosfera ou gameta feminino) e dois núcleos polares. Os dois núcleos polares se fundem pré ou pós-fertilização para formar o núcleo secundário da célula central (Grenham e Chapman, 1990; Batagyna, 2002).

2.3.7. Sistemas de reprodução

Os sistemas reprodutivos das plantas superiores podem ser classificados em três grupos. O primeiro grupo reúne as espécies alógamas que se caracterizam pela reprodução sexual por meio de fecundação cruzada. Desse modo, as plantas alógamas são heterozigotas para muitos de seus alelos. O segundo grupo compreende as espécies autógamias, ou seja, aquelas que se reproduzem sexualmente por meio de autofecundação, elevando os níveis de homozigose. No terceiro grupo, são incluídas as espécies que se propagam assexuadamente, sendo, portanto, clones (Pinto, 1995).

O conhecimento do sistema reprodutivo de uma espécie é de fundamental importância para dirigir o programa de melhoramento.

2.3.8. Programas de melhoramento

Para espécies nativas, cuja biologia ainda é desconhecida, um programa de melhoramento deve vir sempre acompanhado de um pré-melhoramento. O pré-

melhoramento é uma alternativa importante a ser considerada para intensificação do uso do uso de recursos genéticos em resposta aos grandes desafios que se descortinam para a agricultura brasileira (Fávero et al., 2008). Todos os esforços para a intensificação e valorização dos recursos genéticos deverão receber cada vez maior ênfase. É fundamental que se mude mentalidades e se estabeleça uma aliança ampla que integre profissionais em diversas vertentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de coleta do germoplasma

A coleta de germoplasma de *Mesosetum chaseae* foi realizada em pontos distintos do Pantanal sul-mato-grossense, sub-região de Nhecolândia. O Quadro 1 indica as sub-regiões, o local de coleta, a fitofisionomia e as coordenadas geográficas dos pontos de coleta de acordo com o sistema Universal Transversal de Marcator (UTM). Foi coletado um total de dez acessos. Uma vez coletado, o germoplasma foi cultivado, em campo aberto, na Embrapa Pantanal, Fazenda Nhumirim, Nhumirin, sub-região de Nhecolândia, Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil, constituindo a coleção deste gênero nesta sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Quadro 1 - Número dos acessos, local de coleta na sub-região do Pantanal, fitofisiografia e coordenadas geográficas dos pontos de coleta

Acessos	Sub-região do Pantanal	Local de coleta	Local preciso da coleta	Fitofisionomia	Coordenadas geográficas (UTM*)
1	Nhecolândia	Fazenda Nhumirim	Invernada 2	Campo limpo não inundável	540089/7898986
2	Nhecolândia	Fazenda Nhumirim	Invernada 18	Campo limpo inundável	538171/7897724
3	Nhecolândia	Fazenda Nhumirim	Invernada 10	Campo limpo não inundável	535406/7899592
4	Nhecolândia	Fazenda Campo Dora	Invernada 10	Campo limpo inundável	533485/7901107
5	Nhecolândia	Fazenda Chatelodo	-	Caronal	534401/7890612
6	Nhecolândia	Fazenda Chatelodo	-	Campo limpo	534641/7893824
7	Nhecolândia	Fazenda Chatelodo	-	Borda de campo cerrado	534754/7895118
8	Nhecolândia	Campo do Valdir	-	Campo cerrado não inundável	540493/7906116
9	Nhecolândia	Campo do Valdir	-	Borda de cordilheira	540452/7906193
24	Nhecolândia	Fazenda Nhumirim	Reserva	Campo limpo	539319/7902

*Projeção Marcador Transversal Universal (Universal Transversal de Marcator).

3.2. Microsporogênese

Inflorescências em fase ideal para o estudo da meiose foram coletadas e fixadas em Carnoy (3 álcool etílico:1 ácido acético), por 24 horas e depois transferidas para álcool a 70% e armazenadas sob refrigeração até o momento do uso. Microsporócitos foram preparados por esmagamento e corados com carmim propiônico a 1%. O número de cromossomos foi determinado em meiócitos em

diacinese. O comportamento meiótico foi determinado em um número de microsporócitos superior a 1700. As imagens dos meiócitos foram capturadas em microscópio Olympus CX 31 com câmera acoplada SC 30, por meio do software AnalySIS getIT.

3.3. Microgametogênese

Para o estudo do desenvolvimento do micrósporo até grão de pólen, foram utilizadas as inflorescências colhidas para meiose. Para este propósito, foram utilizadas flores maduras que haviam completado a microsporogênese. A metodologia empregada foi a mesma utilizada na microsporogênese.

3.4. Megagametogênese

A megagametogênese foi estudada por meio de sacos embrionários clarificados com metilsalicilato de acordo com metodologia proposta por Young et al. (1979). A análise foi feita sob microscopia de contraste de fase de interferência. Para coloração da célula central, utilizou-se lugol a 2%.

3.5. Viabilidade do pólen

Inflorescências em antese dos dez acessos foram colhidas e fixadas em álcool a 70% e armazenadas sob refrigeração. Para a coloração dos grãos de pólen, estes foram liberados de anteras maduras com o auxílio de uma pinça e estilete sobre uma lâmina. Em seguida, uma gota de corante foi adicionada à lâmina e esta foi coberta com uma lamínula. Três colorações diferenciais foram empregadas: lugol a 2%, carmim propiônico a 1% e Safrablau (safranina + azul de Astra).

Para cada acesso foram analisadas dez flores amostradas em dez inflorescências. O total de grãos de pólen analisados foi de 1000/acesso/corante. A viabilidade do pólen foi avaliada na objetiva de 40X (400X de aumento) em microscópio de luz. Grãos de pólen com tamanho reduzido, coloração fraca e citoplasma reduzido ou ausente foram considerados não viáveis e aqueles cheios e corados, viáveis. Os dados obtidos em cada acesso/corante foram transformados em média.

3.6. Receptividade do estigma

Estigmas dos dez acessos de *M. chaseae* foram coletados no banco de germoplasma da espécie durante o período de antese, entre sete e dez horas e mantidos sob hidratação até o momento da análise. A receptividade dos estigmas foi determinada em anteras deiscentes, usando o teste para atividade da peroxidase estigmática (SPA) proposto por Zeisler (1938) e amplamente utilizado até o momento.

Para cada acesso foram coletadas 50 flores e, de cada flor, foi analisado um par de estigmas, totalizando 50 estigmas por acesso. Os ovários com os estigmas (aparelho reprodutor feminino) foram removidos das flores com uso de microscópio estereoscópico e colocados em uma lâmina com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% e, em seguida, cobertos com lamínula. Os estigmas que produziram bolhas dentro de 2-3 minutos foram considerados receptivos.

3.7. Sistema reprodutivo

Dentre os dez acessos analisados para as demais características, oito foram avaliados para modo de reprodução. Destes, duas mudas dos acessos do banco de germoplasma ativo, cultivados na Fazenda Nhumirim, foram trazidas para a Embrapa Pantanal (Corumbá, MS) e cultivados em vasos em casa de vegetação.

Inflorescências dos oito acessos foram protegidas por saco de papel antes da antese para induzir a ocorrência de autofecundação. Os racemos produzidos foram colhidos após 28 dias e as espiguetas foram analisadas individualmente com o objetivo de averiguar a formação de sementes. No total, foram avaliadas 1099 flores de 55 racemos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Número de cromossomos

Os dez acessos de *M. chaseae* analisados apresentaram $2n = 16$ cromossomos (Figura 2). Embora poucos estudos tenham sido realizados no gênero *Mesosetum*, alguns pesquisadores (Gould, 1966; Gould e Soderstrom, 1967; Pohl e Davidse, 1971; Davidse e Pohl, 1972) sugerem que o número básico seja $x = 8$. Número cromossômico $2n = 16$ foi descrito para *M. pittieri* (Gould, 1966) e $2n = 32$ para *M. lolliforme* (Gould e Soderstrom, 1967). Este mesmo número de cromossomos ($2n = 32$) foi novamente descrito para esta espécie, coletada na Gran Sabana (Venezuela), com os cromossomos pareando-se apenas em bivalentes (Sede et al., 2010). Os estudos citogenéticos indicam que mais que 80% dos membros da família das gramíneas sofreram poliploidização durante alguma etapa de sua história evolutiva (Stebbins, 1985).

O número básico de cromossomos para as gramíneas parece ser $x = 6$ (Hunziker e Stebbins, 1986). Todavia, o número básico secundário $x = 12$ parece ter dado origem aos poliplóides com número de cromossomos elevados. A partir de $x = 6$, por aneuploida, o número básico aumentou para $x = 7$ ou reduziu para $x = 5$ e, a partir de $x = 12$, originaram-se os número básicos $x = 11, 10, 9$ e 8 (Hunziker e Stebbins, 1986). De acordo com Stebbins (1982), o número básico $x = 8$, encontrado em *Mesosetum chaseae* e também em todo o gênero, é raro entre as gramíneas.

Embora não se tenha mensurado os cromossomos de *M. chaseae* neste estudo, estes se mostraram muito grandes durante a meiose (Figura 2) quando comparados com outros membros da família Poaceae, como *Paspalum*, *Panicum* e *Brachiaria*. Segundo Stebbins (1982), o tamanho dos cromossomos varia enormemente entre as gramíneas, variando de $0,6 \mu\text{m}$ na família Bambusoideae a quase $10 \mu\text{m}$ em *Secale*. Esta variação enfatiza a grande diversidade biológica dentro da família.

4.2. Microsporogênese

Os estudos da microsporogênese em *M. chaseae* mostraram dados compatíveis com a presença de diploidia ($2n = 2x = 16$). No paquíteno, os

cromossomos pareados evidenciaram grandes blocos de heterocromatina (Fig. 2 a), possivelmente correspondentes a cromômeros. A associação cromossômica foi exclusivamente na forma de bivalentes (Fig. 2 b-f). A presença de dois quiasmas terminais foi predominante entre os bivalentes, todavia, bivalentes com um quiasma terminal também ocorreram. Três quiasmas por bivalente foram raros.

A variabilidade genética de uma espécie é, em grande parte, controlada pela recombinação de genes entre cromossomos homólogos. Evidências sugerem que os locais de permuta genética são, mais tarde, visíveis por meio da formação de quiasmas (Grant, 1958). Os quiasmas desempenham também um importante papel na manutenção de associação dos cromossomos homólogos até o final da metáfase I, a fim de permitir a ocorrência de perfeita disjunção cromossômica.

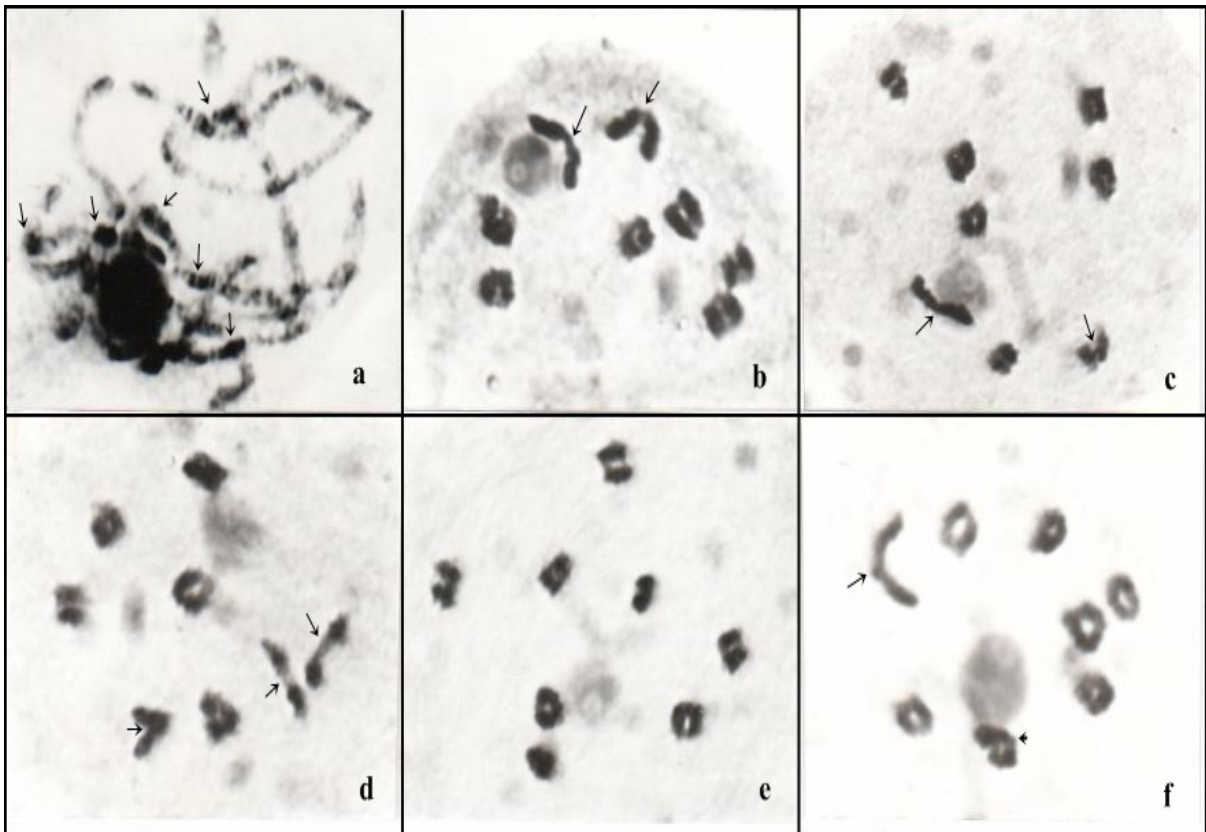


Figura 2 - Aspectos do comportamento cromossômico na prófase I em *M. chauseae*. a) Meiócito em paquíteno mostrando cromossomos pareados com densas regiões heterocromáticas (setas). b), c) Diacinese apresentando dois bivalentes com um quiasma terminal (seta) e seis bivalentes com dois quiasmas terminais. d) Diacinese com três bivalentes com um quiasma terminal (seta). e) Diacinese com oito bivalentes com dois quiasmas. f) Diacinese com um bivalente com um quiasma (seta), um bivalente com três quiasmas (cabeça de seta) e seis bivalentes com dois quiasmas.

Quando se assume que a permuta genética que ocorre na meiose é uma grande fonte de variabilidade, tem-se que admitir que a taxa de recombinação genética promovida por este evento depende não somente da frequência do mesmo, mas do local onde a permuta ocorre. Quando os quiasmas são estritamente terminais, o organismo, apesar da alta frequência de quiasmas, está livre de recombinação. Segundo Sybenga (1992), isto tem uma consequência genética marcante, pois certas regiões cromossômicas que contêm genes que conferem certo valor adaptativo são mantidas sempre em equilíbrio de ligação. Hillel et al. (1973) discutem que quiasmas terminais teriam apenas a função física de manter o bivalente para que haja uma perfeita segregação de cromossomos homólogos, enquanto os quiasmas intersticiais seriam efetivos em recombinação.

Em *M. chaseae*, as anormalidades meióticas se caracterizaram pela ocorrência de segregação cromossômica irregular em ambas as divisões. Ascensão precoce de cromossomos para os pólos em metáfase I e II (Fig. 3 e, f) e cromossomos retardatários em anáfase I (Fig. 3 a-c) e anáfase II levaram à formação de micronúcleos em telófase I (Fig. 3 d) e telófase II (Fig. 3 g) e também em tétrades (Fig. 3 h). Em poucos casos, os micronúcleos das tétrades foram isolados por citocinese, dando origem a políades (Fig. 3 i). O Quadro 2 mostra a frequência de anormalidades meióticas nos acessos analisados. A primeira divisão foi, em geral, mais afetada que a segunda divisão. Isto é comum em plantas, uma vez que na metáfase os quiasmas terminais podem sofrer terminalização e dar origem a univalentes que migram para os pólos precocemente, explicando porque esta fase foi a mais afetada em quase todos os acessos. A percentagem de tétrades anormais foi baixa, sendo que alguns acessos não apresentaram nenhuma anomalia no produto final da meiose.

Anormalidades meióticas em populações nativas de diplóides são raras, quando comparadas com poliplóides. Pagliarini (2000) descreve anormalidades similares às observadas em *M. chaseae* em inúmeras espécies diplóides, anormalidades essas que comprometeram a viabilidade polínica por gerarem gametas geneticamente desbalanceados.

É interessante observar que em *M. chaseae* nenhum acesso mostrou poliploidia, pois em *M. lolliforme*, espécie que chega a ser confundida com a primeira, tetraploidia já foi identificada (Gould e Soderstrom, 1967; Sede et al., 2010).

Em gêneros de gramíneas nativas, como é o caso de *Brachiaria* (Mendes-Bonato et al., 2002; Utsunomiya et al., 2005; Pagliarini et al., 2008), a maioria das espécies são poliplóides e apomíticas. Sexualidade tem sido encontrada apenas em acessos diplóides, salvo raras exceções. A diploidia observada em *M. chaseae*, aliada aos estudos da megagametogênese, sugere que esta espécie apresenta reprodução sexuada, facilitando enormemente cruzamentos para obtenção de híbridos intra e interespecíficos.

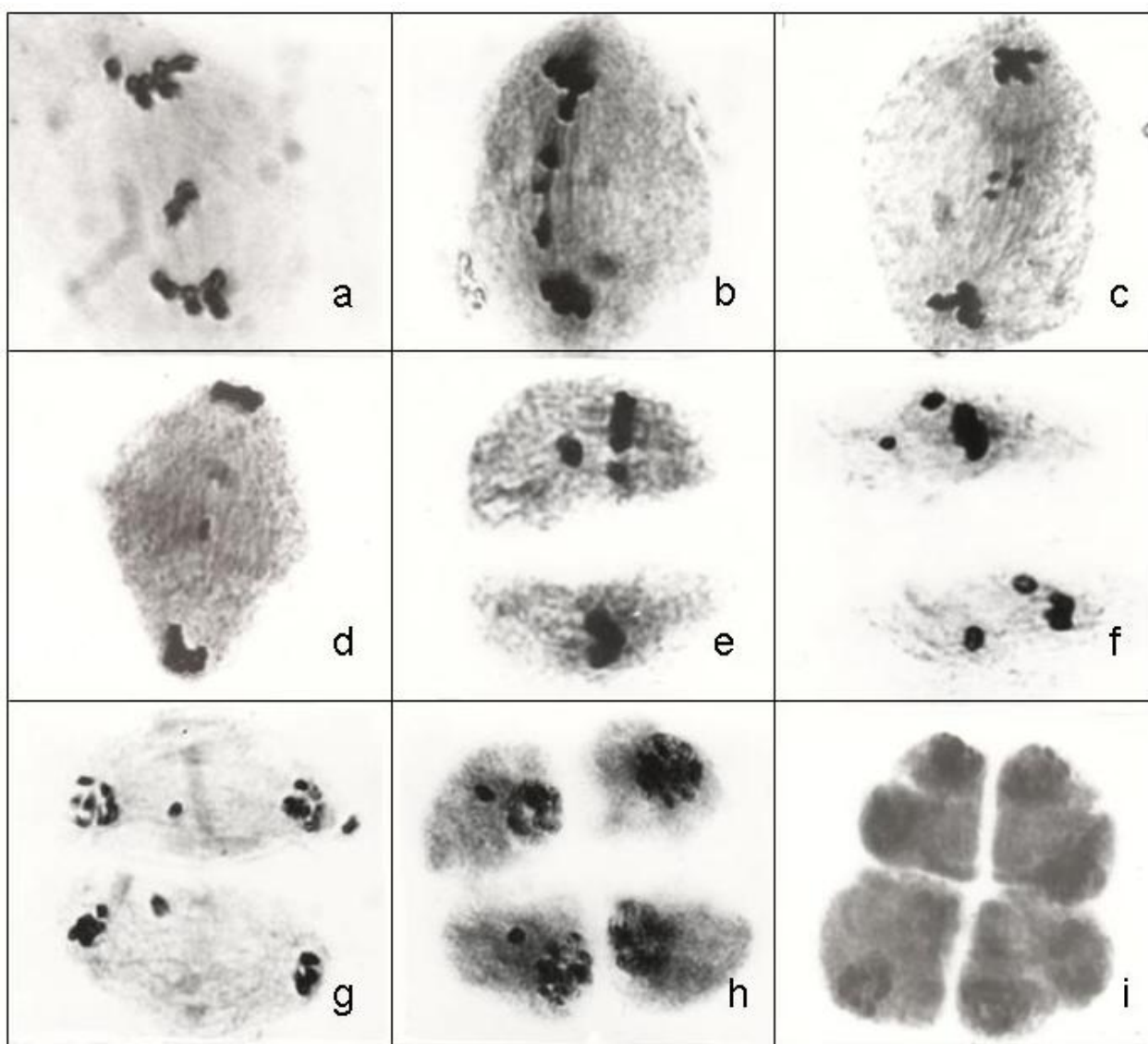


Figura 3 - Aspectos do comportamento meiótico em *M. chaseae*. a-c) Meiócitos em anáfase I com cromossomos retardatários. d) Telófase I com micronúcleo central. e, f) Metáfase II com cromossomos em ascensão precoce. g) Telófase II com micronúcleos. h) Tétrade com micronúcleo em dois micrósporos. i) Políade.

Quadro 2 - Percentagem de células com anormalidades meióticas nos acessos de *M. chauseae* analisados

Fase	Metáfase I	Anáfase I	Telófase I	Prófase II	Metáfase II	Anáfase II	Telófase II	Tétrade	
Anormalidades	Ascensão precoce	Retardatários	Micronúcleos	Micronúcleos	Ascensão precoce	Retardatários	Micronúcleos	Micronúcleos	
Acesso	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	No. PMCs analisadas/ % PMCs anormais	Total de PMCs*
1	2078 / 4,72	345 / 6,67	925 / 9,19	493 / 2,43	301 / 4,98	201 / 3,48	368 / 5,71	1893 / 0,74	6604
2	549 / 18,62	211 / 21,80	266 / 4,14	20 / 0,49	203 / 3,94	205 / 0,68	205 / 1,95	438 / 1,14	2097
3	225 / 5,38	224 / 0,45	311 / 4,82	207 / 0,00	209 / 0,00	211 / 0,00	206 / 2,43	218 / 0,00	1811
4	316 / 0,00	230 / 0,00	273 / 0,73	203 / 0,00	200 / 0,00	226 / 0,00	231 / 0,00	213 / 3,29	1892
5	311 / 2,25	211 / 0,47	286 / 0,35	237 / 0,00	201 / 0,00	210 / 0,00	236 / 0,00	229 / 0,44	1921
6	305 / 11,80	200 / 3,00	306 / 0,65	251 / 0,00	220 / 1,36	208 / 0,48	263 / 0,00	419 / 0,00	2172
7	242 / 0,00	207 / 0,00	227 / 1,32	208 / 0,00	201 / 0,00	203 / 0,00	211 / 0,00	239 / 3,35	1738
8	349 / 10,60	239 / 0,42	200 / 0,50	230 / 0,00	265 / 1,51	204 / 0,00	244 / 1,23	254 / 0,00	1985
9	248 / 5,25	234 / 0,85	212 / 0,00	234 / 0,00	210 / 0,00	212 / 0,00	231 / 0,00	269 / 0,00	1850
24	583 / 16,45	217 / 1,38	205 / 1,46	215 / 0,00	242 / 7,02	242 / 0,00	209 / 0,00	236 / 1,27	2149

*PMCs: células mães do grão de pólen (pollen mother cells).

4.3. Microgametogênese

Os estudos da microgametogênese em plantas dos dez acessos mostraram que esta segue o padrão preconizado para membros da família Poaceae, ou seja, após sua liberação da tétrade, os micrósporos cresceram e tornaram-se arredondados (Fig. 4a). O núcleo que ocupava posição central migrou para a periferia para uma posição oposta ao poro do pólen. Nesse período, a parede externa do pólen, a exina, foi sintetizada (Fig. 4 b, c). A mitose do micrósporo ocorreu, sendo que todas as suas fases puderam ser claramente observadas (Fig. 4 c-i). Como produto dessa divisão, duas células com diferentes tamanhos foram formadas: uma célula grande, a célula vegetativa (Fig. 4 j), e uma célula pequena, a célula generativa (Fig. 4 j).

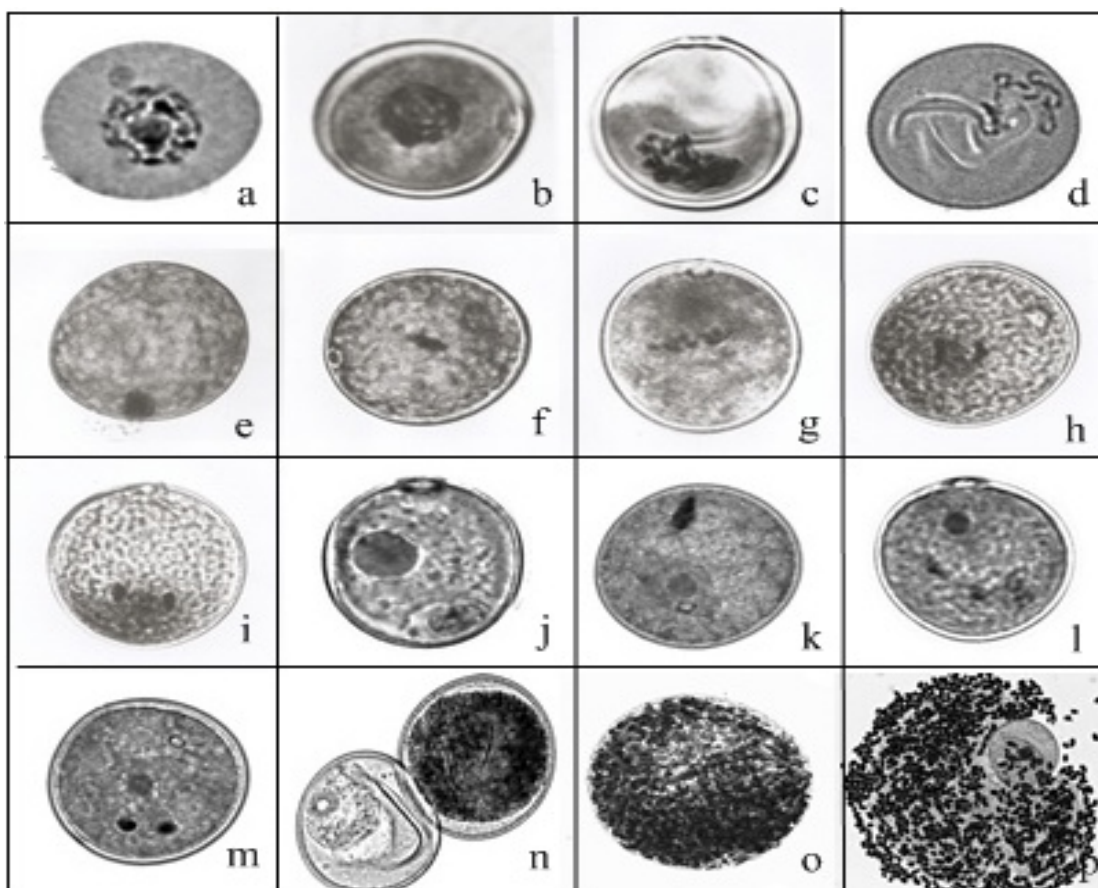


Figura 4 - Desenvolvimento do micrósporo até grão de pólen tricelular em *M. chaseae*. a) Micrósporo isolado da tétrade com núcleo central. b). Parede de exina sendo formada em micrósporo em prófase. c, d) Prófares com diferentes graus de condensação cromossômica. f, g) Metáfases. h) Anáfase. i) Telófase. j) Grão de pólen com célula vegetativa e célula generativa. k) Metáfase. l) Anáfase da mitose do grão de pólen. m) Grão de pólen trinucleado. n) Grão de pólen viável e inviável (claro). o) Grão de pólen cheio de amiloplastos. p) Grão de pólen rompido mostrando centenas de amiloplastos corados com lugol.

A célula generativa apresentou um núcleo condensado e uma quantidade de citoplasma reduzido quando comparada com a célula vegetativa (Fig. 4 j). Neste produto da divisão mitótica do micrósporo (o grão de pólen), o núcleo generativo entrou em mitose, ou seja, teve lugar a mitose do grão de pólen. Nesta, também, todas as fases puderam ser observadas (Fig. 4 k-m). Após as duas mitoses, o grão de pólen se mostrou fortemente corado devido à presença de grande quantidade de amiloplastos (Fig. 4 n-p). Grãos de pólen estéreis mostraram-se desprovidos de amiloplastos (Fig. 4 n).

4.4. Megagametogênese

Os estudos da megagametogênese em *M. chaseae* revelaram a presença de um saco embrionário típico de gramíneas, ou seja, com oito células dispostas no tipo *Polygonum*. Todavia, as células antipodais, as sinérgides e a oosfera nem sempre podiam ser facilmente observadas. A célula central, por outro lado, foi sempre muito evidente. Em seu interior, quando observada sem coloração, visualizava-se uma grande quantidade de grânulos (Fig. 5 a) que, quando corados com lugol, mostraram-se marron escuro (Fig. 5 b), caracterizando a presença de amiloplastos com amido em seu interior.

Em muitas espécies, a célula central é rica em plastídeos (amiloplastos) (Kapil e Bhatnagar, 1981). O citoplasma da célula central é volumoso, pois é local de estocagem de material de reserva nutritiva. A composição citoquímica da célula central mostra que, em contraste com a célula ovo, ela não é caracterizada pela alta taxa de atividade metabólica, mas contém reservas nutritivas para serem utilizadas durante a fertilização e crescimento inicial do endosperma. A rápida formação de amido na célula central parece ser uma preparação para a futura fase de diferenciação (Bhatnagar e Johri, 1972; Kapil e Bhatnagar, 1981; Grenham e Chapman, 1990; Batagyna, 2002).

Nos últimos anos, a estrutura multicelular do gametófito feminino (saco embrionário) tem se mostrado como um excelente modelo para o estudo do destino de células especializadas, como sinérgides, antípodas, célula central e oosfera. Uma grande quantidade de genes específicos tem sido identificada (Yang et al., 2010).

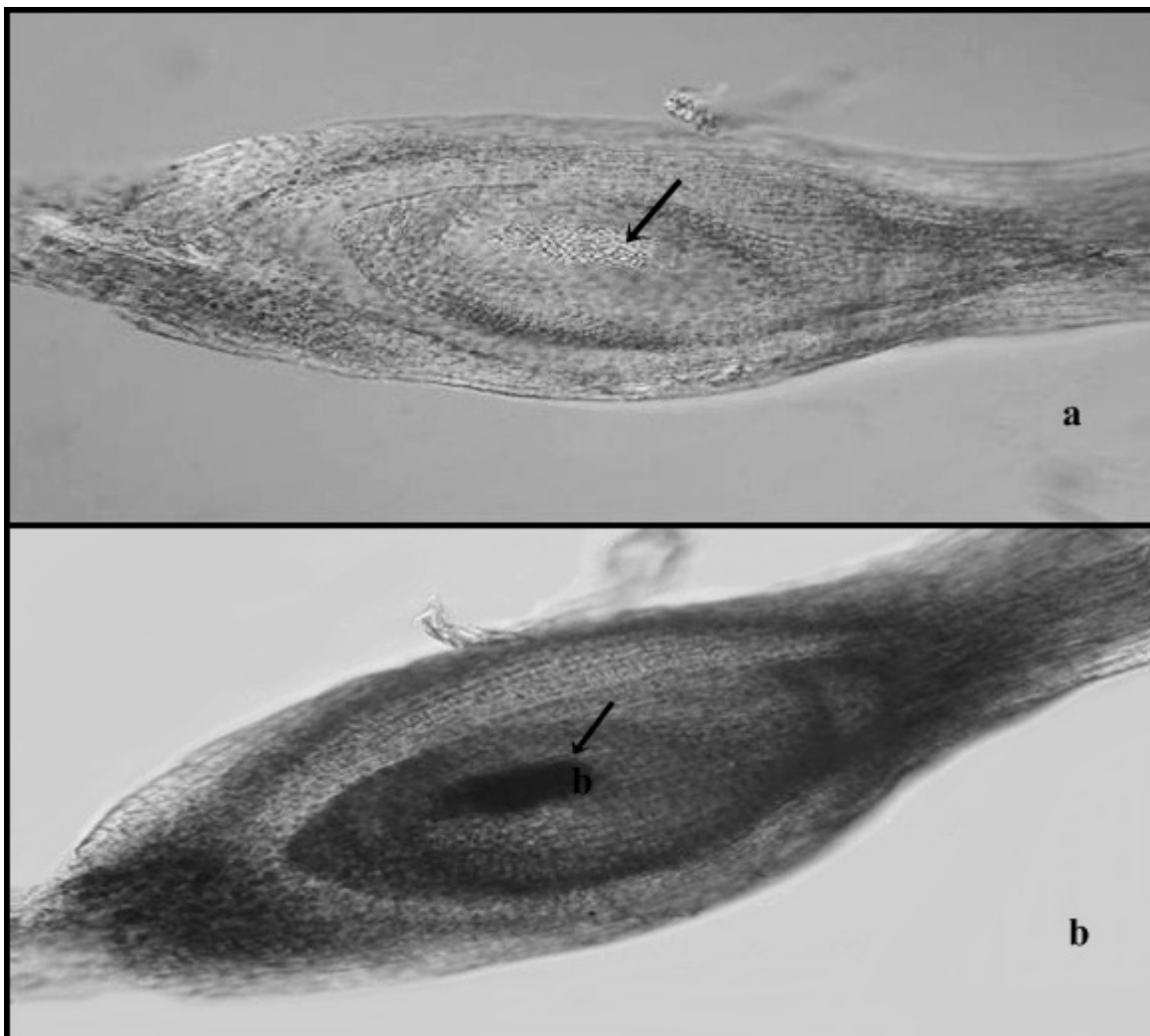


Figura 5 - Ovário de *M. chauseae* evidenciando a célula central do saco embrionário sem (a) e com (b) coloração com lugol.

4.5. Viabilidade do pólen

O Quadro 3 mostra os valores médios da viabilidade polínica obtidos para cada acesso com os corantes utilizados. A variação na indicação de viabilidade polínica entre os corantes não foi muito grande. Tome-se como exemplo o acesso 1, cuja variação de viabilidade foi de 86,85 com lugol a 89,4% com carmim propiônico. Entre os acessos também houve variação no índice de viabilidade polínica. Por exemplo, o acesso 7 apresentou a menor viabilidade entre os dez acessos analisados considerando os três corantes empregados, enquanto o acesso 9 apresentou a maior viabilidade também para estes três corantes. O erro padrão da média com valores com valores variáveis e elevados para alguns acessos,

repetindo-se para cada corante, mostra que houve variação na viabilidade de pólen entre as dez flores analisadas de um mesmo acesso. A Figura 6 mostra, comparativamente, grãos de pólen viáveis e inviáveis corados diferentemente com os três tipos de corantes utilizados.

Quadro 3 - Viabilidade polínica média e erro padrão da média para as três diferentes colorações em *M. chaseae*

Acesso	Viabilidade polínica (% média)		
	Lugol 2%	Carmim propiônico 1%	Safrablau
1	86,8 ± 12,0	89,4 ± 8,3	88,1 ± 10,1
2	77,6 ± 18,8	77,8 ± 16,3	75,4 ± 18,9
3	75,8 ± 28,2	62,6 ± 39,4	72,7 ± 31,5
4	63,3 ± 31,0	69,9 ± 17,7	65,3 ± 31,1
5	76,9 ± 15,2	76,1 ± 12,8	73,4 ± 24,7
6	87,6 ± 12,6	79,4 ± 15,2	91,3 ± 6,1
7	58,6 ± 38,7	66,9 ± 31,5	64,7 ± 33,0
8	81,2 ± 12,8	85,4 ± 25,6	83,5 ± 9,4
9	94,6 ± 4,4	93,1 ± 5,9	95,5 ± 4,1
24	83,2 ± 8,9	86,2 ± 10,0	84,5 ± 10,9

Os testes de viabilidade de pólen revelaram que qualquer um dos corantes pode ser utilizado com a mesma eficiência para a avaliação desta característica. Todavia, o teste do lugol é o mais rápido de ser realizado, pois tão logo o iodo entra em contato com o amido do grão de pólen, abundante em *Mesosetum chaseae*, a coloração se efetiva.

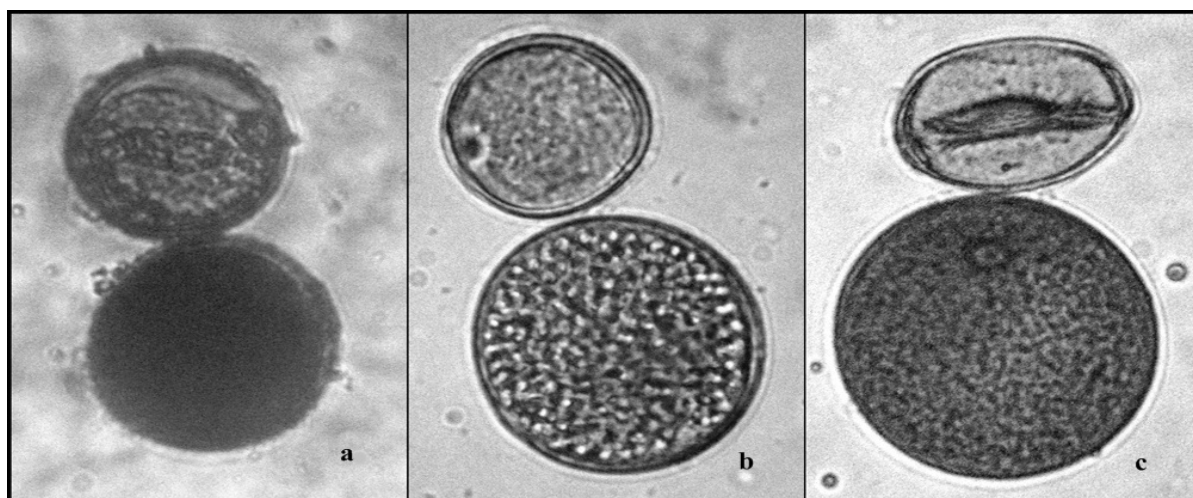


Figura 6 - Coloração dos grãos de pólen de *M. chaseae* com os seguintes corantes: a) Lugol. b) Carmim propiônico. c) Safrablau. Grãos de pólen cheios e corados indicam viabilidade.

Após sua liberação, os grãos de pólen são expostos às condições ambientais por períodos variáveis antes que sejam depositados no estigma. Dependendo das condições climáticas e duração da exposição, a qualidade do pólen pode ser afetada. Muitos fatores podem influenciar na viabilidade polínica de uma espécie. Shivanna (2003) apresenta uma lista de fatores que podem afetar este caráter. Em Poaceae, como é o caso de *Mesosetum*, a rápida perda de viabilidade está associada à alta capacidade de dessecação, que não deve ultrapassar a 50% (Shivanna, 2003).

Outro fator que deve contribuir para a redução da viabilidade polínica em *M. chaseae* é o fato de a espécie apresentar grãos de pólen com três células (uma vegetativa e duas espermáticas). Estudos comparativos com grãos de pólen com duas ou três células (Johri e Shivanna, 1977) revelaram uma estreita correlação entre a citologia do pólen e sua viabilidade. Grãos de pólen com duas células (vegetativa e generativa) retêm a viabilidade por um período de tempo maior que aqueles com três células.

Estudos têm demonstrado que a taxa de respiração em grãos de pólen com três células, mantidos sob hidratação, é 2-3 vezes maior que a dos grãos de pólen com duas células. Altas temperaturas, como as encontradas no Pantanal mato-grossense, também aumentam a taxa de respiração em ambos os tipos de grãos de pólen, mas afeta mais aqueles com três células (Hoeskstra e Bruinsma, 1975). Assim, a alta atividade respiratória, aumentada pelas altas temperaturas do habitat de *Mesosetum chaseae* podem ser a causa da perda da viabilidade polínica nesta espécie com grãos de pólen com três células.

Fatores citogenéticos também devem ter contribuído para a redução da viabilidade do pólen. As anormalidades encontradas, relacionadas à segregação irregular de cromossomos em ambas as divisões, geram micrósporos geneticamente desbalanceados que se tornam estéreis. A influência de anormalidades meióticas sobre a viabilidade do pólen tem sido demonstrada em inúmeras espécies (Pagliarini, 2000; Singh, 2003).

A viabilidade polínica pode ser considerada alta em *Mesosetum chaseae* e a quantidade de pólen em uma panícula é abundante. Uma vez que há variabilidade para viabilidade polínica entre as plantas de um mesmo acesso, antes de se realizar cruzamentos para hibridização, testes de viabilidade devem ser realizados para se determinar quais plantas serão os melhores progenitores.

4.6. Receptividade do estigma

Nos dez acessos analisados, a receptividade do estigma foi total. A Figura 7 ilustra o aparelho reprodutivo feminino mostrando o ovário com os dois estiletes com inúmeras bolhas de oxigênio nos estigmas.

Segundo Lankinen et al. (2007), para aumentar o conhecimento sobre a evolução do sistema de cruzamento, precisamos entender a relação entre caracteres florais específicos e o sistema de cruzamento.

O sucesso de um programa de melhoramento será maior se acompanhado por testes sobre o tempo e a durabilidade da receptividade do estigma, a qual pode variar desde poucas horas até dez dias. A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, germinação do pólen, coloração ou realizando testes para atividade enzimática (Shivanna, 2003).

A receptividade do estigma é estudada com os seguintes propósitos: (1) identificar a idade floral ótima para procedimentos de polinização artificial; (2) averiguar a eficiência da polinização; (3) interferência entre as funções masculinas e femininas; (4) sistemas de cruzamentos; (5) determinar a eficácia relativa de visitas do polinizador feitas nas flores durante diferentes estágios da antese. A receptividade do estigma é um estágio crucial na maturação da flor que pode influenciar enormemente a taxa de autopolinização, o sucesso da polinização nos diferentes estágios no ciclo de vida da flor, a importância relativa de vários polinizadores, a interferência entre as funções masculinas e femininas, a taxa de competição via transferência de pólen impróprio e as chances de seleção gametofítica (Galen et al., 1987).

Um dos aspectos característicos da reprodução sexual em angiospermas é a interação do gametófito feminino, o grão de pólen e o tubo polínico originado deste, com o tecido esporofítico do pistilo. Os eventos principais que ocorrem durante a interação pólen-pistilo são o reconhecimento e a subsequente aceitação ou rejeição do parceiro masculino pelo pistilo. Se o grão de pólen é compatível, todos os eventos pós-polinização, seja a germinação do pólen, a entrada do pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico através do estilo, procedem normalmente, resultando em fertilização e desenvolvimento de semente. Se o pólen é incompatível, o pistilo paralisa efetivamente um ou mais destes eventos pós-polinização e, conseqüentemente, previne a fertilização. A interação pólen-pistilo é,

então, assunto de grande importância na biologia da reprodução sexual geralmente porque o grão de pólen é efetivamente selecionado pelo pistilo antes que os gametas possam alcançar o saco embrionário para efetuar a fertilização (Shivanna e Sastri, 1981).

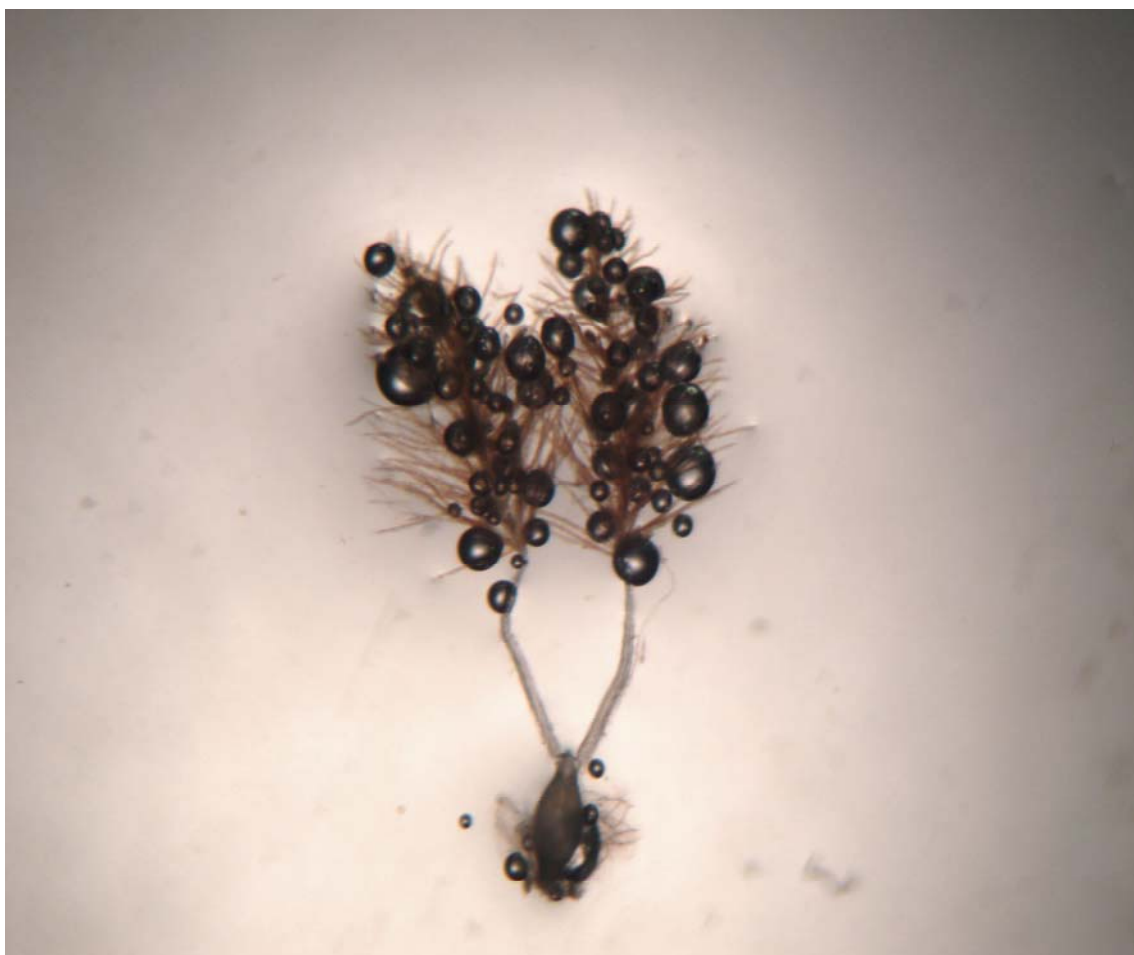


Figura 7 - Aparelho reprodutor feminino de *M. chaseae* mostrando as bolhas resultantes de reação química do peróxido de hidrogênio com a peroxidase sobre os estigmas.

Nos últimos anos, maior atenção tem sido dada aos detalhes da superfície receptiva do estigma onde a interação inicial entre o grão de pólen e o pistilo acontece. Um ponto importante desta investigação tem sido a demonstração da presença de proteínas. Estigmas receptivos são caracterizados por alta atividade enzimática. Assim, a maioria dos métodos para determinar a receptividade do estigma *in vitro* baseia-se na identificação da atividade enzimática (Knox et al., 1986; Dafni, 1992; Kearns e Inouye, 1993; Dafni e Motte Maués, 1998). Na prática, cada

método deve ser calibrado para cada espécie de planta e, se possível, por comparação da germinação do pólen *in vivo* no estigma (Stone et al., 1995; Dafni e Motte Maués, 1998).

4.7. Sistema reprodutivo

Dentre as 1099 espiguetas analisadas, apenas uma produziu sementes. A não produção de sementes em isolamento é uma indicação de que a espécie é alógama. Todavia, testes mais acurados devem ser realizados para comprovar esta hipótese. As plantas alógamas são altamente heterozigotas e, quase sem exceção, a endogamia forçada resulta numa deterioração geral do vigor. Existe um grande potencial para o surgimento de recombinações em alógamas. Isto ocorre porque a fecundação cruzada proporciona às populações uma grande expressão e manutenção da variabilidade genética (Pinto, 1995).

Embora a heterozigose e a fecundação cruzada resultem em alta flexibilidade, a seleção natural preservou a existência de blocos de ligação extensos fazendo com que a variabilidade seja liberada de forma lenta e gradual. Neste contexto, voltamos a chamar a atenção para a localização dos quiasmas em *M. chaseae*, que se mostraram preferencialmente terminais, preservando as regiões intersticiais de recombinação.

5. CONCLUSÕES

As análises citogenéticas, modo de reprodução e sistema reprodutivo dos dez acessos de *M. chaseae* coletados no Pantanal sul-mato-grossense revelaram:

a) Todos os acessos apresentaram se diplóides, com $2n = 2x = 16$ cromossomos, concordando com o número já descrito para o gênero.

b) Os quiasmas apresentaram, preferencialmente, localização terminal, sendo mais frequentes dois quiasmas por bivalente. Bivalentes com três quiasmas foram raros.

c) Anormalidades meióticas ocorreram em baixa frequência e foram relacionadas à segregação irregular de cromossomos em ambas as divisões.

d) A microgametogênese seguiu o padrão preconizado para membros da família Poaceae, gerando grãos de pólen tricelular.

e) A megagametogênese também seguiu o padrão típico de angiospermas (saco embrionário do tipo *Polygonum*) com a célula central muito evidente, caracterizando um saco embrionário sexual.

f) Uma grande quantidade de amiloplastos foi identificada nos grãos de pólen e célula central do saco embrionário.

g) A viabilidade do pólen foi variável entre os acessos e entre plantas dentro de acesso, sendo, em geral, alta.

h) Todos os corantes utilizados mostraram-se eficientes na indicação da viabilidade polínica.

i) Estigmas de flores em antese mostraram alta receptividade quando testados com peróxido de hidrogênio.

j) O sistema reprodutivo se mostrou típico de alogamia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense**. Brasília: Embrapa-DDT, 1987. 339p.
- ALVAREZ, J.M.; ROCHA, J.F.; SANTOS, S.A.; MACHADO, S.R. Anatomia foliar de *Mesosetum chaseae* Luces (Poaceae) vegetando em diferentes ambientes com e sem influência de pastejo na sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul-Mato-Grossense. In: 4º SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 2004. **Resumos...** Corumbá: SIMPAN, 2004. Disponível em CD Room.
- BARNABAS, B.; KOVACS, M. Storage of pollen. In: SHIVANNA, K.R.; SAWHNEY, V.K. (eds.). **Pollen biotechnology of crop production and improvement**. New York: Cambridge University Press, 1987, p. 293-314.
- BATAGYNA, T.B. **Embryology of flowering plants: terminology and concepts. Vol. 1: Generative organs of flower**. Enfield: Science Publishers. 2003. 421p.
- BEDINGER, P. The remarkable biology of pollen. **Plant Cell**, 4:879-887, 1992.
- BHATNAGAR, S.P.; JOHRI, B.M. Development of seed angiosperm. In: KOSLOWSKI, T.T. (ed.). **Seed biology: importance, development and germination**, New York: Academic Press, 1972. p. 34-39.
- CARDOSO, E.L.; SANTOS, S.A.; ARAÚJO, M.T.B.; PELLEGRIN, L.A. Altimetria de unidades de paisagem na sub-região da Nhecolândia. In: 4º SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 2004. **Resumos...** Corumbá: SIMPAN, 2004. Disponível em CD Room.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1992. 249p.
- DAFNI, A.; MOTTE MAUÉS, M. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**, 11:177-180, 1998.
- DAVIDSE, G.H.; POHL, R.W. Chromosome numbers, meiotic behavior and notes on some grasses from Central America and the West Indies. **Canadian Journal of Botany**, 50:1441-1452, 1972.

- DUPUIS, I.; DUMAS, C. Biochemical markers of female receptivity in maize (*Zea mays* L.) assessed using *in vitro* fertilization. **Plant Science**, 70:11-20, 1990.
- EDLUND, A.F.; SWANSON, R.; PREUSS, D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **Plant Cell**, 16:84-97, 2004.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FÁVERO, A.P.; LOPES, M.A. Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. (eds.). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Brasília: Embrapa. 2008, p. 45-62.
- FÁVERO, A.P.; LOPES, M.A.; FALEIRO, F.G. Estado da arte do pré-melhoramento de espécies vegetais. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. (eds.). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Brasília: Embrapa, 2008. p. 31-42.
- FERREIRA, M.E. Genotipagem de coleções de germoplasma vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JÚNIOR, W.Q. (eds.). **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Brasília: Embrapa, 2008. p. 77-89.
- FILGUEIRAS, C.S. Revisão de *Mesosetum Steudel* (Gramineae: Paniceae). **Acta Amazônica**, 19:47-114, 1989.
- GALEN, C.; PLOWRIGHT, R.C.; THOMPSON, J.D. Floral biology and regulation of seed set and size in the lily, *Clintonia borealis*. **The American Journal of Botany**, 72:1544-1552, 1985.
- GALEN, C.; ZIMMER, K.A.; NEWPORT, M.E. Pollination and floral scent morphs of *Polemonium viscosum*: a mechanism for disruptive selection on flower size. **Evolution**, 41:599-60, 1987.
- GARCIA, E.A.C. **Análise técnico-econômica da pecuária bovina do Pantanal - sub-regiões de Nhecolândia e de Paiaguás**. Corumbá: Embrapa-CPAP. 1986. 92p. (Embrapa-CPAP, Circular Técnica, 15).
- GODOI FILHO, J.D. Aspectos geológicos do Pantanal Mato-Grossense e de sua área de influência. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, Corumbá, 1984. **Resumos...** Brasília: Embrapa-DDT, 1984, p. 63-76.

- GOULD, F.W. Chromosome numbers of some Mexican grasses. **Canadian Journal of Botany**, 44:683-1696, 1966.
- GOULD, F.W.; SODERSTROM, T.R. Chromosome numbers of tropical American species. **The American Journal of Botany**, 54:676-683, 1967.
- GRANT, V. The regulation of recombination in plants. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 23:337-363, 1958.
- GRENNHAM, J.; CHAPMAN, G.P. **Ovule structure and diversity**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 296p.
- HARIKARUNAKAR, D.; HARIPRIYA, K. Floral biology of aggregatum onion (*Allium cepa* var. aggregatum). **Madras Agricultural Journal**, 86:166-169, 2000.
- HERRERO, M. Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 358:1019-1024, 2003.
- HESLOP-HARRISON, J. Genetics and physiology of angiosperm incompatibility systems. **Proceedings of the Royal Society of London Series Botany**, 190:275-299, 1978.
- HESLOP-HARRISON, Y. Control gates and micro-ecology: the pollen-stigma interaction in perspective. **Annals of Botany**, 85 (supplement A):5-14, 2000.
- HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, 41:1233-1258, 1977.
- HILLEL, J.; FLEDMAN, N.W.; SIMCHEM, G. Matting systems and pollination structure in two closely related species of the wheat groups. III. Chiasma frequency and population structure. **Heredity**, 31:1-9, 1973.
- HISCOCK, S.J. Pollen-stigma interactions. In: TABAH, D.A.; HISCOCK, S.J. (eds.). **Encyclopedia of plant and crop science**. New York: Marcel Dekker, 2004, p. 1035-1037.
- HISCOCK, S.J.; COLEMAN, J.O.D.; DEWEY, F.M.; DICKINSON, H.G. Identification and localization of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus* L. **Planta**, 193:377-384, 1994.

HISCOCK, S.J.; HOEDEMAEKERS, K.; FRIEDMAN, W.E.; DICKINSON, H.G. The stigma surface and pollen-stigma interactions in *Senecio squalidus* (Asteraceae) following cross (compatible) and self (incompatible) pollinations. **International Journal of Plant Sciences**, 163:1-16, 2002.

HOEKSTRA, F.A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Plant Physiology**, 34:21-225, 1975.

HUNZIKER, J.H.; STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in the Gramineae. In: SODERSTROM, T.R.; HILU, K.W.; CAMPBELL, C.S.; BARKWORTH, M.E. (eds.). **Grass: Systematics and Evolution**. Washington D.C: Smithsonian Institution Press, 1986. p. 179-187.

JAIN, A.; SHIVANNA, K.R. Loss of viability during storage is associated with changes in membrane phospholipid. **Phytochemistry**, 28:999-1002, 1989.

JOHRI, B.M.; SHIVANNA, K.R. Physiology of 2 - and 3-celled pollen. **Phytomorphology**, 27:98-106, 1977.

JÚNIOR, J.H.C.; SANDANIELO, A.; CANAPPELE, C.; PRIANTE FILHO, N.; MUSIS, C.R.; SORIANO, B.M.A. Climatologia. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (Pantanal) - PCBAP. **Diagnóstico dos meios físicos e bióticos: meio físico**. Brasília: MMA, 1997, p. 295-334.

KAPIL, R.N.; BHATNAGAR, A.K. Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. **International Review of Cytology**, 70:291-343, 1981.

KEARNS, A.C.; INOUE, D.W. **Techniques for pollination biologists**. University of Colorado Press. 1993. 583p.

KNOX, R.B.; WILLIAMS, E.G.; DUMAS, C. Pollen, pistil, and reproductive function in crop plants. **Plant Breeding Reviews**, 4:9-79, 1986.

LANKINEN, A.; ARMBRUSTER, W.S.; ANTONSEN, L. Delayed stigma receptivity in *Collinsia heterophylla* (Plantaginaceae): genetic variation and adaptive significance in relation to pollen competition, delayed self-pollination, and mating-system evolution. **American Journal of Botany**, 94:1183-1192, 2007.

MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. McGraw-Hill Book Company: New York, 1978. 453p.

- McCORMICK, A. Male gametophyte development. **Plant Cell**, 5:1265-1275, 1993.
- MCINNIS, S.M.; COSTA, L.M.; GUTIÉRREZ-MARCOS, J.F.; HENDERSON, C.A.; HISCOCK, S.J. Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class II peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). **Plant and Molecular Biology**, 57:659-677, 2005.
- MCINNIS, S.M.; EMERY, D.C.; PORTER, R.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T.; HISCOCK, S.J. The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). **Journal of Experimental Botany**, 57:1835-1846, 2006.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; FORLI, F.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, 125:419-425, 2002.
- NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, 56:581-587, 2000.
- PAGLIARINI, M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, 23:997-1002, 2000.
- PAGLIARINI, M.S.; POZZOBON, M.T. Meiose em células vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: PEÑALOZA, A.P.S (ed.). **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 24-41.
- PAGLIARINI, M.S.; RISSO-PASCOTTO, C.; SOUZA-KANESHIMA, A.M.; VALLE, C.B. Analysis of meiotic behavior in selecting potential genitors among diploid and artificially induced tetraploid accessions of *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae). **Euphytica**, 164:181-187, 2008.
- PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento de plantas**. Maringá: Eduem, 1995. 275p.
- POHL, R.W.; DAVIDSE, G. Chromosome numbers of Costa Rican grasses. **Brittonia**, 23:293-324, 1971.
- SANTOS, S.A.; ABREU, U.G.P.; COMASTRI FILHO, J.A.; CRISPIM, S.M.A.; VALLS, J.F.M.; PEÑALOZA, A.P.S. Recursos genéticos de gramíneas forrageiras para a

- pecuária. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Campo Grande, 2004. **Resumos...** Campo Grande: SBZ/UCDB, 2002, p. 336-337.
- SANTOS, S.A.; COSTA, C.; SOUZA, G.S. Identificação da composição botânica da dieta de bovinos criados em pastagens nativas na sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31:1648-1662, 2002.
- SEDE, S.; ESCOBAR, A.; MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O. Chromosome studies in American Paniceae (Poaceae, Panicoideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 97:128-138, 2010.
- SHIVANNA, K.R. **Pollen biology and technology**. Enfield: Science Publishers, 2003. 301p.
- SHIVANNA, K.R.; SATRI, D.C. Stigma-surface esterase activity and stigma receptivity in some taxa characterized by wet stigmas. **Annals of Botany**, 47:53-64, 1981.
- SINGH, H.K.; SRIVASTAVA, K.K. Floral biology of bael (*Aegle marmelos*) cultivars. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, 70:797-798, 2000.
- SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. London: CRC Press, 2003. 463p.
- STEBBINS, G.L. Major trends of evolution in the Poaceae and their possible significance. In: ESTES, J.R.; TYRL, R.J.; BRUNKEN, J.N. (eds.). **Grasses and grasslands: systematics and ecology**. Norman: University of Oklahoma Press, 1982. p. 3-36.
- STEBBINS, G.L. Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 72:824-832, 1985.
- STONE, J.L.; THOMSON, J.D.; DENT-ACOSTA, S.J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal of Botany**, 82:1186-1197, 1995.
- STÖSSER, R.; HARTMANW, A.; ANVARY, S.F. General aspects of pollination and fertilization of pome and stone fruit. **Acta Agriculture**, 423:23-26, 1997.
- STPICZYNSKA, M. Stigma receptivity during the life span of *Platanthera chlorantha* Custer (rchb.) flowers. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, 45:37-41, 2003.

- SWANSON, R.; EDLUND, A.F.; PREUSS, D. Species specificity in pollen-pistil interactions. **Annual Review of Genetics**, 38:793-818, 2004.
- SYBENGA, J. **General cytogenetics**. Amsterdam: North-Holland, 1992. 469p.
- THOMPSON, J.D.; BARRET, S.C.H. Temporal variation of gender germination, pollen tube growth, effective pollination period, and fruit set of pear. **Horticultural Science**, 20:733-735, 1985.
- UTSUNOMIYA, K.S.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). **Biocell**, 29:295-301, 2005.
- WELINDER, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural**, 2:388-393, 1992.
- YANG, W.C.; SHI, D.Q.; CHEN, Y.H. Female gametophyte development in flowering plants. **Annual Review of Plant Biology**, 61:89-108, 2010.
- YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. Cleared-pistyl and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, 57:1668-1672, 1979.
- ZEISLER, M. Über die Abgrenzung des eigentlichen Narbenfläche mit Hifle von Reaktionen. **Botanisches Zentralblatt: Beihefte**, A58:308-318, 1938.