

ANÁLISE REPRODUTIVA E PALINOLÓGICA DE CAPIM-ELEFANTE
(*Pennisetum purpureum*)

ADRIELEN LAIZA VALIGUZSKI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2021

ANÁLISE REPRODUTIVA E PALINOLÓGICA DE CAPIM-ELEFANTE
(*Pennisetum purpureum*)

ADRIELEN LAIZA VALIGUZSKI

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Orientadora: Prof^a.PhD. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V172

Valiguzski, Adrielen Laiza.

Análise reprodutiva e palinológica de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) / Adrielen Laiza Valiguzski. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

64 f. : il.

Bibliografia: 39 - 48.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.
Orientadora: Telma Nair Santana Pereira.

1. Grãos de pólen. 2. Viabilidade polínica. 3. Receptividade do estigma. 4. Morfologia polínica. 5. Poaceae. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

ANÁLISE REPRODUTIVA E PALINOLÓGICA DE CAPIM-ELEFANTE
(*Pennisetum purpureum*)

ADRIELEN LAIZA VALIGUZSKI

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2021

Comissão Examinadora



Prof. Pedro Corrêa Damasceno Júnior (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) - UFRRJ



Prof.ª Helaine Christine Cancela Ramos (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) - UENF



Prof. Rogério Figueiredo Daher (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF



Prof.ª Telma Nair Santana Pereira (Ph.D, Plant Breeding) - UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, sem ele nada seria possível. A minha família por todo o apoio. A todos os meus amigos, por me ensinarem que amigos são a família que a vida nos dá.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me dar forças para superar os desafios da vida e nunca me deixar desistir.

Aos meus pais Ângela Maria Anhalt Valiguzski e Reinaldo Valiguzski, por todo apoio e amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Felipe Alan Valiguzski e José Lucas Valiguzski que sempre torceram por mim e contribuíram para que a caminhada fosse mais leve. E a toda minha família.

Ao meu namorado Fabio Romario Guerra que sempre me acompanhou e me incentivou nessa caminhada.

A todos os meus amigos, em especial, a Cleudiane Lopes Leite, Alex de Souza Rodrigues, Daniel Miranda, Rosimara Barboza Bispo, Débora Mendes e Kevelin Barbosa Xavier por todos os conselhos e ajuda durante a realização do trabalho.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar a formação acadêmica que me fez crescer no campo profissional.

A minha orientadora Telma Nair Santana Pereira pela excelente orientação e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Rogério Figueiredo Daher, Helaine Christine Cancela Ramos e ao doutor Pedro Corrêa Damasceno Junior, pelos comentários e alterações sugeridas e pelo aceite em participar da banca de defesa.

Ao professor Rogério Figueiredo Daher por ceder o material genético que foi utilizado no trabalho e toda a sua equipe em especial a Cleudiane Lopes Leite, Josefa Grasiela Silva Santana e João Esdras Calaça Farias pela ajuda nas coletas realizadas em campo.

Aos colegas do laboratório de citogenética vegetal por toda ajuda durante o decorrer do mestrado.

Aos pós-doc Larissa Souza Vianna e Samuel Henrique Kamphorst por toda ajuda e conselhos durante a realização do trabalho.

Ao secretário José Daniel, pela paciência, preocupação em nos atender e auxiliar no decorrer do mestrado.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
1.1.2.1. Geral.....	4
1.2.2.2. Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.3.3.1. Capim-elefante: Origem, aspectos gerais e utilização da cultura	5
1.4.3.2. Melhoramento Genético do Capim-elefante	7
1.5.3.3. Citogenética do Capim-elefante	9
1.6.3.4. Viabilidade Polínica e Receptividade do Estigma.....	10
1.7.3.5. Palinologia	12
4 . MATERIAL E MÉTODOS	15
1.8.4.1 Material Genético e Condução Do Experimento.....	15
1.9.4.2 Viabilidade polínica.....	16
1.10. 4.3 Viabilidade polínica por horário	17
1.11. 4.4 Receptibilidade do estigma	18
1.12. 4.5 Caracterização Palinológica	19
1.13. 4.6 Análise estatística	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
1.14. 5.1. viabilidade polínica	23
1.15. 5.2. viabilidade polínica por horário.....	26

1.16. 5.3 Receptividade do estigma	30
1.17. 5.4 Análise palinológica.....	33
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Relação e procedência dos dezoito acessos de capim-elefante da coleção de germoplasma.	16
Tabela 2. Classificação dos grãos de pólen quanto a forma com base na razão entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E).	21
Tabela 3. Classificação do tamanho dos grãos de pólen, de acordo com o comprimento de seu maior eixo.	21
Tabela 4. Classificação do tipo de abertura do grão de pólen utilizando a relação entre a largura e o comprimento da abertura.	21
Tabela 5. Classificação da espessura da exina do grão de pólen em relação a espessura da exina e o eixo equatorial.....	22
Tabela 6. Resumo da análise de variância da característica viabilidade polínica dos 18 acessos de capim-elefante.....	23
Tabela 7. Teste de médias da porcentagem de grãos de pólen viáveis dos 18 acessos de capim-elefante (P. purpureum), do banco de Germoplasma da UENF.....	24
Tabela 8. Resumo da análise de variância da viabilidade polínica por horários dos acessos de capim-elefante.....	26

Tabela 9. Porcentagem média de grãos de pólen viáveis de capim-elefante, por horário de coleta, registrados em Campos dos Goytacazes.....	28
Tabela 10. Resumo da análise de variância da receptividade do estigma dos 8 acessos de capim-elefante.....	30
Tabela 11. Porcentagem média de estigmas receptível por dia de coleta (1, 2, 3, 5, 7, 9,11) dos acessos 3, 11, 26, 33, 34, 47, 51, 58 de capim-elefante do banco de germoplasma da UENF.....	32
Tabela 12. Caracterização morfológicas dos grãos de pólen dos acessos estudados de capim-elefante.	34
Tabela 13. Medidas (μm) em vista equatorial do diâmetro equatorial (DE) e diâmetro polar (DP), da razão entre o eixo polar e o eixo equatorial (DE/DP) e diâmetro da exina e suas subdivisões (sexina e nexina) e o índice de exina (IE) dos grãos de pólen de capim-elefante, seguida dos valores de média (m), faixa de variação (FV), desvio padrão da amostra (s) coeficiente de variação (CV %) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC).....	35
Tabela 14. Medidas (μm) em vista polar do diâmetro do poro, do comprimento da abertura (CA) e da largura da abertura (LA) dos grãos de pólen de capim-elefante, seguida dos valores de média (m), faixa de variação (FV), desvio padrão da amostra (s), coeficiente de variação (CV %) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC).....	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Abertura em poro; B) Aberturas em colpo; C) Abertura em colporo. Fonte Plá Júnior et al. (2006) 14
- Figura 2.** Representação das medidas dos grãos de pólen de capim-elefante: A) diâmetro polar (preto), diâmetro equatorial (amarelo), em vista equatorial; B) diâmetro (vermelho), comprimento (branco) e largura (roxo) da abertura em vista polar. Barra = 5 μm20
- Figura 3.** Grãos de pólen de capim-elefante corados com a solução tripla de Alexander. A) a seta em vermelho indica grãos de pólen viáveis B) seta em preto indica grãos de pólen inviáveis. Barra = 5 μm25
- Figura 4.** Regressão linear da viabilidade polínica por horário dos acessos de capim-elefante do BAG UENF.27
- Figura 5.** Regressão linear da porcentagem média da receptividade do estigma (%) do capim-elefante em relação a onze dias de coleta em oito acessos analisados.....31
- Figura 6.** Panícula e espiguetas do capim-elefante. A) panícula emergindo da folha bandeira (da esquerda para direita). B) estigma receptível (seta preta) corada em preta pela solução alfa-naftil acetato, estigma não receptível (seta vermelha).31

Figura 7. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *P. purpureum*. A) Grãos de pólen em vista polar, B) grãos de pólen em vista equatorial. Barra = 5 μm34

RESUMO

VALIGUZSKI, Adrielen Laiza; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro, 2021; Análise reprodutiva e palinológica de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Helaine Christine Cancela Ramos.

Este trabalho teve por objetivo fazer a caracterização reprodutiva e palinológica de 18 acessos de capim-elefante do banco de germoplasma da UENF. A coleção de germoplasma de capim-elefante está implantado na Estação Experimental da PESAGRO-RIO, em Campos dos Goytacazes-RJ. A coleta do material foi realizada de junho a julho de 2020. O preparo e observações das amostras foram realizadas no Laboratório de Citogenética Vegetal. Para a análise da viabilidade polínica foram coletados pendões florais de 18 acessos de capim-elefante e conservados em solução fixadora, as lâminas foram montadas utilizando três anteras e duas gotas de solução tripla de Alexander. Foram preparadas oito lâminas por acesso, sendo contabilizados 250 grãos de pólen por lâmina, os grãos de pólen foram classificados em viáveis ou inviáveis. Na análise da viabilidade polínica por horário foram selecionados cinco acessos de capim-elefante ao acaso onde foram realizados cinco horários de coleta indo de 8h30min até 16h30min, com um intervalo de duas horas entre as coletas, os pendões coletados foram armazenados em solução fixadora. Para estimar a viabilidade polínica foi utilizada a mesma metodologia anteriormente citada. Na análise da receptividade do estigma foram selecionados oito acessos onde foi marcado um

pendão e as análises foram realizadas por onze dias. Em cada dia de coleta foram analisadas dez espiguetas por pendão. As espiguetas foram submergidas imediatamente no corante alfa-naftil acetato por cinco minutos, e lavadas com água destilada, foram contabilizados os estigmas receptivos e não receptíveis. Para a caracterização morfológica polínica foram utilizados os grãos de pólen conservados dos 18 acessos de capim-elefante. Os grãos de pólen passaram pelo processo de acetólise, e posteriormente foram realizadas 25 medições de cada característica do pólen. A solução tripla de Alexander foi eficiente para identificar e classificar os grãos de pólen, a maioria dos acessos apresentaram alto percentual médio de viabilidade, menos os acessos 7 e 33 que apresentaram baixa viabilidade. Os acessos 47, 41, 26 e 62 apresentaram as maiores médias de viabilidade, portanto são os melhores candidatos para uso no programa de melhoramento do capim-elefante como doadores de pólen. Nos cinco horários de avaliação da viabilidade polínica observou-se que o horário de coleta tem uma relação negativa no percentual médio de viabilidade dos grãos de pólen ao longo dia. Foi constatado maior percentual de pólen viáveis e maior quantidade de pólen nas anteras nos horários das 8h30min às 10h30min. Recomenda-se que os futuros cruzamentos em capim-elefante sejam realizados entre o 3º e 5º dia após o pendão começar a emergir da folha bandeira, pois é nesse período que foram observadas maiores porcentagens de estigmas receptíveis. Os grãos de pólen do capim-elefante foram classificados como monoporado, esférico, tamanho médio, com abertura do tipo poro e com exina muito fina.

Palavra-chave: Grãos de pólen; Viabilidade polínica; Receptividade do estigma; Morfologia polínica; Poaceae.

ABSTRACT

VALIGUZSKI, Adrielen Laiza; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2021; Reproductive and palynological analysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*). Advisor: Telma Nair Santana Pereira; Committee members: Messias Gonzaga Pereira e Helaine Christine Cancela Ramos.

This work presents the reproductive and palynological characterization of 18 accessions of elephant grass from the UENF germplasm bank. The elephant grass germplasm collection is conserved at PESAGRO-RIO Experimental Station, in Campos dos Goytacazes-RJ. The collection of the material was carried out from June to July 2020. The preparation and observations of the samples were carried out at the Plant Cytogenetics Laboratory. For pollen viability analysis, tassels were collected from 18 accessions in a fixative solution. The slides were prepared using three anthers and two drops of Alexander's triple solution. Eight slides were prepared per access, and 250 pollen grains per slide were classified and counted as viable or non-viable. In the analysis of pollen viability by time schedule, five accessions of elephant grass were selected at random, where five time schedule were carried out, from 8:30AM to 4:30PM, with an interval of two hours among them. The collected tassels were stored in fixing solution. To estimate pollen viability, the same methodology mentioned previously was used. In the analysis of the receptivity of the stigma, eight accessions were selected in each accession, a tassel was marked and the analyzes were carried out for eleven days. On each

collection day, ten spikelets per tassel were analyzed. The spikelets were immediately immersed in the alpha-naphthyl acetate dye for five minutes, and washed with distilled water, receptive and non-receptive stigmas were counted. To characterize pollen morphology, pollen grains from the 18 accessions of elephant grass were used. The pollen grains were submitted to the acetolysis technique, and subsequently 25 pollen grains were measured for each pollen characteristic. Alexander's triple solution was efficient to identify and classify pollen grains, most of the accessions had a high average viability percentage, except accessions 7 and 33 which presented low viability. Accessions 47, 41, 26 and 62 showed the highest viability averages, so they are the best candidates for use in the elephant grass breeding program as pollen donors. In the five pollen viability assessment times, it was observed that the collection time has a negative relationship on the average viability percentage of pollen grains throughout the day. It was observed a higher percentage of viable pollen and a greater amount of pollen in the anthers between 8:30 AM and 10:30 PM. It is recommended that future crosses in elephant grass be carried out between the 3rd and 5th day after the tassel starts to come out of the flag leaf, because it is in this period that the highest percentages of receptive stigmas were observed. The pollen grains of elephant grass were classified as monoporous, spherical, medium size, with pore-type opening and with very fine exine.

Keywords: Pollen grains; Pollen viability; Stigma receptivity; Pollen morphology; Grasses.

1. INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea forrageira originária da África, capaz de se desenvolver em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Foi introduzida no Brasil entre 1920 e 1921, onde encontrou boas condições de clima e solo para seu desenvolvimento, se adaptando a praticamente todo território nacional (Brunken, 1977; Lima e Deminicis, 2008).

É uma espécie utilizada principalmente na alimentação animal na forma de capineira, silagem e em menor escala para pastejo direto (Nascimento et al., 2008; Garcia et al., 2011; Monteiro et al., 2011). Nos últimos anos, o capim-elefante vem se destacando devido ao seu grande potencial na produção de bioenergia, sendo considerada como a principal forrageira utilizada para esse fim, principalmente por ser uma espécie com alta eficiência na fixação de CO₂ durante o processo da fotossíntese por ser de metabolismo C₄, auxiliando também na formação de biomassa vegetal e na capacidade de acumulação de matéria seca (Samson et al., 2005).

Devido ao seu grande potencial, vários programas de melhoramento genético realizam pesquisas utilizando o capim-elefante, seja para ser utilizado na alimentação animal (Lucatto Junior, 2008; Gomide et al., 2015) ou para fins energéticos (Rossi et al., 2014; Freitas et al., 2018), principalmente com o objetivo de identificar e obter genótipos superiores. Segundo Menezes et al. (2016) a hibridação é considerada uma das melhores estratégias para se obter indivíduos

superiores, pois os híbridos podem ter desempenho produtivo superior ao dos seus genitores.

Acessos representativos da espécie foram doados pela Embrapa gado de leite e introduzidos no programa de melhoramento da UENF, visando o desenvolvimento de variedades adaptadas para a região Norte-Noroeste Fluminense. Considerando que é uma espécie introduzida, é importante se conhecer o modo de reprodução (autógama ou alógama) da espécie já que influencia fortemente na determinação das estratégias a serem adotadas em um programa de melhoramento genético de plantas. Desta forma, a possibilidade de cruzamento entre progenitores selecionados requer o conhecimento da viabilidade polínica, assim como a receptividade do estigma nos indivíduos a serem cruzados (Stiehl-Alves e Martins, 2008).

A viabilidade polínica é um dos fatores que têm influência direta sobre o sucesso da fertilização, pois a capacidade de germinar e formar o tubo polínico depende diretamente da sua viabilidade. Em condições normais, o grão de pólen perde rapidamente a sua viabilidade e dependendo da espécie pode variar de minutos, horas a um dia (Souza et al., 2002; Costa et al., 2012). Outro fator importante para a fertilização das espécies é a receptibilidade do estigma, que influencia grandemente a taxa de fertilização. O tempo de receptividade do estigma pode variar de poucas horas a 10 dias dependendo da espécie. Fatores como horário do dia, idade da flor e a presença ou ausência de exsudato no estigma são fatores que podem influenciar a receptividade do estigma (Dafni, 1992; Stiehl-Alves e Martins, 2008).

Os grãos de pólen são as estruturas reprodutivas masculinas das plantas; e a palinologia estuda as características morfológicas externas dos grãos de pólen e esporos (Erdtman, 1952). Os grãos de pólen possuem uma grande diversidade morfológica, portanto, conhecer suas características como tamanho, formato, número e tipo de aberturas germinativas, estrutura e escultura da parede são importantes para fins taxonômicos, evolução, melhoramento genético e de conservação de germoplasma (Erdtman, 1952; Melhem et al., 2003; Plá Júnior et al., 2006).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) possui um programa de pesquisa em melhoramento genético focado em capim-elefante, e considerando o número reduzido de trabalhos na área, o presente

trabalho busca obter informações sobre os aspectos reprodutivos e palinológicos dos acessos, que poderão ser úteis ao programa de melhoramento genético de capim-elefante.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo do presente trabalho foi efetuar a caracterização reprodutiva e palinológica de 18 acessos de capim-elefante do banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, visando gerar conhecimento básico sobre a espécie.

2.2. Específicos

- Conhecer a viabilidade polínica média dos 18 acessos analisados;
- Analisar a viabilidade dos grãos de pólen coletados em cinco horários distintos ao decorrer do dia;
- Avaliar a receptividade do estigma de oito acessos visando uma orientação para futuros cruzamentos;
- Caracterizar a morfologia externa dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Capim-elefante: Origem, aspectos botânicos e agronômicos

O capim-elefante (*P. purpureum*) pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, gênero *Pennisetum*. O gênero *Pennisetum* possui mais de 140 espécies (Brunken, 1977), várias dessas espécies possuem potencial para uso como forrageiros. Entre elas, destacam-se o *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) e *Pennisetum glaucum* (L) R. Br. (milheto) ambas as espécies são importantes forrageiras cultivadas nas regiões tropicais do planeta e empregadas na obtenção de híbridos intra e interespecíficos em programas de melhoramento genético (Reis et al., 2015). Outras espécies do gênero são utilizadas como plantas ornamentais como *Pennisetum villosum* e *Pennisetum setaceum* (Zhang et al., 2015).

A África tropical tem sido apontada como o centro de origem e de diversidade do capim-elefante, onde ocorre naturalmente em vários países, desde a Guiné, no Oeste, até Moçambique e Quênia, no leste africano (Brunken, 1977). O capim-elefante foi descoberto e divulgado como forrageira pelo coronel Napier Springer. Foi introduzido no Brasil entre 1920 e 1921 pelos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo, a partir de mudas trazidas dos Estados Unidos e de Cuba, respectivamente, posteriormente foram disseminados por todo o país (Guerra, 2002).

O capim-elefante é uma gramínea tropical, alógama e protogínica. O intervalo entre o aparecimento dos estigmas e das anteras varia de sete a nove dias, o que dificulta a autofecundação e facilita a realização de cruzamentos controlados (Brunken, 1977).

É uma espécie comumente propagada vegetativamente (Italiano, 2004), mas também pode ser propagada por sementes. Entretanto, esse tipo de propagação não é utilizado comercialmente, pois, as sementes desta espécie apresentam uma baixa taxa de germinação e vigor da semente (Veiga, 1990).

Suas características morfológicas apresentam ampla variação fenotípica (Brunken, 1977), de forma geral é uma espécie que pode ser caracterizada como perene, hábito de crescimento cespitoso, colmos eretos, cilíndricos, glabros e preenchidos por um parênquima suculento, dispostos em touceiras variando de 3,5 a 6,0 m de altura, com entrenós de 15 a 20 cm e diâmetro de até 2,5 cm; raízes grossas e rizomatosas. As folhas atingem até 1,25 m de comprimento por 4,0 cm de largura, nervura central larga de cor mais clara, disposição alternada, bainha lanosa, fina, estriada, lígula curta e ciliada (Bogdan, 1997; Deresz, 1999).

Além disso, a espécie possui inflorescências do tipo panículas espiciformes com espiguetas aladas e verticiladas e pedicelos persistentes. As panículas possuem formato cilíndrico, 13 a 30 cm de comprimento, densamente floridas por espiguetas isoladas ou em grupos, e as flores podem ser masculinas ou bissexuais. As sementes ou cariopses são muito pequenas e, após o amadurecimento, desprendem-se com facilidade da panícula (Bogdan, 1997; Deresz, 1999).

O capim-elefante é uma das mais importantes forrageiras cultivadas no Brasil, amplamente difundida por todo o país devido a capacidade de tolerar condições climáticas desfavoráveis como seca e frio. É uma espécie com grande eficiência fotossintética (metabolismo C₄), altamente eficiente na fixação de CO₂, possui elevada capacidade de produção de biomassa e elevado teor de fibras (Samson et al., 2005).

A espécie é bastante utilizada na formação de capineiras, para ser cortada e fornecida no cocho para os animais, assim como na produção de silagem, e em menor escala é utilizada para pastejo rotacionado (Nascimento et al., 2008; Garcia et al., 2011; Monteiro et al., 2011).

A biomassa do capim-elefante também é utilizada como fonte de energia

renovável (bioenergia) e nos últimos anos vem se destacando como umas das principais espécies forrageiras utilizadas para este fim, principalmente pela alta produção de matéria seca, altos teores de fibra, lignina, celulose e baixa demanda de insumos para produção (Samson et al., 2005; Freitas et al., 2018)

A utilização da biomassa de capim-elefante pode ser feita por meio de quatro formas distintas, pela combustão direta, pela gaseificação, pelo carvoejamento e pela hidrólise do bagaço (álcool) (Seye, 2003).

Com a atual perspectiva de esgotamento das reservas de fontes energéticas de origem fóssil, o uso da biomassa como insumo energético vem ganhando importância na discussão sobre o desenvolvimento de alternativas para uma matriz energética mundial mais sustentável (Borges et al., 2016).

3.2. Melhoramento Genético do Capim-elefante

O melhoramento genético é a arte e a ciência que visa à modificação genética das plantas para torná-las mais úteis ao homem. Teve seu início quando os primeiros humanos começaram a agricultura, selecionando as melhores plantas e sementes em vez de pegar aleatoriamente o que a natureza fornecia. O melhoramento genético das plantas está entre as principais contribuições da ciência para o bem estar da sociedade (Fehr, 1939; Borém et al., 2017).

Entre as diversas contribuições do melhoramento genético de plantas, destacam-se o aumento de produtividade, melhoria da qualidade dos alimentos, introdução de genes para resistência a pragas e doenças, melhoria da arquitetura da planta, precocidade, uniformidade das plantas, variedades adaptadas para colheita mecanizada (ex. algodão e cana-de-açúcar), desenvolvimento de variedades adaptadas a determinadas regiões onde, naturalmente, a produção comercial seria impossível de ser praticada (ex. soja) e o desenvolvimento de cultivares híbridas (Borém et al., 2017; Amabile et al., 2018).

Inicialmente, o melhoramento do capim-elefante tinha como objetivo a obtenção de genótipos superiores para serem utilizados como forrageira na alimentação animal, tanto para pastejo como para formação de capineiras (Veiga, 1990; Nascimento et al., 2008; Garcia et al., 2011). Nos últimos anos, vem crescendo o número de estudos, realizados para utilizar a biomassa do capim-elefante como fonte de bioenergia (Morais et al., 2009; Marafon et al., 2014;

Sousa et al., 2016).

Os métodos de melhoramento genético adotados em cada espécie vegetal estão diretamente relacionados com o sistema reprodutivo, assim como a forma de propagação. Dessa forma, as metodologias de melhoramento desenvolvidas para plantas alógamas podem ser empregadas no capim-elefante. Entretanto, deve-se salientar algumas características da cultura, que podem favorecer os métodos de melhoramento; dentre elas, destacam-se elevado número de inflorescências por planta, propagação vegetativa e por meio de sementes, germoplasma com ampla variabilidade e possibilidade de cruzamento interespecífico (Pereira et al., 2001; Pereira et al., 2003).

Devido ao seu grande potencial tanto para fins forrageiros e energéticos, empresas de pesquisa como a Embrapa gado de leite e a Empresa Mato-grossense de Pesquisa, Assistência e Extensão Rural (Empaer- MT) e várias universidades realizam melhoramento do capim-elefante.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) possui um Banco Ativo de Germoplasma (BAG/UENF) instalado em 2010 com 86 genótipos de capim-elefante provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa gado de leite e vem realizando diversos estudos com a cultura, visando obter genótipos adaptados às condições edafoclimáticas da Região Norte Fluminense.

O primeiro estudo realizado sobre diversidade genética de clones de capim-elefante (*P. purpureum* schum) baseado em marcadores de DNA (RAPD e ISSR) (Lima 2011; Lima et al., 2011). Os trabalhos realizados posteriormente foram todos focados em identificar e selecionar genótipos de capim-elefante que apresentassem características morfológicas e de produção de biomassa para fins energéticos (Oliveira, 2014; Oliveira et al., 2014; Menezes, 2014; Rocha, 2015; Rocha et al., 2015; Menezes et al., 2015; Silva, 2016; Silva et al., 2016; Rodrigues, 2016; Rodrigues et al., 2017; Souza, 2017; Souza et al., 2017 ;Silva et al., 2020).

Em paralelo com essa linha de pesquisa também foram desenvolvidos estudos com cruzamentos de genótipos superiores de capim-elefante e a avaliação dos híbridos de capim-elefante também para fins energéticos (Silva, 2016; Menezes et al., 2016; Vidal, 2018; Cassaro, 2018).

3.3. Citogenética do Capim-elefante

Pennisetum é um dos gêneros mais importantes da família das Poaceae. As espécies pertencentes a esse gênero constituem um grupo heterogêneo, que possuem uma variação no número básico de cromossomo ($x = 5, 7, 8$ e 9), morfometria cromossômica e genômica; de acordo com os níveis de ploidia variam de diplóide a octaplóide, comportamento reprodutivo (sexual ou apomítico) e ciclo de vida (anual, bienal ou perene) (Martel et al., 1997; Techio et al., 2006).

O gênero *Pennisetum* é dividido em três conjuntos gênicos, o primário é formado pelo milheto (*P. glaucum*), com $2n = 2x = 14$, juntamente com duas outras espécies diploide silvestres (*P. mollissimum* e *P. violaceum*). Já no segundo grupo encontra-se o capim-elefante (*P. purpureum*) com $2n = 4x = 28$ e, no conjunto terciário, as demais espécies do gênero (Harlan e Wet, 1971; Martel et al., 1996)

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide com $2n = 4x = 28$ e genoma A'A'BB, possui o número básico de cromossomo $x = 7$, e 4,59 pg de conteúdo de DNA (Martel et al., 1997; Jauhar e Hanna, 1998; Animasaun et al., 2019). Pesquisas realizadas evidenciam que os cromossomos do genoma A' do capim-elefante são homeólogos aos do genoma A do milheto e que os dois genomas estão evolutivamente não relacionados. Eles podem ter surgido de um progenitor comum com $x = 5$ cromossomos ou de espécies relacionadas com $x = 5$ cromossomos e evoluíram com divergência já que não há homologia entre os cromossomos dos genomas A"e A. Já os cromossomos do genomas B ainda não tem sua origem determinada (Jauhar, 1968; Techio et al., 2006b).

Estudos realizados por Pantulu e Venkateswarlu (1968), sobre a morfologia dos cromossomos de capim-elefante no paquíteno mostraram que os cromossomos 1 e 14 apresentam região organizadora de nucléolo, e o primeiro cromossomo mostrou-se 2,7 vezes maior que o último, caracterizando um cariótipo assimétrico.

Barbosa et al. (2003), avaliando o cariótipo de cinco acessos de capim-elefante do Banco ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite observaram que todos os acessos possuíam cromossomos metacêntricos e que a diferença de comprimento relativo entre o maior e o menor par de cromossomos, em alguns genótipos, é praticamente o dobro, podendo-se classificar tais cariótipos como

assimétricos.

Entretanto, neste mesmo estudo, alguns genótipos apresentaram a relação entre o maior e menor braço, menor que 2:1, portanto, o cariótipo desses genótipos enquadra-se na categoria simétrica. Isso pode ter ocorrido devido às alterações estruturais, como deleções e adições, que podem ter contribuído para aumentar ou diminuir a diferença de tamanho entre o maior e o menor cromossomo dos diferentes genótipos de capim-elefante, sendo esta divergência devido à variação intravarietal no capim-elefante (Barbosa et al., 2003).

Apesar de ser uma espécie alotetraplóide, o capim-elefante durante a meiose se comporta como um típico diplóide, apresentando frequente formação de 14 bivalentes na diacinese e metáfases (Techio et al., 2006b).

A meiose é um evento controlado por muitos genes, que atuam desde a mitose pré-meiótica até a pós-meiótica, e esses eventos sofrem grande influência do ambiente (Kaul e Murthy, 1985). O curso normal regular da meiose gera gametas viáveis, e, normalmente, uma alta porcentagem de grãos de pólen também viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular (Pagliarini, 2000; Techio et al., 2006b).

3.4. Viabilidade Polínica e Receptividade do Estigma

A viabilidade polínica é um dos fatores que influenciam diretamente no sucesso da fertilização, pois características como tamanho de fruto, número de sementes e a porcentagem de frutos tendem a aumentar quando uma quantidade de grãos pólen viáveis acima do requerido for depositada sobre o estigma (Dafni, 1992).

Estudos sobre a viabilidade polínica são de grande importância, pois contribuem para estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos, fornecendo informações básicas para a agricultura, para o planejamento de programas de melhoramento ou cultivo. A análise da viabilidade polínica é muito empregada no monitoramento do grão de pólen de modo a garantir a fecundação, tornando possível cruzamento entre genótipos de potencial econômico com floração em épocas distintas (Alexander, 1980).

Vale ressaltar que não há um protocolo universal para determinar a

viabilidade polínica aplicável a todas as espécies. No entanto, dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se os testes colorimétricos, que são rápidos e baratos e fornecem resultados seguros da viabilidade polínica (Flores et al., 2015). Os testes colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes nos grãos de pólen maduro. Dentre os corantes mais utilizados destacam-se a solução tripla de Alexander (Alexander, 1969), Lugol, 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), Sudan IV (Dafni, 1992) e o Carmim acético (Kearns e Inouye, 1993).

Techio et al. (2006a) testaram três diferentes corantes para estimar a viabilidade do grão pólen em acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos. Com corante orceína acético foram obtidas médias de viabilidade de 99,74% no capim-elefante, 99,78% em milho e 99,77% nos híbridos interespecíficos. Utilizando o corante carmim propiônico foram obtidas médias de viabilidade de 96,98% no capim-elefante, 98,82% em milho e 100% nos híbridos interespecíficos. Já utilizando o corante Alexander, as médias obtidas foram de 94% no capim-elefante, 100% em milho e 0,1% nos híbridos interespecíficos.

Segundo os autores, as altas taxas de pólen viáveis encontradas com os corantes orceína acético e carmim propiônico nos híbridos interespecíficos não era esperado, uma vez que híbridos entre *P. purpureum* x *P. glaucum* são descritos como estéreis devido as irregularidades meióticas (Jauha, 1981; Techio et al., 2006b). Por outro lado, o corante de Alexander confirmou que dentre os quatro acessos híbridos interespecíficos avaliados, três apresentam completa esterilidade (Techio et al., 2006a).

As análises utilizando o corante de Alexander fornecem dados mais acurados sobre a viabilidade do grão de pólen, pois se obtém coloração diferencial dos grãos de pólen viáveis e inviáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam coloração reversa. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Desta maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen inviáveis coram-se de verde e os viáveis adquirem uma coloração púrpura (Alexander, 1969).

Na abertura da flor, o grão de pólen está completamente viável e geralmente conforme o tempo avança, o grão de pólen fica exposto a fatores ambientais, dessa forma, o grão de pólen oxida e a viabilidade do grão de pólen

vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fertilização. Dessa forma, é de grande importância conhecer o período de viabilidade dos grãos de pólen, especialmente para utilizá-los em programas de hibridação (Souza et al., 2002).

Outro fator que influencia a taxa de fertilização e o sucesso da polinização é a receptividade do estigma (Souza et al., 2004). A receptividade do estigma pode variar de poucas horas até 10 dias, dependendo da espécie. A idade da flor, o horário do dia e a presença ou a ausência de exsudato no estigma são fatores que podem influenciar a receptividade do estigma (Dafni, 1992). A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, como, por exemplo, presença de exsudatos e mudança de coloração no estigma e por testes para verificação de enzimas ativas, como a peroxidase e a esterase (Dafni, 1992; Flores et al., 2015).

Para a avaliação da receptividade de estigmas, podem ser empregados vários métodos, utilizando reagentes distintos como peróxido de hidrogênio a 3%, peroxtesmo, solução de Baker e alfa-naftil. Todos esses métodos fornecem resultados confiáveis e semelhantes (Dafni, 1992).

3.5. Palinologia

Os grãos de pólen, também conhecidos como micrósporos, são as estruturas reprodutivas masculinas das angiospermas e das gimnospermas. Os grãos de pólen possuem uma parede de celulose lisa ou ornamentada que pode variar de acordo com a característica de cada grupo taxonômico. Os grãos de pólen, geralmente, são pequenos, arredondados, contendo estruturas que proporcionam o processo de polinização pelo vento, pela água, ou por meio de insetos (Morgado et al., 2013).

A palinologia é o estudo dos grãos de pólen e de esporos. A palinologia está amplamente relacionada com outras áreas da ciência como a melissopalynologia, farmacognosia, paleobotânica, paleoecologia, bromatologia, farmacologia, fitoecologia, zoocologia, sedimentologia, medicina legal, taxonomia vegetal, toxicologia, entre outras (Carreira, 1976; Plá Júnior et al., 2006).

A utilização da palinologia em vários ramos da ciência só é possível devido à grande variabilidade morfológica encontrada nos grãos de pólen, que

permite caracterizar famílias, gêneros e espécies. Essas características, estabelecidas geneticamente não estão sujeitas as variações das condições ambientais, o que as torna, em geral, bastante estáveis e de grande valor diagnóstico com aplicações amplas na taxonomia e evolução de plantas, mas também são importantes em campos aplicados como, por exemplo, melhoramento de plantas (Dafni et al., 2000; Melhem et al., 2003).

As principais características dos grãos de pólen e esporos são relacionadas ao tamanho, forma (polaridade, simetria), as aberturas e ornamentação (Erdtman, 1952; Plá Júnior et al., 2006).

Em relação ao tamanho, os grãos de pólen são classificados como muito pequenos ($< 10\mu\text{m}$), pequenos ($10\text{-}25\ \mu\text{m}$), médios ($25\text{-}50\mu\text{m}$), grandes ($50\text{-}100\mu\text{m}$) e gigantes ($>200\ \mu\text{m}$). Já a forma dos grãos de pólen é definida pela relação entre as medidas dos diâmetros polar e equatorial. Dessa forma, os grãos de pólen podem ser classificados como não-fixiformes quando não possuem forma definida ou fixiformes quando possuem forma definida (Erdtman, 1952; Plá Júnior et al., 2006).

Outro caráter morfológico de grande importância para a identificação do grão e pólen são as aberturas germinativas. As aberturas são orifícios que podem ser utilizados pelo grão de pólen para liberação do tubo polínico. As aberturas podem variar quanto a sua forma sendo classificadas como poro quando apresentam forma circular, colpo quando são alongadas com uma relação comprimento/largura superior a 2 e colpo poro quando ocorre uma associação com ambos os tipos (Figura 1). De acordo com sua posição na exina, as aberturas podem ser classificadas como ectoaberturas, endoaberturas ou mesoaberturas (Erdtman, 1952).

Uma das características que torna os grãos de pólen muito utilizado em vários estudos é a composição da sua parede, a exina, que é formada por polímeros de beta caroteno (esporopolenina) que a torna quase indestrutível em meio anaeróbico. Segundo a nomenclatura de Erdtman (1952), a exina, divide-se em uma parte esculpura, mais externa, a sexina, e em outra, não esculpura, a nexina. Por sua vez, a sexina é subdividida em duas camadas denominadas endosexina e ectosexina, enquanto a nexina é dividida em endonexina e ectonexina.

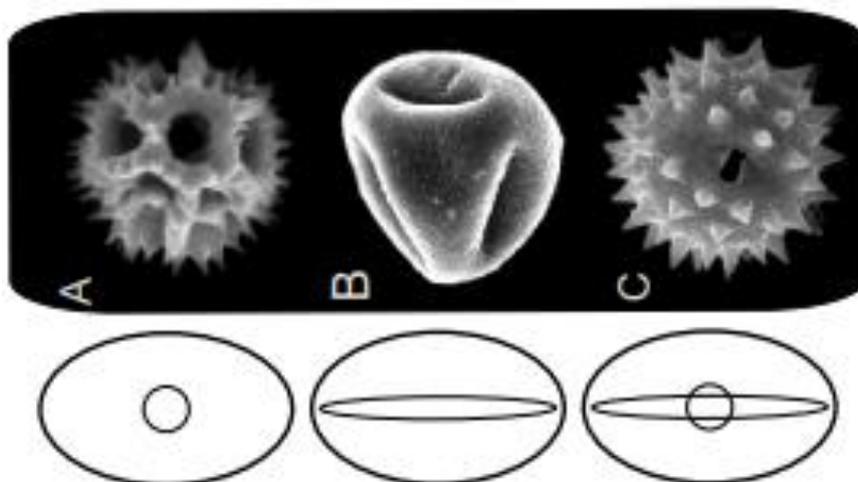


Figura 1. A) Abertura em poro; B) Abertura em colpo; C) Abertura em colporo. Fonte Plá Júnior et al. (2006)

Nos estudos palinológicos, a principal técnica utilizada é a acetólise, que consiste em submeter os grãos de pólen em uma solução contendo anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, o que permite a eliminação do conteúdo celular para observação da parede externa do pólen (Erdtman, 1952; Martins et al., 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Genético e Condução Do Experimento

A coleção de germoplasma de capim-elefante está implantada no campo experimental pertencente à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada nas dependências do Centro Estadual de Pesquisas em Agroenergia e Aproveitamento de Resíduos (CEPEAA), da Estação Experimental da PESAGRO-RIO, em Campos dos Goytacazes, RJ, situado a 21°44'47" S, 41°18'24" W e 11 m de altitude.

A coleta do material foi realizada de junho a julho de 2020. O preparo e observações das amostras foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) – setor de Citogenética Vegetal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Foram realizadas coletas do material genético de 18 acessos de capim-elefante. Os acessos foram previamente selecionado com base em estudos para potencial de produção de biomassa (Oliveira et al., 2013; Rocha et al., 2015) com base na diversidade genética (Lima et al., 2011) e quanto ao potencial forrageiro.

Tabela 1. Relação e procedência dos dezoito acessos de capim-elefante da coleção de germoplasma.

Acessos no BAG	Nome comum	Procedência
3	Três Rios	UFRRJ – Rio de Janeiro – RJ
7	Gigante de Pinda	Pindamonhangaba – SP
11	Porto Rico 534-B	UFV – Viçosa – MG
26	Elefante de Pinda	–
33	Taiwan A-46	UFRRJ – Rio de Janeiro – RJ
34	Duro de Volta Grande	UFRRJ – Rio de Janeiro – RJ
41	P241 Piracicaba	ESALQ – Piracicaba – SP
45	Gramafante	–
47	Guaco/I.Z.2	APTA – Nova Odessa – SP
48	Cuba-115	–
49	Cuba-116	–
51	King Grass	–
58	Napierzinho	Ribeirão Preto – SP
61	IJ 7127 cv EMPASC 309	EPAGRE– Itajaí – SC
62	IJ 7136 cv EMPASC 307	EPAGRE– Itajaí – SC
66	CAC-262	EPAGRE –Camburiú – SC
68	903-77 ou Australiano	–
74	Pasto Panamá	–

4.2 Viabilidade polínica

Para a análise da viabilidade polínica foram coletados pendões florais com espiguetas na pré-antese de capim-elefante e conservados em solução fixadora de etanol e ácido acético (3:1) por 24 horas a 4°C. Após esse período, os pendões foram colocados em etanol 70% e conservados em geladeira a 4°C até serem utilizados. Foram coletados ao acaso 3 pendões florais por acesso.

Foram retiradas aleatoriamente 8 espiguetas dos pendões florais por acesso, cada lâmina foi preparada utilizando 3 anteras de cada espiguetas, as anteras foram maceradas com duas gotas (20 µl) de solução tripla de Alexander (Alexander, 1969) para a liberação dos grãos de pólen e reação do mesmo com

o corante. Posteriormente, o material foi coberto com lamínula e retirado o excesso do corante da lâmina com o auxílio de papel filtro. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, campo claro (Olympus BX 60).

Foram preparadas 8 lâminas por acesso, sendo contabilizados 250 grãos de pólen por lâmina de cada acesso, totalizando-se 2.000 grãos de pólen. Grãos de pólen corados de vermelho púrpuro foram considerados viáveis, e os grãos de pólen corados de verde foram considerados inviáveis (Alexander, 1969). A porcentagem de grãos de pólen viáveis foi determinada de acordo com a fórmula:

$$Viabilidade = \frac{\text{Numero de grãos de pólen viáveis}}{\text{Numero total de grãos de pólen}} * 100$$

As imagens dos grãos de pólen viáveis e inviáveis foram capturadas com câmera CCD 12 bits vídeo câmera acoplada ao microscópio óptico *Olympus BX 60* com objetiva de 60x. As imagens digitalizadas foram capturadas utilizando-se o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

4.3 Viabilidade polínica por horário

Na análise da viabilidade polínica por horário foram selecionados 5 acessos de capim-elefante (41, 45, 49, 62, 68) onde foram identificados e isolados com saco de papel 5 pendões florais por acesso. Foram feitas cinco coletas, cada uma em horários diferentes, de 8h30min até 16h30min, com um intervalo de duas horas de uma coleta a outra. Foi realizada a coleta de 1 pendão por horário e conservados em solução fixadora de etanol e ácido acético (3:1) por 24 horas a 4°C, após esse período, os pendões foram colocados em etanol 70% e conservados em geladeira a 4°C até serem utilizados.

Para o preparo das lâminas foram retiradas as anteras das espiguetas dos botões florais, em seguida, as anteras foram colocadas sobre as lâminas e macerados com duas gotas (20 µl) de solução tripla de Alexander (Alexander, 1969) para a liberação dos grãos de pólen e reação do mesmo com o corante. Posteriormente, o material foi coberto com lamínula e retirado o excesso do corante da lâmina com o auxílio de papel filtro. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, campo claro (Olympus BX 60). Foram preparadas 8 lâminas por acesso, sendo contabilizados 250 grãos de pólen por lâmina de cada acesso,

totalizando-se 2.000 grãos de pólen por acesso por horário. Grãos de pólen corados de vermelho púrpuro foram considerados viáveis, e os grãos de pólen corados de verde foram considerados inviáveis (Alexander, 1969). A porcentagem de grãos de pólen viáveis foi determinada de acordo com a fórmula:

$$Viabilidade = \frac{\text{Grãos de pólen viáveis}}{\text{Total de grãos de pólen}} * 100$$

As imagens dos grãos de pólen foram capturadas com câmera CCD 12 bits vídeo câmera acoplada ao microscópio óptico *Olympus BX 60* com objetiva de 60x. As imagens digitalizadas foram capturadas utilizando-se o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

4.4 Receptividade do estigma

A análise da receptividade do estigma foi realizada no final de julho; em decorrência da época de coleta tardia, somente oito acessos possuíam pendões florais. Dessa forma, a análise foi realizada nos seguintes acessos 03, 11, 26, 33, 34, 47, 51 e 58, onde foram marcados 1 pendão por acesso. A marcação e a primeira coleta foram realizadas quando 1/3 do pendão estava para fora da bainha da folha bandeira. A segunda coleta foi realizada no dia seguinte quando a metade do pendão estava para fora da bainha da folha bandeira. Na terceira coleta todo o pendão estava para fora da bainha da folha bandeira, e as demais coletas foram realizadas a cada dois dias até que todos os estigmas do pendão estivessem inviáveis, que ocorreu entre o 9º e 10º dia após a primeira coleta.

Em cada dia de coleta foram coletadas 10 espiguetas por pendão. As espiguetas foram submergidas imediatamente e diretamente em um recipiente contendo o corante alfa-naftil acetato (Dafni, 1992) por 5 minutos, após esse período foram lavadas com água destilada. Estigmas receptivos reagem com o corante alfa-naftil, adquirindo uma coloração preta na superfície do estigma, já os estigmas não receptíveis não reagem ao corante e permanecem com a sua cor natural (Dafni, 1992). A análise foi realizada no período entre as 8 e 9 horas da manhã durante 11 dias, período em que os pendões apresentaram estigmas receptíveis.

$$(\%) \text{ Estigma Receptivos} = \frac{\text{Numero de estigma receptivos}}{\text{Numero total estigma analisados}} * 100$$

4.5 Caracterização palinológica

Para a caracterização da morfologia polínica, inicialmente foram realizadas coleta dos pendões florais na pré-antese. Estas coletas foram feitas às 7 horas da manhã (antes da abertura das anteras). Os pendões coletados foram conservados em solução fixadora de etanol e ácido acético (3:1) por 24 horas. Posteriormente, as anteras das espiguetas foram retiradas e colocadas sobre a lâminas onde foram seccionadas com o auxílio de um bisturi, após esse processo, as anteras foram colocadas em microtubos de 1,5 mL, com 500 µL de ácido acético e mantido em repouso por 20 min, após este processo, os tubos foram colocados em centrífuga por 5 min a 3000 rpm e o sobrenadante foi descartado, após a centrifugação.

Simultaneamente, foi preparada a mistura acetolítica conforme Erdtman (1960). Que promove a hidrólise ácida nos grãos de pólen em uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, visando eliminar o conteúdo celular, facilitando a visualização e o reconhecimento dos caracteres morfológicos dos grãos de pólen.

Os grãos de pólen ficaram imersos na mistura acetolítica, em banho-maria a 100 ± 2 °C por cinco minutos. Os tubos com o material foram centrifugados novamente e a mistura acetolítica retirada, ficando apenas os grãos de pólen nos microtubos. Em cada tubo foi acrescentado 1 ml de água destilada e 100 µL de álcool etílico, o material sofreu uma nova centrifugação e a seguir teve a retirada de sobrenadante. Por fim, foi acrescentado 1ml de água destilada e glicerina na proporção 3:1 em cada tubo e mantido por, no máximo 2h. (Erdtman, 1960; Souza, 2012).

Após todo esse processo foi colocado a solução contendo os grãos de pólen sobre as lâminas e cobertas com uma lamínula. Em seguida, o material foi observado no microscópio óptico. As mensurações dos grãos de pólen foram realizadas no mesmo dia da preparação das lâminas, visando evitar possíveis problemas de intumescimento, que podem ocorrer com o passar do tempo visto

que os grãos de pólen tendem a aumentar de tamanho depois de submetidos ao processo de acetólise (Salgado-Labouriau, 1973).

Foram obtidas medidas dos diâmetros polar e equatoriais em vista equatorial (posição em que a abertura do grão de pólen está voltada para a lateral) e do diâmetro equatorial em vista polar (posição em que a abertura do grão de pólen está voltada para o observador) dos grãos de pólen. Também foram obtidas as medidas das aberturas, e da espessura das camadas da exina (sexina e nexina) (Figura 2). Foram realizadas 25 medições de cada característica do pólen, aleatoriamente, em diferentes lâminas. Foram mensuradas, no mínimo, cinco pólenes por lâmina, em um total de 25 grãos de pólen.

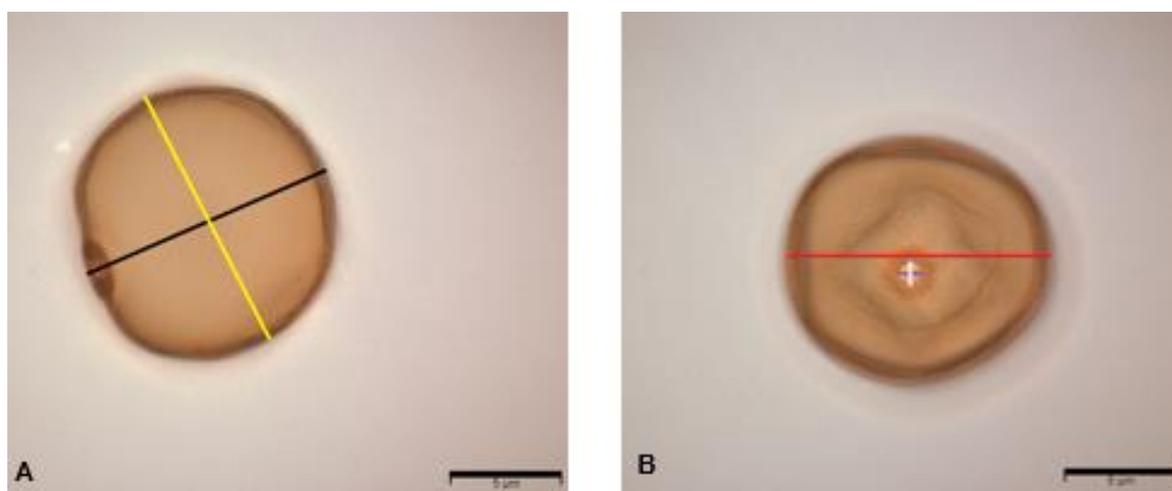


Figura 2. Representação das medidas dos grãos de pólen de capim-elefante: A) diâmetro polar (preto), diâmetro equatorial (amarelo), em vista equatorial; B) diâmetro (vermelho), comprimento (branco) e largura (roxo) da abertura em vista polar. Barra = 5 μm .

Para classificar os grãos de pólen, de acordo com sua forma, foi utilizada a relação entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E) em vista equatorial. Essa classificação foi proposta por Erdtman (1952), que criou um índice para classificar a forma dos grãos de pólen em nove classes (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos grãos de pólen quanto a forma com base na razão entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E).

Classes de pólen	
P/E	Denominação
0,50	Peroblato
0,50 – 0,74	Oblato
0,75 – 0,87	Suboblato
0,88 – 0,99	Oblato-esferoidal
1,00	Esférico
1,01 – 1,14	Prolato-esferoidal
1,15 – 1,33	Subprolato
1,34 – 2,00	Prolato
2,00	Perprolato

Em relação ao seu tamanho, os grãos de pólen foram classificados de acordo com Erdtman (1952) baseando-se no comprimento do eixo maior do grão de pólen (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação do tamanho dos grãos de pólen, de acordo com o comprimento de seu maior eixo.

Tamanho dos grãos de pólen	
Muito pequenos	< 10 μm
Pequenos	10-25 μm
Médios	25- 50 μm
Grandes	50-100 μm
Muito grandes	100-200 μm
Gigantes	> 200 μm

As aberturas foram classificadas em poro, colpo ou colporo, de acordo com a relação entre comprimento/ largura, segundo Erdtman (1952) conforme mostra na Tabela 4, foram analisados 25 grãos de pólen por acesso.

Tabela 4. Classificação do tipo de abertura do grão de pólen utilizando a relação entre a largura e o comprimento da abertura.

Classificação	Relação entre largura/comprimento da abertura
Poro	< 2
Colpo	> 2
Colporo	Fusão das formas poro e colpo

A espessura da exina foi baseada no índice da exina que é dada pela relação entre a espessura da exina e o eixo equatorial (Exi/E) (Santos, 1963), conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Classificação da espessura da exina do grão de pólen em relação a espessura da exina e o eixo equatorial

Classificação da espessura da exina	
Muito fina	Menor 0,05
Fina	0,05 – 0,10
Espessa	0,10 – 0,25
Muito espessa	Maior 0,25

Posteriormente, às descrições polínicas, as terminologias adotadas foram baseadas no glossário de Barth e Melhem (1988) e Punt et al. (2007).

Os grãos de pólen foram examinados sob microscópio óptico (*Olympus BX 60*), e as imagens foram capturadas, analisadas e medidas, utilizando-se o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

4.6 Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade, para atender os pressupostos da ANOVA. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para as características viabilidade polínica, viabilidade polínica por horário e receptividade do estigma. Posteriormente, foi realizado o teste de agrupamento de média Scott-knott a 5% para a característica viabilidade polínica utilizando o programa Genes. Para a característica viabilidade polínica por horário e receptividade do estigma foram realizadas análises de regressão linear utilizando o programa software RStudio.

Na caracterização palinológica foram obtidas a média aritmética, o desvio padrão da amostra, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança a 95%, em todas as medidas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Viabilidade polínica

A análise de variância dos dados da viabilidade polínica mostra que houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os acessos analisados ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância da característica viabilidade polínica dos 18 acessos de capim-elefante.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Tratamento	17	671,95*
Resíduo	126	9,77
Total	143	
CV (%)	3,60	

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Na Tabela 7 são apresentadas as médias de viabilidade polínica dos 18 acessos de capim-elefante. Utilizando o teste de agrupamento de média Scott-Knott a 5% de probabilidade foi possível observar a formação de 6 grupos distintos.

Tabela 7. Teste de médias da porcentagem de grãos de pólen viáveis dos 18 acessos de capim-elefante (*P. purpureum*), do banco de Germoplasma da UENF.

Acessos	Medias
47	98,55 a
41	96,60 a
26	95,81 a
62	94,70 a
74	93,00 b
3	92,31 b
66	92,15 b
51	92,05 b
48	91,25 b
49	88,75 c
61	88,70 c
45	83,85 d
68	83,05 d
11	81,70 d
58	77,20 e
34	72,00 f
7	70,85 f
33	69,95 f
Média	86,80
CV	3,60

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de agrupamento de média Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A média de viabilidade de todos os acessos analisados foi alto 86,80%, com porcentagens de viabilidade entre os acessos que variaram entre 98,55% a 69,95%. Segundo Techio et al. (2006b), a viabilidade polínica acima de 72% é considerada alta para o capim-elefante. Dessa forma, 83,33% dos acessos apresentaram alta viabilidade e 16,67% dos acessos foram considerados com baixa viabilidade.

Os acessos do grupo 1 e 2 apresentaram as maiores médias de viabilidade (acima de 90%). Já os acessos do grupo 5 e 6 apresentaram as menores médias (72.00%, 70.85% e 69.95%, respectivamente). A viabilidade polínica pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma mesma espécie e até mesmo entre amostras de um mesmo indivíduo (Neto et al., 2006), isso ocorre devido a vários fatores como período de florescimento, as alterações ambientais e variabilidade genética (Shivanna e Rangaswamy, 1992).

Em futuros cruzamentos, 83,33% dos acessos analisados podem ser utilizados como doadores de pólen, entretanto, recomenda-se priorizar a

utilização dos acessos que apresentaram maiores médias de viabilidade (grupo 1 e 2) para maximizar as chances de fertilização.

Viabilidade polínica de uma espécie pode ser estimada através de técnicas colorimétricas, considerando que existe uma correlação entre a viabilidade e coloração do grão de pólen, a estimativa da viabilidade é dada pela contagem dos grãos de pólen não abortados e abortados, que se mostram corados e não corados, respectivamente, ou com cores diferentes (Figura 3), como é o caso do corante Alexander (Techio et al., 2006b).

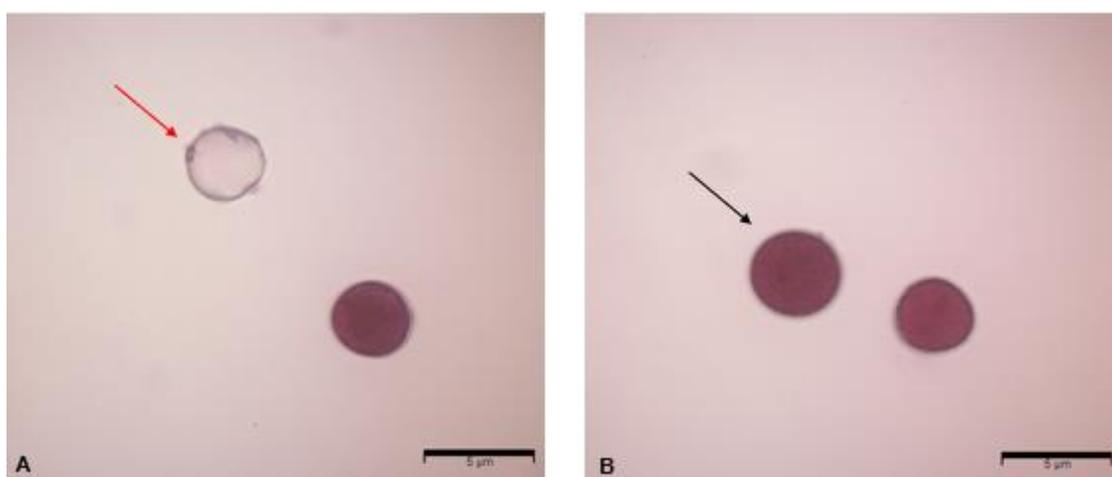


Figura 3. Grãos de pólen de capim-elefante corados com a solução tripla de Alexander. A) a seta em vermelho indica grãos de pólen viáveis B) seta em preto indica grãos de pólen inviáveis. Barra = 5 µm.

Alta viabilidade polínica em acessos de capim-elefante também foram observadas por Techio et al. (2006b), que utilizaram 3 corantes, carmim propiônico 2%,orceína acética 1% e solução tripla de Alexander, obtendo médias de viabilidade de 96,9%, 99,7% e 94,2%, respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Sujatha et al. (1989) e Sree Rangasamy (1972) em seus estudos de fertilidade em capim-elefante utilizando o corante carmim acético 2%, os autores obtiveram médias de viabilidade de 78% e 95%, respectivamente.

A alta viabilidade polínica dos acessos está diretamente relacionada com uma meiose e um índice meiótico regular. O comportamento meiótico de uma

planta está diretamente relacionado ao seu grau de fertilidade, portanto uma meiose regular, gera gametas viáveis, e, normalmente, uma alta porcentagem de grãos de pólen também viáveis. Techio et al. (2006b) avaliando o comportamento meiótico do capim-elefante concluíram que ocorre frequentemente a formação de 14 bivalentes durante a diacinese e metáfase I de todos os acessos analisados, isso confirma que, embora o capim-elefante seja alotetraplóide, ele se comporta como um diploide normal em termos de segregação cromossômica, sugerindo que capim-elefante pode ter genes supressores de emparelhamento homeólogos.

Comercialmente, o capim-elefante é propagado vegetativamente (Italiano, 2004), entretanto, nos programas de melhoramento genéticos voltados para a cultura e que realizam cruzamentos visando à produção de híbridos faz-se o plantio das sementes (Menezes et al., 2016). Assim, para garantir o sucesso de hibridações, é preciso conhecer as condições necessárias para maximizar as taxas de cruzamentos entre as plantas (Flores et al., 2015). Nesse sentido, estudos sobre a viabilidade polínica são importantes, pois os grãos de pólen possuem influência direta no processo de fertilização (Dafni, 1992).

5.2. Viabilidade polínica por horário

O resumo da análise de variância da variável viabilidade polínica por horário mostra que houve interação significativa ($P > 0,05$) entre os acessos analisados e os horários de coleta dos grãos de pólen (Tabela 8).

Tabela 8. Resumo da análise de variância da viabilidade polínica por horários dos acessos de capim-elefante.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
Acessos (A)	4	1855,75*
Horários (H)	4	10402,25*
A*H	16	30,94*
Resíduo	175	224,8
Total	199	
CV (%)	3,70	

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Os resultados da estimativa da viabilidade polínica por horário dos cinco acessos analisados (41, 45, 49, 62 e 68) são apresentados na Figura 4. Comparando os horários de coleta, observa-se em todos os casos uma diminuição da viabilidade polínica ao longo do dia, observando um efeito linear de primeiro grau significativo ($P > 0,05$) entre a porcentagem média de viabilidade polínica e os horários de coleta. Os coeficientes de determinação (R^2) foram estimados entre 99,68 a 99,69 (Figura 4).

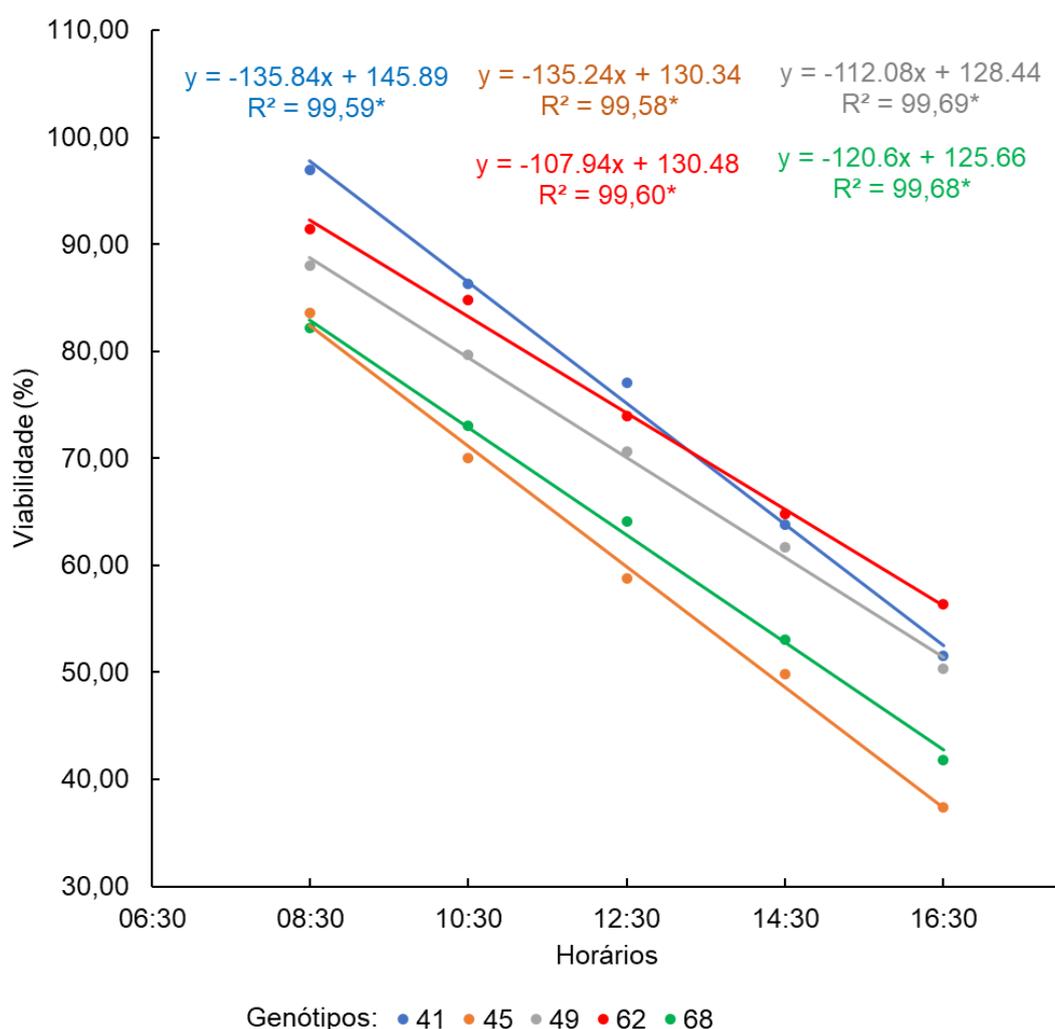


Figura 4. Regressão linear da viabilidade polínica por horário dos acessos de capim-elefante do BAG UENF.

A porcentagem média da viabilidade dos grãos de pólen foi influenciada negativamente pelos horários de coleta, observa-se que as maiores médias de viabilidade são encontradas logo após a antese floral, às 8h30min da manhã. Os menores valores foram encontrados às 16h30min. Há uma redução da viabilidade

polínica ao longo do dia.

Segundo Techio et al. (2006a), a alta viabilidade polínica do capim-elefante está associada com a regularidade meiótica dos acessos, mas também está diretamente relacionada com o horário de coleta dos grãos de pólen, padronizada entre 8h30min e 10h. No capim-elefante, as anteras começam a se tornar deiscente a partir das 8h30min, sugerindo que esse é o momento em que a viabilidade atinge o ponto máximo (Tabela 9). Esses resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho.

Tabela 9. Porcentagem média de grãos de pólen viáveis de capim-elefante, por horário de coleta, registrados em Campos dos Goytacazes.

Horários de coleta	Acesso 41 (% Media)	Acesso 45 (% Media)	Acesso 49 (% Media)	Acesso 62 (% Media)	Acesso 68 (% Media)	Média
8h:30min	96,9	83,63	88,5	91,4	82,2	88,52
10h:30min	86,35	70,00	79,65	84,75	73,00	78,75
12h:30min	77,05	58,75	70,6	73,95	64,5	68,97
14h:30min	63,85	49,8	61,65	64,8	53,1	58,64
16h:30min	51,35	37,35	50,35	56,4	41,85	47,46

Os dados da Tabela 9 mostram que os maiores valores de viabilidade polínica foram encontrados às 8h30min com média de 88,52%. Já a viabilidade polínica dos grãos de pólen coletados às 10h30min apresentaram em média 78,75% de viabilidade. Segundo Techio et al. (2006b), esse é ainda um alto percentual de viabilidade (acima de 72%). Sendo assim, esses dois horários são os mais indicados para a realização de polinização. De 12h30min a 16h30min foi observado um decréscimo na quantidade média de grãos de pólen viáveis de 68,97 a 47,46 %, respectivamente, valores de viabilidade que são considerados baixos, portanto, cruzamentos realizados nesses horários não são indicados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2012), avaliando a viabilidade polínica de quatro genótipos de milho (*Zea mays*) em oito horários distintos de coleta (6:00h a 13:00 h) de grãos de pólen.

No estudo foi utilizando a solução tripla de Alexander para estimar as porcentagens de viabilidade polínica. Os autores observaram que com o passar dos horários de coleta ocorreu uma diminuição da viabilidade dos grãos de pólen nos quatro genótipos analisados.

Lima et al. (2015) estudando a viabilidade polínica de nove genótipos de acerola (*Malpighia emarginata*) em oito diferentes horários de coleta (das 06:00h às 13:00h), observaram que às 08:00h ocorreu um maior percentual médio de viabilidade (91,6%), e uma diminuição da viabilidade polínica a partir das 10:00h.

Souza et al. (2002), analisando a viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis*), observaram uma diminuição da viabilidade polínica ao longo de nove horários de coleta, mostrando que a porcentagem média de viabilidade polínica foi influenciada negativamente pelo horário de coleta. Os autores obtiveram as maiores médias de viabilidade na antese (12 h) (93,73 %) e as menores médias, após 24 horas (78,65 %).

Durante a realização do trabalho foi observado uma grande diminuição da quantidade de grãos de pólen nas anteras, principalmente, após as 10h30min, isso pode ser explicado pelo fato dos grãos de pólen do capim-elefante serem secos e dispersados principalmente pelo vento. Dessa forma, mesmo que os pendões tenham sido isolados antes das coletas, ocorreu diminuição no número de grão de pólen. Esses resultados confirmam que os grãos de pólen devem ser coletados até às 10h30min para a realização dos cruzamentos.

Em condições normais, os grãos de pólen perdem rapidamente a sua viabilidade ao decorrer do dia, e o horário em que são encontradas as maiores porcentagens de viabilidade polínica variam dependendo da espécie. Portanto, é muito importante estabelecer o melhor horário de coleta dos grãos de pólen, pois estes precisam ser capazes de emitir o tubo polínico e fertilizar a planta receptora.

Dessa forma, estudos que determinem o melhor horário de coleta dos grãos de pólen é de fundamental importância em trabalhos de melhoramento genético que visem hibridação, a fim de realizar cruzamentos com maior eficiência (Silva et al., 2017).

5.3 Receptividade do estigma

A análise de variância da receptividade do estigma mostra que não houve diferença significativa entre os acessos analisados, bem como para a interação entre os acessos (A) versus dias de coleta do estigma (D). Já a característica dias de coleta foi significativa pelo teste F a 5% de probabilidade (Tabela 10).

Tabela 10. Resumo da análise de variância da receptividade do estigma dos 8 acessos de capim-elefante.

Fontes de variação	GL	Quadrado médio
		Viabilidade do estigma
Acessos (A)	7	2153,06 ^{ns}
Dias (D)	6	143061,64*
A*D	42	567,26 ^{ns}
Resíduo	504	861,29
Total	559	
CV (%)	48,05	

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{ns}: não significativo.

Na Figura 5 são apresentados os dados de receptividade do estigma dos oito acessos estudados (3, 11, 26, 33, 34, 47, 51, 58) nos onze dias de avaliação. Analisando os dias de coleta, foi observada uma diminuição gradual da receptividade do estigma a partir do terceiro dia de coleta, onde foi possível observar um efeito linear de primeiro grau significativo ($P > 0,05$) entre a porcentagem média de estigmas receptíveis e os dias de coleta, com um coeficiente de determinação (R^2) de 96,63.

A inflorescência do capim-elefante emerge de uma estrutura chamada folha bandeira, a inflorescência é do tipo panícula com formato cilíndrico, que pode variar de 13 a 30 cm de comprimento e densamente florido por centenas de espiguetas, (Bogdan, 1997; Deresz, 1999). Foi observado previamente em campo que a panícula não emerge toda de uma vez de dentro da folha bandeira, levando geralmente 3 dias para estar completamente exposta (Figura 6-A), também foi difícil definir quando a panícula começará a emergir, dificultando o processo de isolar as panículas receptíveis quando se tem o objetivo de realizar cruzamentos.

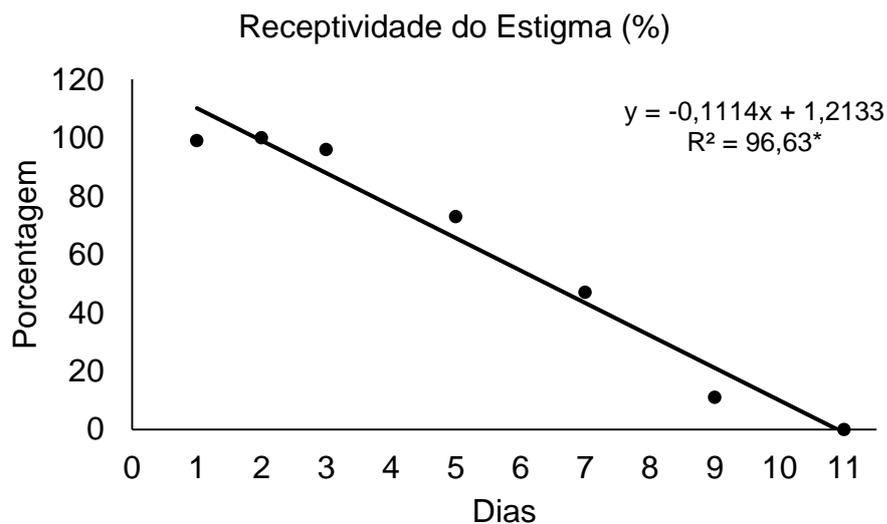


Figura 5. Regressão linear da porcentagem média da receptividade do estigma (%) do capim-elefante em relação a onze dias de coleta em oito acessos analisados.

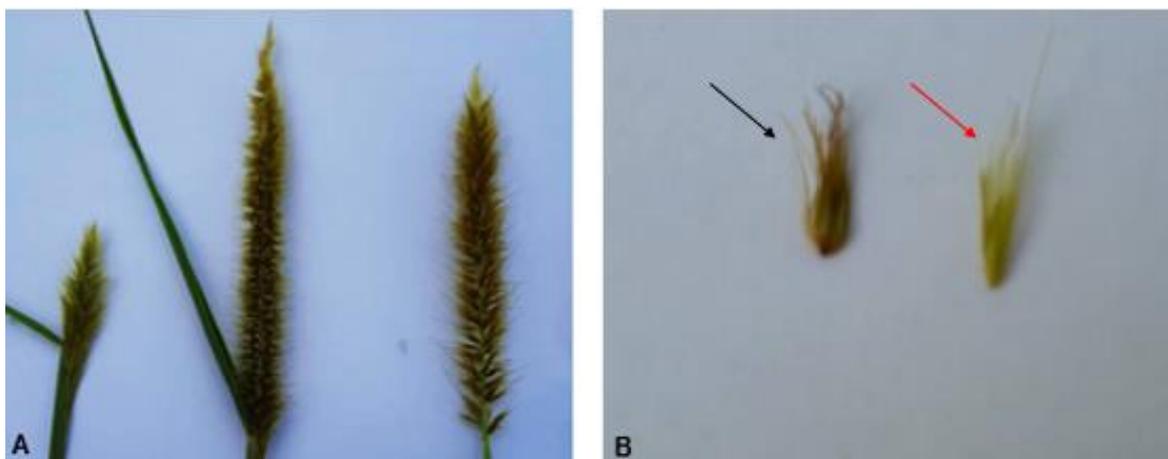


Figura 6. Panícula e espiguetas do capim-elefante. A) panícula emergindo da folha bandeira (da esquerda para direita). B) estigma receptível (seta preta) corada em preto pela solução alfa-naftil acetato, estigma não receptível (seta vermelha).

Observou-se que nos 2 primeiros dias de coleta, 100 % dos estigmas coletados em todos os acessos (Tabela 11) estavam receptíveis, pois reagiram positivamente à solução de alfa-naftil acetato, corando o estigma com uma coloração roxa escura ou preta (Figura 6-B). Entretanto, nesse período, a panícula não tinha emergido totalmente da folha bandeira, dessa forma, se os

cruzamentos fossem realizados nesse período, não seriam muito eficientes, pois boa parte dos estigmas não seria exposto aos grãos de pólen.

Tabela 11. Porcentagem média de estigmas receptível por dia de coleta (1, 2, 3, 5, 7, 9,11) dos acessos 3, 11, 26, 33, 34, 47, 51, 58 de capim-elefante do banco de germoplasma da UENF.

Dia de coleta	1	2	3	5	7	9	11
Acesso	% de estigma receptível por dia de coleta						
3	100	100	100	70	30	0	0
11	100	100	100	80	60	30	0
26	100	100	100	70	40	0	0
33	100	100	90	70	40	0	0
34	100	100	90	70	50	20	0
47	100	100	100	90	70	10	0
51	100	100	90	70	30	0	0
58	100	100	100	80	60	30	0
Média	100	100	90,6	70,5	40,7	10,12	0

No terceiro e quinto dia de coleta toda a panícula já estava pra fora da bainha da folha bandeira e apresentaram média de receptividade de 90,6 % e 70,5 %, respectivamente. Essas médias de receptividade podem ser consideradas altas. Portanto, recomenda-se que futuros cruzamentos utilizando esses acessos sejam realizados até no máximo no quinto dia.

Já no sétimo e nono dia de avaliação foi observado um grande decréscimo nas porcentagens, média de receptividade de 40,7% a 10,12%, respectivamente, esse decréscimo na receptividade pode ter ocorrido devido ao fato do capim-elefante apresentar protoginia com intervalo entre o aparecimento dos estigmas e das anteras varia de sete a nove dias. No presente trabalho também foi observado o aparecimento das anteras a partir do sétimo dia de avaliação, o que coincide com o período de decréscimo da receptividade. No décimo primeiro dia nenhum estigma analisado estava receptivo, também foi observado os estigmas analisados apresentavam uma coloração marrom ou parda, indicando que o processo degenerativo estava ocorrendo.

Silva et al. (2010), avaliando a receptividade do estigma de acessos da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Lucas), coletaram inflorescências na antese entre às 7:00 e às 10:00h da manhã, utilizando peróxido de hidrogênio 3%. Eles constataram que 100% dos estigmas estavam receptivos durante o período analisado. Em outro trabalho, os autores supracitados, examinando a receptividade do estigma de dois acessos de amendoim forrageiro, utilizando peróxido de hidrogênio a 3% e realizando a coleta do estigma às 8:00h da manhã observaram que os acessos BRA 040550 e o BRA 031984 apresentaram elevadas taxas de receptividade do estigma, de 100% e 80% de receptividade.

Damasceno junior et al. (2009), em estudo sobre o sistema reprodutivo preferencial de plantas hermafroditas de mamoeiro, analisaram a receptividade do estigma utilizando a solução Alfa-naftil, em botões florais dois dias antes da antese e na antese. Os botões florais na antese foram coletados das 8:00h às 16:00h, com intervalo de duas horas, 24 e 48 horas após a abertura das flores. Os autores observaram que todos os estigmas das flores abertas foram receptivos, pois reagiram positivamente à solução de alfa-naftil acetato, corando sua superfície com a cor preta. Os estigmas foram receptivos às 8:00h da manhã e permaneceram receptivos até 48 horas após a abertura da flor. Os botões florais analisados apresentavam-se receptivos antes da abertura floral.

Segundo Stiehl-Alves e Martins (2008), a escolha das estratégias a serem adotadas em um programa de melhoramento genético é fortemente influenciada pela biologia reprodutiva da espécie. Portanto, a possibilidade de cruzamento entre progenitores selecionados requer o conhecimento da variação da receptividade do estigma nos indivíduos a serem cruzados e do período em que a porção feminina está receptiva ao grão de pólen.

5.4 Análise palinológica

Os grãos de pólen do capim-elefante foram classificados como tendo âmbito circular e simetria radial (Tabela 12). Baseando-se no comprimento do eixo maior, os grãos de pólen de capim-elefante foram considerados de tamanho médio, pois a medida do maior eixo foi de 25,66 μm , valor entre 25 a 50 μm , conforme classificação proposta por Erdtman (1952).

Tabela 12. Caracterização morfológicas dos grãos de pólen dos acessos estudados de capim-elefante.

Características analisadas	
Tamanho	Médio
Forma (DP/DE)	Esférico
Tipo de abertura	Poros
Número de abertura	Monoporado
Âmbito	Circular
Simetria	Radial
Índice da exina	Muito Fina

A classificação da morfologia polínica de capim-elefante está de acordo com a encontrada na literatura, para gramíneas. Radaeski et al. (2016) realizaram um estudo sobre os pólenes das gramíneas Sul-brasileiras, onde catalogaram a morfologia polínica de noventa e cinco espécies de gramíneas. Este estudo mostrou que, em geral, os grãos de pólen das gramíneas são de tamanho médio, âmbito circular, simetria radial e forma esférica, resultados que corroboram com os encontrados no presente trabalho (Figura 7).

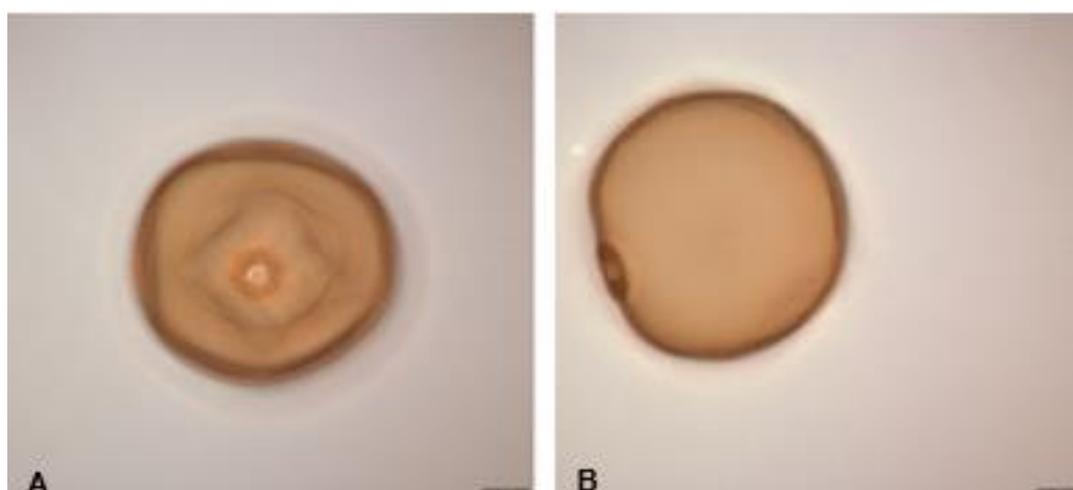


Figura 7. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *P. purpureum*. A) Grãos de pólen em vista polar, B) grãos de pólen em vista equatorial. Barra = 5 μ m.

Em vista equatorial, a média do diâmetro equatorial foi de 25,64 μm e do diâmetro polar 25,66 μm , com uma faixa de variação de 20,7 a 29,5 μm e 21,60 a 29,01 μm , respectivamente. Para classificar o grão de pólen quanto a forma foi realizada a razão entre o eixo polar e o eixo equatorial (DP/DE) conforme proposto por Erdtman (1952). O grão de pólen de capim-elefante apresentou uma razão DP/DE de 1,00 μm sendo, portanto, classificado como esférico (Tabela. 13).

Tabela 13. Medidas (μm) em vista equatorial do diâmetro equatorial (DE) e diâmetro polar (DP), da razão entre o eixo polar e o eixo equatorial (DE/DP) e diâmetro da exina e suas subdivisões (sexina e nexina) e o índice de exina (IE) dos grãos de pólen de capim-elefante, seguida dos valores de média (m), faixa de variação (FV), desvio padrão da amostra (s) coeficiente de variação (CV %) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC).

Vista equatorial					
Variáveis	M	FV	s	CV (%)	IC. 95%
DE	25,64	20,77-29,50	2,24	8,76	24,71-26,57
DP	25,66	21,60-29,01	1,78	6,94	24,92-26,40
DE/DP	1,00	1,15-0,81	0,08	8,06	0,97-1,03
Exina	1,01	1,33-0,83	0,13	13,56	0,95-1,06
Sexina	0,56	0,81-0,34	0,12	22,30	0,51-0,61
Nexina	0,34	0,51-0,2	0,08	24,56	0,30-0,37
IE	0,039	0,06-0,03	0.01	15,56	0,03-0,04

O diâmetro da exina tem em média 1,01 μm e suas subdivisões sexina e nexina apresentaram médias de 0,56 μm e 0,34 μm , respectivamente (Tabela. 13). O índice da exina foi determinado segundo a classificação de Santos (1963) pela relação diâmetro da exina e o diâmetro equatorial, segundo essa classificação, a exina foi classificada como muito fina (Tabela.12), pois o valor médio da exina (0,039 μm) foi menor que 0,05.

O diâmetro médio da exina e a classificação da exina como muito fina está de acordo com o encontrado por outros autores como Erdtman (1952), Jan et al. (2015) e Radaeski et al. (2017). Foi possível observar que a sexina é maior que nexina, resultado que difere dos encontrados por Salgado-Labouriau (1973) e Radaeski et al. (2017), quando avaliaram grãos de pólen de gramíneas, segundo

estes autores a sexina e a nexina de gramíneas possuem a mesma espessura. Essa diferença do diâmetro da sexina e nexina pode ter ocorrido devido à dificuldade em visualizar e separar essas duas estruturas durante as mensurações.

Os dados das medidas realizadas na vista polar são apresentados na Tabela. 14. A média do diâmetro do grão de pólen, na vista polar foi de 25,45 μm com uma faixa de variação entre 20,75 a 29,17 μm . Os grãos de pólen do capim-elefante possuem uma única abertura (monoporado), localizada no polo distal do grão de pólen. No presente trabalho, o comprimento e a largura média da abertura dos grãos de pólen foram de 2,17 e 2,16 μm , respectivamente, e a relação entre o comprimento e a largura da abertura foi de 1,0 μm , caracterizando assim a abertura como poro.

Tabela 14. Medidas (μm) em vista polar do diâmetro do poro, do comprimento da abertura (CA) e da largura da abertura (LA) dos grãos de pólen de capim-elefante, seguida dos valores de média (m), faixa de variação (FV), desvio padrão da amostra (s), coeficiente de variação (CV %) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (IC).

Vista polar					
Variáveis	m	FV	s	CV (%)	IC. 95%
Diâmetro	25,45	20,75-29,17	2,20	8,67	24,54-26,36
Poro	1,00	1,32-0,81	0,13	13,28	0,95-1,06
CA	2,17	2,86-1,31	0,40	18,59	2,01-2,34
LA	2,16	2,73-1,14	0,37	17,15	2,01-2,31

A média do diâmetro (25,45 μm) do grão de pólen em vista polar foi muito semelhante ao do diâmetro equatorial e diâmetro polar (25,64 μm e 25,66 μm , respectivamente) em vista equatorial, isso ocorreu devido a forma esférica dos grãos de pólen que é uma característica das gramíneas (Erdtman 1952; Salgado-Labouriau 1973).

A classificação do tipo de abertura como poro e do número de aberturas como monoporado também está de acordo com outros trabalhos realizados com gramíneas. Isso ocorre, pois as gramíneas são estenopolínica, ou seja, possuem

grãos de pólen morfológicamente muito semelhantes (Salgado-Labouriau 1973; Radaeski et al. 2017).

A morfologia polínica homogênea dos grãos de pólen família Poaceae impossibilitou, até o momento, uma classificação dos grãos de pólen a nível de gênero e espécie (Damialis & Konstantinou 2011; Salgado-Labouriau 1973). Com os estudos realizados ao decorrer dos anos e a aplicação de novas metodologias, foi possível separar gramíneas cultivadas (cereais) das nativas, utilizando metodologia de comparações biométricas entre diâmetro do grão com e o diâmetro da abertura (Joly et al. 2007).

Apesar da homogeneidade, os grãos de pólen das gramíneas apresentam diferenças, relacionadas principalmente ao tamanho do grão de pólen, diâmetro da abertura (Joly et al. 2007), tamanho das aberturas, diâmetro da sexina e nexina (Schuler & Behling 2011; Jan et al. 2015), e na ornamentação da exina, quando observada em microscopia eletrônica de varredura (Mander & Punyasena 2015).

6. CONCLUSÃO

Os acessos de capim-elefante apresentaram alto percentual médio de viabilidade polínica na antese, exceto os acessos dos grupos 5 e 6 que apresentaram baixa viabilidade. Os acessos do grupo 1 e 2 apresentaram as maiores médias de viabilidade, portanto são os melhores candidatos para uso no programa de melhoramento do capim-elefante como doadores de pólen.

Nos cinco horários de avaliação da viabilidade polínica, observou-se que o horário de coleta tem uma relação negativa no percentual médio de viabilidade dos grãos de pólen ao longo do dia. Foi constatado maior percentual de pólen viáveis e maior quantidade de pólen nas anteras nos horários das 8h30min às 10h30min.

Recomenda-se que os cruzamentos em capim-elefante sejam realizados entre o 3º e 5º dia após o pendão começar a sair de dentro da bainha da folha bandeira, pois, é nesse período que foram observadas as maiores porcentagens de estigmas receptivos.

A caracterização do grão de pólen do capim-elefante como monoporado, esférico, de tamanho médio, com abertura do tipo poro e com exina muito fina, realizada no presente trabalho, corrobora com o encontrado na literatura e reforçam a grande homogeneidade da morfologia polínica encontrada nas gramíneas, assim como apresenta informações inéditas sobre a morfologia polínica da espécie *Pennisetum purpureum*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44: 117–122.
- Alexander, M.P. (1980) A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Satain Techonology* 55: 13–18.
- Amabile, R.F., Vilela, M.S., Peixoto, J.R. (2018) *Melhoramento de Plantas cultivadas: Variabilidade genética, ferramenta e mercado*. Braasília 95p.
- Animasaun, D.A., Morakinyo, J.A., Mustapha, O.T., Krishnamurthy, R. (2019) Genome size and ploidy variations in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and napier grass (*Pennisetum purpureum*) genotypes. *Acta Agron* 68: 299–305.
- Araújo, M. do S.B. de. (2016) Interação genótipo versus cortes anuais e comparação de métodos de estabilidade e de índices de seleção em capim-elefante. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–69p.
- Barbosa, S., Davide, L.C., Pereira, A. Vander. (2003) Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumack x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. *Ciência e Agrotecnologia* 27: 26–35.
- Barth, O.M., Melhem, T.S. (1988) *Glossário Ilustrado de Palinologia*. Editora da.

Camponas 75p.

- Bogdan, A.V. (1997) *Tropical Pasture and Fodder Plants (Grasses and Legumumes)*. London: Longman, 241p.
- Borém, A., Miranda, G. V., Fritsche-Neto, R. (2017) *Melhoramento de Planta*. 7.ed. 543p.
- Borges, A.C.P., Silva, M.S., Alves, C.T., Torres, E.A. (2016) Energias renováveis: uma contextualização da biomassa como fonte de energia. *REDE Rev Eletrônica do PRODEMA* 10: 23–36.
- Brunken, J.N. (1977) A Systematic Study of Pennisetum sect. Pennisetum (Gramineae). *Am J Bot* 64: 161.
- Carreira, L.M.M. (1976) Morfologia polínica de plantas lenhosas da Campina. *Acta Amaz* 6: 247–269.
- Cassaro, S. (2018) Seleção de híbridos de capim-elefante para fins energéticos utilizando modelos mistos. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–54p.
- Costa, A., Romani, I., Magalhães, J.V., Berti, L.F., Martins, W.J., Gonela, A. (2012) Efeito do horário de coleta sobre a viabilidade do pólen de milho (*Zea mays* L.). *Rev Bras Milho e Sorgo* 2751–2757.
- Dafni, A. (1992) *Pollination Ecology: A Prctical Approcach*. The Practi. 254p.
- Dafni, A., Hesse, M., Pacini, E. (2000) *Pollen and Pollination*. Springer-. 341p.
- Damasceno junior, P.C., Nair, T., Pereira, S., Pereira, M.G., Filho, F., Silva, D.A., De, M., Souza, M., Nicoli, R.G. (2009) Preferencial reproduction mode of hermaphrodite os papaya plant (*Carica papaya* L; Caricaceae). *Rev Bras Frutic, Jaboticabal-SP* 182–189.
- Deresz, F. (1999) Capim - elefante manejado em sistema rotativo para produção de leite e carne. *In: Passos, L.P., Carvalho, L. de A., Martins, C.E., et al. (ed) Biología e manejo do Capim - elefante*. p. 131- 160. 131-160.

- dos Reis, G.B., Andrade-Vieira, L.F., de Campos, J.M.S., Pereira, A. Vander., Davide, L.C. (2015) Alterações cariotípicas após hibridização entre *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*. *Cienc e Agrotecnologia* 39: 443–454.
- Erdtman, G. (1952) *Pollen Morphology and Plant Taxonomy*. Stockolm 252p.
- Erdtman, G. (1960) The acetolysis method. A revised description. *Sven Bot Tidskr* 54: 561–564.
- Fehr, W.R. (1939) *Principles of cultivar development*. Iowa 536p.
- Flores, P.S., Dos Santos, V.B., Da Silva, L.M., Capristano, M. d. C. (2015) Manual para Teste de Viabilidade e Armazenamento de Pólen e Receptividade de Estigma do Amendoim Forrageiro.
- Freitas, R.S., Barbé, T.D.C., Daher, R.F., Vidal, A.K.F., Stida, W.F., Da Silva, V.B., Menezes, B.R.D.S., Pereira, A. Vander. (2018) Chemical Composition and Energy Yield of Elephant-Grass Biomass as Function of Five Different Production Ages. *J Agric Sci* 10: 343.
- Garcia, C.D.S., Fernandes, A.M., Augusto, C., Fontes, D.A., Augusto, R., Vieira, M., Faria, N. De., Ana, S., Pimentel, V.A. (2011) Desempenho de novilhos mantidos em pastagens de capim-elefante e capim-mombaça Performance of steers raised on pastures of Elephant and Mombasa grasses. *Rev Bras Zootec* 40: 403–410.
- Guerra, L.C. (2002) *Las gramíneas (Poaceae) de Cuba*. 167p.
- Harlan, J.R., Wet, J. m. j. (1971) Toward a Rational Classification of Cultivated Plants. *Taxon* 20: 509–517.
- Jan, F., Schüler, L., Behling, H. (2015) Trends of pollen grain size variation in C3 and C4 Poaceae species using pollen morphology for future assessment of grassland ecosystem dynamics. *Grana* 54: 129–145.
- Jauha, P. (1981) *Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species*. Alan R. Li. New York

- Jauhar, P. p., Hanna, W.. (1998) *Cytogenetics and genetics of pearl millet*. Dec. New York 717–735p.
- Jauhar, P.P. (1968) Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an interspecific hybrid and its bearing on basic chromosome number in pennisetum. *Genetica* 39: 360–370.
- Joly, C., Barillé, L., Barreau, M., Mancheron, A., Visset, L. (2007) Grain and annulus diameter as criteria for distinguishing pollen grains of cereals from wild grasses. *Rev Palaeobot Palynol* 146: 221–233.
- Kaul, M.L.H., Murthy, T.G.K. (1985) Mutant genes affecting higher plant meiosis. *Theor Appl Genet* 70: 449–466.
- Kearns, C.A., Inouye, D. (1993) *Techniques for pollinations biologists*. Colorado 583p.
- Lima, R.S.N. de., Daher, R.F., Gonçalves, L.S.A., Rossi, D.A., do Amaral Júnior, A.T., Pereira, M.G., Lédo, F.J.S. (2011) RAPD and ISSR markers in the evaluation of genetic divergence among accessions of elephant grass. *Genet Mol Res* 10: 1304–1313.
- Lima, J. dos S., Rocha, V.D. da., Tiago, A.V., Santos, T.A. dos., Rossi, A.A.B. (2015) Influência do horário de coleta sobre a viabilidade de grãos de pólen em acerola (*malpighia emarginata* dc.). *Enciclopédia Biosf* 11: 3216–3224.
- Lima, R.S.N. (2010) Estimativa da diversidade genética entre clones de capim-elefante (*P. urpureum* schum) baseada em marcadores de DNA (RAPD e ISSR). Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 80p.
- Mander, L., Punyasena, S.W. (2015) Grass pollen surface ornamentation: a review of morphotypes and taxonomic utility. *J Micropalaeontology* 35: 121–124.
- Marafon, A.C., Santiago, A.D., Câmara, T.M.M., Rangel, J.H. de A., Amaral, A.F.C., Lédo, F.J. da S., Bierhals, A.N., Paiva, H.L. (2014) Potencial

Produtivo e Qualidade da Biomassa de Capim-elefante para fins Energéticos.

- Martel, E., De Nay, D., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S., Sarr, A. (1997) Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related Pennisetum species. *J Hered* 88: 139–143.
- Martel, E., Ricroch, A., Sarr, A. (1996) Assessment of genome organization among diploid species ($2n = 2x = 14$) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent in situ hybridization with rDNA probes. *Genome* 39: 680–687.
- Martins, L.H.P., Miranda, I.P. de A., Nunes, C.D. (2002) Morfologia Polínica de Populações Amazônicas De Elaeis Oleifer. *Acta Amaz* 33: 159–166.
- Melhem, T.S.A., Barros, M.A.V. da C., Corrêa, A.M. da S., Watanabe, H.M., Capelato, M.S.F.S., Esteves, V.L.G. (2003) Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). *Inst Botânica* 16: 104.
- Menezes, B.R. da S. (2014) Capacidade combinatória e estimativas de parâmetros de heterose em genótipos de capim-elefante para fins energéticos. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–91p.
- Menezes, B.R. da S., Daher, R.F., Gravina, G. de A., Pereira, A. Vander., Pereira, M.G., Tardin, F.D., Silva, V.B., Rodrigues, E.V., Araújo, M. do S., Bezerra., Oliveira, M.L., Fonseca., Almeida, B. de O. (2016) Combining ability in elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum .) for energy biomass production. *Aust J Crop Sci* 10: 1297–1305.
- Menezes, B.R. da S., Daher, R.F., Gravina, G. de A., Gottardo, R.D., Schneider, L.S.A., Rocha, A.S. (2016) Comportamento *Per se* de híbridos de capim-elefante para fins energéticos. *Comunicata Scientiae* 7: 73-85.
- Monteiro, I.J.G., de Abreu, J.G., Cabral, L. da S., Ribeiro, M.D., dos Reis, R.H.P. (2011) Silagem de capim-elefante aditivada com produtos alternativos. *Acta Sci - Anim Sci* 33: 347–352.

- Morais, R.F. de., Souza, B.J. de., Leite, J.M., Soares, L.H. de B., Alves, B.J.R., Boddey, R.M., Urquiaga, S. (2009) Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. *Pesqui Agropecuária Bras* 44: 133–140.
- Morgado, L.N., Resendes, R., Villanueva, R.S., Moura, M., Ventura, M. da A.M. (2013) Palinologia uma importante ferramenta em diferentes áreas científicas. *Açores Mag* 27.
- Nascimento, I.S., Monks, P.L., Silva, J.B. (2008) Efeito de cortes outonais e hibernais sobre o desempenho produtivo do capim elefante cv. Cameroon. *Rev Bras Ciências Agrárias - Brazilian J Agric Sci* 3: 191–196.
- Neto, O.D.S., Karsburg, I.V., Yoshitome, M.Y. (2006) Viabilidade e Germinabilidade Polínica de Populações de jurubeba (*SOLANUM PANICULATUM* L.). *Rev Ciências Agro-Ambientais* 4: 67–74.
- Oliveira, A.V. de., Daher, R.F., Menezes, B.R. da S., Gravina, G. de A., Sousa, L.B. de., Gonçalves, C.D.S., Oliveira, M.L.F. (2013) Avaliação do desenvolvimento de 73 genótipos de capim-elefante em Campos dos Goytacazes - RJ. *Bol Indústria Anim* 70: 119–131.
- Oliveira, M.L.F. (2014) Avaliação uni e multivariada de características morfoagronômicas para fins energéticos e estudo da diversidade genética do capim-elefante com base em características quantitativas e multicategóricas. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–113p.
- Pagliarini, M.S. (2000) Meiotic behavior of economically important plant species: The relationship between fertility and male sterility. *Genet Mol Biol* 23: 997–1002.
- Pantulu, J. V., Venkateswarlu. (1968) Morphology of the pachytene *Pennisetum purpureum* chromosomes schumach. *Genética* 39: 41–44.
- Pereira, A. V., Miles, J.W., Valles, C.B. do., Ferreira, R. de P. (2001) Melhoramento de forrageiras tropicais. In: Nass, L.L. Valois, A.C.C. Malo, I.S.

- de Valadares-Inglis, M.C. Recursos genéticos e plantas de melhoramento. p. 549–601 549–601*
- Pereira, A. Vander., Sobrinho, F. de S., Souza, F.H.D. de., Lécio, F.J. da S. (2003) Tendências Do Melhoramento Genético E Produção De Sementes De Forrageiras No Brasil. *In: Simpósio Sobre Atualização em Genética e Melhoramento de Plantas. p. 36–63 36–63*
- Plá Júnior, M.A., Côrrea, M.V.G., Macedo, R.B., Cancelli, R.R., Bauermann, S.G. (2006) *Grão de Pólen: Usos e Aplicações. Canoas 24p.*
- Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S., Le Thomas, A. (2007) Glossary of pollen and spore terminology. *Rev Palaeobot Palynol 143: 1–81.*
- Radaeski, J.N., Bauermann, S.G., Pereira, A.B. (2016) Poaceae pollen from Southern Brazil: Distinguishing grasslands (campos) from forests by analyzing a diverse range of poaceae species. *Front Plant Sci 7: 1–18.*
- Radaeski, J.N., Bauermann, S.G., Schneider, A.A., Liskoski, P.E., Silva, C.I. da. (2017) *Pólen de gramíneas Sul-Brasileira. Canoas 132p.*
- Rocha, A. dos S. (2015) Estudos de interação genótipos por cortes semestrais e correlações em capim elefante para fins energéticos. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–59p.
- Rocha, A. dos S., Daher, R.F., Gravina, G. de A., Pereira, A. Vander., Rodrigues, E.V., Viana, A.P., Silva, V.Q.R. da., Amaral Junior, A.T. do., Novo, A.A.C., Oliveira, M.L., Fonseca., Oliveira, E. da S. (2015) Comparison of stability methods in elephant-grass genotypes for energy purposes. *African J Agric Res 10: 4283–4294.*
- Rodrigues, E.V., Daher, R.F., Santos, A., Vivas, M., Machado, J.C. Gravina, G. do A. Souza, Y.P., Vidal, A.K., Rocha, A.S., Freitas, R.S. (2017). Selecting elephant grass families and progenies to produce bioenergy through mixed models (REML/BLUP) *Genetics and Molecular Research 16: 1 – 12.*

- Rodrigues, E.V. (2016) Seleção de genótipos de capim-elefante via modelos mistos para produção de bioenergia. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–76p.
- Salgado-Labouriau, M.L. (1973) *Contribuição a palinologia dos verrados*. Rio de Janeiro 291p.
- Samson, R., Mani, S., Boddey, R., Sokhansanj, S., Quesada, D., Urquiaga, S., Reis, V., Lem, C.H. (2005) The potential of C4 perennial grasses for developing a global BIOHEAT Industry. *CRC Crit Rev Plant Sci* 24: 461–495.
- Santos, C.F. de O. (1963) Características morfológicas dos Grãos de Pólen das principais Plantas Apícolas. *An da Esc Super Agric Luiz Queiroz* 20: 175–228.
- Santos, C.F.O. (1978) Morfologia do pólen de algumas compostas apícolas. *An da Esc Super Agric Luiz Queiroz* 35: 441–456.
- Schuler, L., Behling, H. (2011) Poaceae pollen grain size as a tool to distinguish past grasslands in South America: a new methodological approach. *Veget Hist Archaeobot* 20: 83–96.
- Seye, O. (2003) Análise de ciclo de vida aplicada ao processo produtivo de cerâmica estrutural tendo como insumo energético Capim Elefante (*Pennisetum Purpureum* Schaum). Universidade Estadual de Campinas 167p.
- Shivanna, K.R., Rangaswamy, N.S. (1992) *Pollen biology: A laboratory manual*. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 210p.
- Silva, A.L. da., Passos, A.R., Santos, K.S. dos., Amorim, C.G. de A. (2017) Efeito do horário de coleta sobre a viabilidade polínica em *Physalis peruviana*. *An Semin Iniciação Científica* 1–4.
- Silva, L.A.C. da., Pagliarini, M.S., Santos, S.A., Valle, C.B. do. (2010) Receptividade dos Estigmas de Acessos da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Lucas), Pantanal. *Simpan* 1.
- Silva, V.B. da. (2016) Predição de ganhos genéticos com seleção entre e dentro

- de famílias de irmãos completos de capim-elefante para fins energéticos. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–60p.
- Silva, V.B., Daher, R.F., Souza, Y.P., Menezes, B.R. da S., Santos, E.A., Freitas, R.S., Oliveira, E.S., Stida, W.F., Cassaro, S. (2020). Assessment of energy production in full-sibling families of elephant grass by mixed models. *Renewable Energy* 146: 744 -749.
- Silva, V.B., Daher, R.F., Araújo, M.S.B., Souza, Y.P., Cassaro, S., Menezes, B.R.S., Gravina, L.M., Novo, A.A.C., Tardin, F.D., Amaral Júnior, A.T. (2016). Prediction of genetic gains by selection indices using mixed models in elephant grass for energy purposes. *Genetics and Molecular Research* 16: 1 – 8.
- Sousa, L.B. de., Daher, R.F., Da Silva Menezes, B.R., Rodrigues, E.V., Tardin, F.D., De Amaral Gravina, G., Vander Pereira, A. (2016) Qualidade da biomassa em híbridos de capim-elefante para fins energéticos. *Rev Bras Ciências Agrar* 11: 85–91.
- Souza, Y.P. de. (2017) Repetibilidade de caracteres morfoagronômicos, adaptabilidade e estabilidade de genótipos de capim- elefante para produção de biomassa com fins energéticos. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–80p.
- Souza, Y.P., Daher, R.F., Pereira, A.V., Silva, V.B., Freitas, R.S., Gravina, G.A. (2017). Repeatability and minimum number of evaluations for morpho-agronomic characters of elephant-grass for energy purposes. *Agrária* 12: 391-397.
- Souza, M., Pereira, T.N.S., Martins, E.R. (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência e Agrotecnologia* 26: 1209–1217.

- Souza, M.M., Pereira, T.N.S., Viana, A.P., Pereira, M.G., Amaral Júnior, A.T. do., Madureira, H.C. (2004) Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*. *Sci Hortic (Amsterdam)* 101: 373–385.
- Souza, S.A.M. (2012) Fenologia reprodutiva, germinação de sementes e morfologia polínica em *Passiflora* spp. 183p.
- Sree Rangasamy, S.R. (1972) Cytological studies on diploid and polyploid taxa of the genus *Pennisetum* Rich. *Genetica* 43: 257–273.
- Stiehl-Alves, E.M., Martins, M.P. (2008) Biologia reprodutiva de *Acacia mearnsii* de Wild.: Receptividade de estigmas. *R Árvore* 32: 609–616.
- Sujatha, D.M., Manga, V., Rao, M.V.S., Murty, J.S.R. (1989) Meiotic Studies in Some Species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). *Cytologia (Tokyo)* 54: 641–652.
- Techio, V.H., Davide, L.C., Pedrozo, C.A., Pereira, A. V. (2006a) Viabilidade do grão de pólen de acesso de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Sci Biol Sci* 28: 7–12.
- Techio, V.H., Davide, L.C., Pereira, A. Vander. (2006b) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genet Mol Biol* 29: 353–362.
- Veiga, J.B. da. (1990) Utilização do capim-elefante sob pastejo. *Embrapa* 133–154.
- Vidal, A.K.F. (2018) Capacidade combinatória em capim-elefante por meio de dialelo circulante para produção de biomassaenergética. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de planta) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 1–57p.
- Zhang, Y., Yuan, X., Teng, W., Chen, C., Liu, H., Wu, J. (2015) Karyotype diversity analysis and nuclear genome size estimation for *Pennisetum* Rich. (Poaceae) ornamental grasses reveal genetic relationship and chromosomal evolution. *Sci Hortic (Amsterdam)* 193: 22–31.