

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

NAIANA BARBOSA DINATO

VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DE ESPÉCIES DE
Paspalum APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO VISANDO SEU
USO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO
GENÉTICO

SÃO CARLOS - SP
2020

NAIANA BARBOSA DINATO

VIABILIDADE DE GRÃOS DE PÓLEN DE ESPÉCIES DE *PASPALUM* APÓS A
CRIOPRESERVAÇÃO VISANDO SEU USO EM PROGRAMAS DE MELHORAMENTO
GENÉTICO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética e Evolução.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Alessandra Pereira Fávero

Coorientador(a): Dr^a. Bianca Baccili Zanotto Vigna

São Carlos - SP
2020

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Dinato, Naiana Barbosa

Viabilidade de grãos de pólen de espécies de Paspalum após a
criopreservação visando seu uso em programas de melhoramento genético. /
Naiana Barbosa Dinato. -- 2020.

164 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,
São Carlos

Orientador: Alessandra Pereira Fávero

Banca examinadora: Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna, Dra. Monalisa
Sampaio Carneiro, Dr. Paulo Teixeira Lacava, Dra. Fernanda Ancelmo de
Oliveira, Dra. Cristiana de Gaspari Pezzopane

Bibliografia

1. Criopreservação. 2. Grãos de pólen. 3. Gramíneas. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Naiana Barbosa Dinato, realizada em 28/02/2020:

Profa. Dra. Alessandra Pereira Fávero
UFSCar

Profa. Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna
EMBRAPA

Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro
UFSCar

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

Profa. Dra. Fernanda Ancelmo de Oliveira
UNICAMP

Profa. Dra. Cristiana de Gaspari Pezzopane
UNICEP

À minha família, em especial meus amados pais, **Gilberto Luiz Dinato** e **Eliete Barbosa Dinato**, por todo amor, incentivo, confiança e apoio sem fim, **dedico**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar e acima de tudo a **Deus**, por todas as graças concedidas em minha vida e por estar sempre comigo em todos os momentos.

À minha **mãe** Eliete Aparecida Barbosa Dinato e ao meu **pai** Gilberto Luiz Dinato, os amores da minha vida, vocês, que me ensinaram os valores que norteiam as minhas escolhas, que não mediram esforços para lutar comigo nessa batalha e conquistar o tão sonhado título, sem o apoio, carinho e amor incondicional de vocês nada disso teria se concretizado, pois possibilitaram todas as condições emocionais para o desenvolvimento da minha vida pessoal e acadêmica, sempre me incentivando e me dando forças a continuar sempre, mesmo diante de todos os obstáculos que apareceram no caminho, foi graças ao apoio que eu consegui chegar até aqui, nada do que eu disser será tão grandioso quanto o amor e gratidão que sinto. Amo muito vocês!

À minha **irmã** Tatiana Barbosa Dinato, pelo amor, apoio, companheirismo e carinho que sempre tivemos, por sempre estar ao meu lado vibrando a cada conquista, você, que sempre me incentivou a correr atrás dos meus sonhos e estava sempre ali disposta a ajudar, mesmo que fosse só me ouvir ou me dar um abraço e dizer que tudo ia dar certo, obrigada por me ensinar a crescer a cada dia e me mostrar o melhor caminho a seguir, e pela colaboração no término deste trabalho. Amo você!

À minha **avó** Hilda dos Santos Barbosa e meu avô João Batista Dinato (in memoriam), pelos ensinamentos, pelas orações, por sempre preocuparem comigo e me apoiar, pelos conselhos nos momentos difíceis, pelas palavras de conforto quando eu mais precisava, principalmente para superar a distância. Vocês foram fundamentais nessa luta.

A todos os **familiares** que sempre torceram por mim, apoiando e incentivando.

Obrigada por vocês entenderem a minha ausência em muitos momentos de suas vidas e também por acreditarem e torcerem por mim durante todo este tempo;

Ao meu **namorado** Thiago de Almeida Vidal, por todo amor e dedicação, você que é meu companheiro, amigo, confidente, que esteve presente nesses quatro anos de forma intensa em minha vida, compartilhando comigo todos meus propósitos, anseios, vitórias, lágrimas, sorrisos, obrigada por compartilhar esse sonho, e por acreditar que sou capaz, muitas vezes

quando eu fraquejava e pensava em desistir, foi você que com amor, paciência e com as palavras certas, cheias de sabedoria me fez seguir em frente. Você me ensinou a crescer e a desfrutar de momentos maravilhosos, muito obrigada. Amo você!

À minha **orientadora** Alessandra Pereira Fávero, pela amizade construída nesses últimos seis anos, com você eu cresci tanto pessoalmente quanto profissionalmente, você me mostrou o caminho a seguir, sempre com muita dedicação, despertando em mim sabedoria, estimulando e motivando para que eu continuasse nessa caminhada, você sempre alegre e entusiasmada com a ciência e a pesquisa, me fez ver a vida com outros olhos, mais voltados ao descobrir, a experimentar a ciência e ter resultados incríveis, e saber aproveitar a melhor sensação do mundo que é quando dá certo! Muito obrigada pela paciência, orientação, por sonhar junto comigo, por poder ter dividido todo seu conhecimento e pela confiança depositada em mim, esses ensinamentos me acompanharão sempre, o meu sincero obrigada.

À minha **co-orientadora** Bianca Baccili Zanotto Vigna, que desempenhou mais que um papel de co-orientação, muitas vezes foi uma amiga, com seu jeitinho tranquilo e sereno me transmitiu confiança, coragem para enfrentar os obstáculos e com generosidade dividiu comigo um pouco da sua paixão pela genética molecular, e me ensinou muito, obrigada pela paciência, gentileza e disposição em ensinar, discutir e ajudar, serei sempre grata.

Aos **colegas** que a vida me presenteou nessa jornada, Ailton, Jhonne, Naiane, Isabela, Nahyda, Júlia, Tiago, Verônica, Lucas, obrigada pela grande ajuda durante a fase de coleta de material deste estudo, pelo companheirismo e pela bela amizade construída e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, em especial à minha amiga-irmã Natalia pelos momentos de descontração, pela amizade, conselhos, broncas, sugestões, paciência, companhia e por todo auxílio no desenvolvimento deste projeto, gratidão “miga”.

Aos **amigos** que deixei em Itumbiara, Tatiane, Cristiane, Gefferson, Franciele, Camila, que não estiveram fisicamente próximos, mas que de alguma forma contribuíram para este trabalho, sempre torcendo por mim.

A todos os **professores** que contribuíram para o meu conhecimento e minha formação sempre preocupados em deixar algo além do saber.

Aos **pesquisadores** Dr. Marcelo Cavallari, pela ajuda na separação das sementes e apoio, Dr. Frederico de Pina Matta, pela orientação para a execução dos cruzamentos e pelas

conversas, ensinamentos e distrações durante esse trajeto e Dr. Waldomiro Barioni Junior, pela preciosa contribuição nas análises estatísticas.

Aos **funcionários** da Embrapa Pecuária Sudeste, Natal, Victor, Wilson, Márcio, Emar (Mineiro), Rogério, pela amizade e valiosa ajuda na concretização dessa pesquisa, auxiliando principalmente na utilização dos laboratórios e da casa de vegetação, em especial a Rita, que sempre me recebia com um sorriso no rosto e estava pronta a aconselhar quando necessário.

Só existe uma maneira de retribuir todo esse carinho e dedicação oferecido durante esses anos, sendo para vocês, o que são para mim! Obrigada por tudo, carregarei no coração, a lembrança de cada momento compartilhado, de cada sorriso e lágrimas derramadas, hoje fica a certeza que existem pessoas que jamais serão esquecidas, essas são vocês!!!

À Universidade Federal de São Carlos **UFSCar**, pela realização de minha formação profissional, ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular **PPGGEv** pela oportunidade concedida, e por alguns dos melhores anos de minha vida, em especial à secretária Ivanildes Menezes pelo apoio e dedicação nas horas que mais precisei.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**), pela concessão da bolsa de estudos.

À **banca**, por aprimorar esse trabalho, fornecendo subsídios para a melhoria deste.

E a **todos** aqueles que de uma forma ou de outra, colaboraram para a conclusão deste trabalho e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, e que, embora não citados aqui, não deixam de merecer meu agradecimento.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Paspalum é um gênero da família *Poaceae*, nativo da América, do qual muitas espécies apresentam potencial forrageiro. A alta diversidade genética natural observada no gênero pode ser utilizada para a obtenção e lançamento de novas cultivares. Para que ocorra a hibridação, uma das premissas é que o período de floração entre os genitores seja sincronizado. A coleta de pólen do genitor masculino e o armazenamento até que o genitor feminino esteja apto é uma alternativa para florescimento assíncrono. Este estudo visou determinar a morfologia polínica e a viabilidade de grãos de pólen de *Paspalum atratum*, *P. malacophyllum* e *P. regnellii* criopreservados por 12 meses e seu uso em cruzamentos intra e interespecíficos, confirmando assim sua viabilidade *in vivo*. Os grãos de pólen foram coletados em vasos em casa de vegetação, na Embrapa Pecuária Sudeste, com três repetições de cada tratamento. Foram testados dois agentes de desidratação (LiCl e Sílica gel) por três tempos distintos (30', 60' e 120') e um tratamento sem desidratação. Após descongelamento lento, os grãos de pólen foram avaliados quanto à viabilidade por coloração com solução de tetrazólio 0,25%. Grãos recém-colhidos também foram avaliados como controle. Observou-se que os grãos de pólen permaneceram viáveis após 12 meses quando foram desidratados com cloreto de lítio por 30 minutos e sílica gel por 120 minutos, sendo que foram iguais estatisticamente à testemunha. Tais tratamentos podem ser considerados como bons protocolos de conservação a longo prazo do pólen de *Paspalum*. Os grãos de pólen criopreservados foram também testados quanto à viabilidade *in vivo*, sendo observados em microscopia de fluorescência. Os seguintes cruzamentos intra e interespecíficos foram realizados entre janeiro e fevereiro de 2018: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); *P. urvillei* x *P. regnellii* (BGP 215, planta F₁ #37 (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308). As espiguetas foram retiradas periodicamente, por tempos distintos após a polinização, fixadas em solução de F.A.A. (1: formaldeído, 1: ácido acético glacial, 8: álcool etílico 80%) por 30 minutos e armazenadas em etanol 70%. Observou-se que em todos os cruzamentos houve efetiva germinação dos grãos de pólen e que em alguns cruzamentos o tubo polínico alcançou a micrópila. Para a caracterização morfológica polínica foi realizada acetólise láctica e fotomicrografia em MEV (microscopia eletrônica de varredura). O resultado das análises morfométricas mostrou que os grãos de pólen tiveram forma de prolato-esferoidal e subprolato, que não há ornamentação na exina e que há pouca diferença quanto ao tamanho entre as espécies avaliadas. Como comprovação da viabilidade e eficácia dos grãos de pólen criopreservados, esses foram utilizados em cruzamentos intra e interespecíficos a fim de elucidar a capacidade do grão produzir sementes viáveis e possibilitar a hibridação entre espécies de *Paspalum* com uso de grãos de pólen criopreservados. Os grãos de pólen ficaram armazenados em nitrogênio líquido por cerca de 12 meses, quando foram realizados cruzamentos entre diferentes espécies nas combinações: (1) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); (2) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215); (3) 366_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii*/BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (4) 365_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii*/BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215); (5) *P. regnellii* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215); (6) plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42 (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) e (7) plantas F₁ #10 e F₁ #37 (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. malacophyllum* (BGP 293). Foram polinizadas 5850 espiguetas em todas as combinações, que resultaram em 830 cariopses, das quais 445 plântulas germinaram. Foi realizada a caracterização morfológica das progênies com base em descritores morfológicos de *Paspalum*. Os genitores masculinos e femininos compartilhavam características semelhantes e

em alguns cruzamentos, não foi possível diferenciar os híbridos por morfologia. Em nenhum cruzamento foi possível realizar a análise multivariada baseada em componentes principais. Logo, para confirmar o caráter híbrido dos indivíduos, foi realizada análise pelo uso de marcadores microssatélites (SSR) e inter-microssatélites (ISSR). Marcadores moleculares foram selecionados na literatura com base nas espécies para os quais foram desenvolvidos e/ou avaliados. Observou-se que, dos sete marcadores ISSR testados, cinco conseguiram diferenciar os genitores de alguns cruzamentos: (CT)₈-G, (AC)₈-T, (CA)₈-G, (ATG)₅-GA e (GA)₈-C, e, dos 50 SSR selecionados, 16 diferenciaram os genitores dos cruzamentos realizados. Foram avaliados, pelo menos, quatro marcadores polimórficos para cada cruzamento. Foram identificados 73 híbridos no total, incluindo todos os cruzamentos realizados. Diante dos resultados é possível concluir que grãos de pólen de *Paspalum* possuem alta viabilidade após criopreservação por até 365 dias, se desidratados com cloreto de lítio e/ou sílica gel. A microscopia de fluorescência mostrou que grãos de pólen criopreservados germinaram com eficácia em estigma e em alguns casos, a micrópila foi atingida. Em cruzamentos intra e interespecíficos utilizando esses grãos de pólen, foi possível identificar híbridos com uso de marcadores moleculares, portanto grãos de pólen criopreservados podem ser usados em programas de melhoramento genético para possibilitar a sincronia entre espécies de florescimento assíncrono.

Palavras-chave: *Paspalum atratum*, *Paspalum malacophyllum*, *Paspalum regnellii*, *Paspalum urvillei*, criopreservação, viabilidade de grãos de pólen

ABSTRACT

Paspalum is a genus of the Poaceae family, native to America, of which many species have forage potential. The high natural genetic diversity observed in the genus can be used to obtain and launch new cultivars. For hybridization to occur, one of the premises is that the flowering period between parents is synchronized. Collecting pollen from the male parent and storing it until the female parent is ready is an alternative to asynchronous flowering. This study aimed to determine the pollen morphology and viability of pollen grains from *Paspalum atratum*, *P. malacophyllum* and *P. regnellii* cryopreserved for 12 months and their use in intra and interspecific crosses, thus confirming their viability *in vivo*. Pollen grains were collected in pots in a greenhouse, at Embrapa Pecuária Sudeste, with three replicates of each treatment. Two dehydrating agents (LiCl and silica gel) were tested for three different times (30', 60' and 120') and a treatment without dehydration. After slow thawing, pollen grains were evaluated for viability by staining with 0.25% tetrazolium solution. Freshly harvested grains were also evaluated as controls. It was observed that the pollen grains remained viable after 12 months when they were dehydrated with lithium chloride for 30 minutes and silica gel for 120 minutes, being that they were statistically equal to the control. Such treatments can be considered as good protocols for long-term conservation of *Paspalum* pollen. The cryopreserved pollen grains were also tested for viability *in vivo*, being observed under fluorescence microscopy. The following intra and interspecific crosses were performed between January and February 2018: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); *P. urvillei* x *P. regnellii* (BGP 215, plant F1 # 37 (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308). The spikelets were removed periodically, for different times after pollination, fixed in FAA solution (1: formaldehyde, 1: glacial acetic acid, 8: 80% ethyl alcohol) for 30 minutes and stored in 70% ethanol. It was observed that in all crosses there was effective germination of grains of pollen tube and that in some crossings the pollen tube reached the micropyle. For pollen morphological characterization, lactic acetolysis and SEM photomicrography (scanning electron microscopy) were performed. The result of the morphometric analyzes showed that the pollen grains had a spheroidal prolate shape and subprolate, that there is no ornamentation in the exine and that there is little difference in size between the species evaluated. As proof of the viability and efficacy of cryopreserved pollen grains, these were used in intra and interspecific crosses in order to elucidate the capacity of the grain to produce viable seeds and to enable hybridization between *Paspalum* species using cryopreserved pollen grains. The pollen grains were stored in liquid nitrogen for about 12 months, when crosses between different species were made in the combinations: (1) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); (2) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215); (3) 366_C 33 (*P. regnellii* / BGP 258 x *P. regnellii* / BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (4) 365_C 33 (*P. regnellii* / BGP 258 x *P. regnellii* / BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215); (5) *P. regnellii* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215); (6) F1 # 10, F1 # 4, F1 # 37 and F1 # 42 plants (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) and (7) F1 # 10 and F1 # 37 plants (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. malacophyllum* (BGP 293). 5850 spikelets were pollinated in all combinations, resulting in 830 caryopses, of which 445 seedlings germinated. The morphological characterization of the progenies was carried out based on *Paspalum* morphological descriptors. Male and female parents shared similar characteristics and in some crosses, it was not possible to differentiate hybrids by morphology. In no intersection

was it possible to perform multivariate analysis based on main components. Therefore, to confirm the hybrid character of the individuals, an analysis was performed using microsatellite (SSR) and inter-microsatellite (ISSR) markers. Molecular markers were selected in the literature based on the species for which they were developed and / or evaluated. It was observed that, of the seven ISSR markers tested, five managed to differentiate the parents of some crosses: (CT) 8-G, (AC) 8-T, (CA)₈-G, (ATG) 5-GA and (GA) 8-C), and of the 50 SSR selected, 16 differentiated the parents from the crosses performed. At least four polymorphic markers were evaluated for each crossing. A total of 73 hybrids were identified, including all crosses performed. In view of the results, it is possible to conclude that pollen grains from *Paspalum* have high viability after cryopreservation for up to 365 days, if dehydrated with lithium chloride and / or silica gel. Fluorescence microscopy showed that cryopreserved pollen grains germinated effectively in stigma and in some cases, the micropyle was affected. In intra and interspecific crosses using these pollen grains, it was possible to identify hybrids using molecular markers, so cryopreserved pollen grains can be used in breeding programs to enable synchrony between asynchronous flowering species.

Keywords: *Paspalum atratum*, *Paspalum malacophyllum*, *Paspalum regnellii*, *Paspalum urvillei*, cryopreservation, pollen grains viability

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conservação a longo prazo de grãos de pólen em diferentes espécies.....	37
Tabela 2 - Relação das espécies de <i>Paspalum</i> estudadas para identificar a viabilidade de pólen após criopreservação e seu uso em cruzamentos intra e interespecíficos.....	55
Tabela 3 - Porcentagem de grãos de pólen corados com 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), após 1 dia a 365 dias de armazenamento em nitrogênio líquido.....	61
Tabela 4 - Quantidade de grãos de pólen criopreservados de <i>P. malacophyllum</i> e <i>P. regnellii</i> germinados após polinização cruzada em <i>Paspalum urvillei</i>	67
Tabela 5 - Porcentagem de grãos de pólen germinados no estigma por cruzamento após período de polinização estimado entre 30 minutos e 24 horas.	72
Tabela 6 - Características morfológicas de grãos de pólen de acessos do gênero <i>Paspalum</i>	75
Tabela 7 - Características dos acessos utilizados como genitores nos cruzamentos intra e interespecíficos	98
Tabela 8 - Porcentagem de cruzabilidade entre as combinações descritas no capítulo, utilizando grãos de pólen desidratados com Sílica gel por 120 minutos e Cloreto de Lítio por 30 minutos e armazenados no nitrogênio líquido por até 10 meses, número de híbridos identificados morfológicamente, número de híbridos confirmados molecularmente por cruzamento e taxa de formação de híbridos para cada combinação.....	105
Tabela 9 - Marcadores moleculares microssatélites (SSR) e intermicrossatélites (ISSR) avaliados nos genitores <i>P. urvillei</i> (1), <i>P. malacophyllum</i> (2 e 3), <i>P. regnellii</i> (4 e 8), Híbridos: 366_C33 (9), 365_C33 (10), 399_D27 (11) usados nas diferentes combinações de cruzamentos.	107
Tabela 10 - Polimorfismo entre os genitores de cada cruzamento realizado e identificação e quantidade de híbridos identificados de acordo com cada marcador molecular avaliado.....	112
Tabela 11 - Características dos materiais utilizados como genitor masculino (3, 5 e 6) e genitor feminino (7) nos cruzamentos interespecíficos de <i>Paspalum</i> sp. propostos no capítulo	142
Tabela 12 - Porcentagem de cruzabilidade entre as combinações descritas no capítulo, utilizando grãos de pólen desidratados com sílica gel por 120 minutos e cloreto de lítio por 30 minutos e armazenados no nitrogênio líquido por até 10 meses, número de híbridos por cruzamento e taxa de formação de híbridos para cada combinação.....	148
Tabela 13 - Marcadores moleculares microssatélites (SSR) e intermicrossatélites (ISSR) avaliados nos genitores <i>plicatulum 4PT</i> x <i>P. guenoarum</i> cv. <i>Azulão</i> (7), <i>P. malacophyllum</i> (3), <i>P. atratum</i> (5 e 6) usados nas diferentes combinações de cruzamentos.....	151
Tabela 14 - Identificação de híbridos de <i>Paspalum</i> por marcador molecular nos cruzamentos realizados em 2018 e 2019.	154

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da desidratação dos grãos de pólen, utilizando agentes de desidratação. A) Sílica gel azul. B) Solução saturada de Cloreto de Lítio. Fonte: autora..... 56
- Figura 2.** Grãos de pólen viáveis (seta amarela) e inviáveis (setas vermelhas), das testemunhas (A1: *P. malacophyllum* - BGP 6; A2: *P. malacophyllum* - BGP 293; A3: *P. atratum* - BGP 98; A4: *P. atratum* - BGP 308), dos melhores tratamentos da tabela 3 por genótipo: BGP 6 (B); BGP 293 (C); BGP 98 (D); BGP 308 (E) e do pólen sem desidratação (F1: BGP 6; F2: BGP: 293; F3: BGP 98; F4: BGP 308), após 12 meses de armazenamento. Fonte: autora..... 63
- Figura 3.** Germinação do tubo polínico no estigma após 5 horas de polinização com grão de pólen criopreservado. A: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215), B: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 393). Imagem em microscópio óptico com filtro de fluorescência..... 66
- Figura 4.** Desenvolvimento do tubo polínico no estigma até atingir a micrópila. A) Cruzamento entre BGP 393 x BGP 6 após 2 horas e 15 minutos de polinização, o tubo atinge a micrópila. B) Cruzamento entre BGP 393 x BGP 293, após 6 horas de polinização, o tubo polínico atinge a micrópila. Fonte: autora..... 70
- Figura 5.** Grãos de pólen aderidos no estigma sem a germinação do tubo polínico, cruzamento realizado entre o híbrido *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#37 x *P. atratum* (BGP 308), após 3 horas de polinização. Imagem em microscópio óptico com filtro de fluorescência..... 72
- Figura 6.** Visão polar e equatorial de grãos de pólen acetolisados de genótipos de *Paspalum*. A) *Paspalum malacophyllum* (BGP 6), B) *Paspalum malacophyllum* (BGP 293), C) *Paspalum regnellii* (BGP 215), D) *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão E) *Paspalum atratum* (BGP 98), F) *Paspalum atratum* (BGP 308), G) *Paspalum urvillei* (BGP 393), H) *Paspalum notatum*. Barras: 20 µm. Imagens obtidas em microscopia de luz por acetólise lática. Fonte: autora..... 76
- Figura 7.** Grãos de pólen de *Paspalum* em MEV- aspecto geral do grão de pólen monosporado, mostrando opérculo. Exina com espínulos densamente dispostos. A) *Paspalum malacophyllum* (BGP 6), B) *Paspalum atratum* (BGP 98), C) *Paspalum regnellii* (BGP 215), D) *Paspalum notatum* E) *Paspalum malacophyllum* (BGP 293), F) *Paspalum atratum* (BGP 308), G) *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão, H) *Paspalum urvillei* (BGP 393). Imagens obtidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Barras indicadas na figura. Fonte: autora..... 77
- Figura 8.** Câmara com o umidificador instalado, na qual foram realizados os cruzamentos de *Paspalum*..... 99
- Figura 9.** Dendrograma de análise de agrupamento (UPGMA), utilizando o índice coeficiente de similaridade de Jaccard, para os genitores utilizados nas diferentes combinações de cruzamentos do capítulo: híbrido F₁ 399_D27 oriundo do cruzamento entre *P. regnellii* (BGP 215) e *P. malacophyllum* (BGP 293); híbridos F₁ 366_C33 e 365_C33 oriundos do cruzamento entre *P. regnellii* (BGP 258) e *P. regnellii* (BGP 397), *Paspalum regnellii* (BGP 258), *Paspalum regnellii* (BGP 215), *Paspalum malacophyllum* (BGP 6 e BGP 293) e *Paspalum urvillei* (BGP 393)..... 115
- Figura 10.** Análise de componentes principais com os descritores morfológicos para o cruzamento entre *P. urvillei* (1) x *P. malacophyllum* (2)..... 118

- Figura 11.** Análise de componentes principais com os descritores morfológicos para o cruzamento entre *P. urvillei* (1) x *P. malacophyllum* (3). 119
- Figura 12.** Análise de componentes principais com os descritores morfológicos para o cruzamento entre *P. urvillei* (1) x *P. regnellii* (4). 120
- Figura 13.** Perfil de amplificação do marcador Pp-UNICAMP 21 em gel de poliacrilamida 6% das amostras do cruzamento entre *Paspalum urvillei* (BGP 393) e *Paspalum regnellii* (BGP 215). O alelo exclusivo do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirma a hibridação está indicado pelas setas vermelhas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). L: padrão de peso molecular 10 pb (Invitrogen). 122
- Figura 14.** Perfil de amplificação do marcador ISSR 2, em gel de agarose 2%, das amostras do cruzamento entre *Paspalum urvillei* (BGP 393) e *Paspalum malacophyllum* (BGP 293). O alelo exclusivo do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirma a hibridação está indicado pelas setas vermelhas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwig. 123
- Figura 15.** Dendrograma de análise de agrupamento (UPMGMA), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, para os genitores utilizados nas diferentes combinações de cruzamentos do capítulo: híbrido *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – plantas F₁#10, F₁#42, F₁#04, F₁#37; *Paspalum malacophyllum* (BGP 293); *Paspalum atratum* (BGP 98 e BGP 308). 157
- Figura 16.** Perfil de amplificação do marcador PA02C3 em gel de poliacrilamida 6% das amostras do cruzamento entre *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão – planta F₁#10 e *Paspalum atratum* (BGP 308). Os alelos exclusivos do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirmam a hibridação estão indicados pelas setas vermelhas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de bases (pb). L: padrão de peso molecular 10 pb (Invitrogen). 158
- Figura 17.** Perfil de amplificação do marcador ISSR 10, em gel de agarose 2%, das amostras do cruzamento entre *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão – plantas F₁#10 e planta F₁#42 e *Paspalum atratum* (BGP 98). O alelo exclusivo do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirma a hibridação estão indicados pelas setas amarelas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwig. 159

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	19
LITERATURAS CONSULTADAS	24
OBJETIVOS	29
Geral	29
Específicos.....	29
Capítulo 1	30
Pollen Cryopreservation: A review for plant breeding and genetic resources approaches	31
Abstract.....	31
1.0 INTRODUCTION	31
1.1 CRYOPRESERVATION: DEFINITION AND ITS IMPORTANCE ON POLLEN CONSERVATION	32
1.2 HOW CAN WE DO THE POLLEN CRYOPRESERVATION?	33
1.2.1 Pollen Dehydration	33
1.2.2 Freezing of pollen grains	36
1.2.3 Thawing	36
1.3 POLLEN VIABILITY AFTER CRYOPRESERVATION.....	36
1.4 FINAL CONSIDERATIONS.....	39
1.5 REFERENCES	39
Capítulo 2	44
MORFOLOGIA E VIABILIDADE IN VITRO E IN VIVO DE GRÃOS DE PÓLEN CRIOPRESERVADOS DE <i>Paspalum</i> SPP. (POACEAE).....	45
RESUMO	46
ABSTRACT	48
2.0 INTRODUÇÃO.....	50
2.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
2.1.1 Material vegetal e cruzamentos	54
2.1.2 Coleta e armazenamento de grãos de pólen	55
2.1.3 Desidratação de grãos de pólen por meio de sais saturados e criopreservação	56
2.1.4 Porcentagem de grãos de pólen corados com solução de tetrazólio (teste histoquímico).....	56
2.1.5 Viabilidade de pólen por germinação in vivo.....	57
2.1.6 Morfologia polínica	58
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
2.2.1 Porcentagem de grãos de pólen corados com solução de tetrazólio (teste histoquímico).....	59
2.2.2 Viabilidade de pólen por germinação in vivo via fluorescência (desenvolvimento do tubo polínico no estigma)	66
2.2.3 Morfologia polínica	74
2.3 CONCLUSÃO.....	78
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
Capítulo 3	85
CRUZAMENTOS INTRA E INTERESPECÍFICOS ENTRE <i>Paspalum malacophyllum</i> , <i>Paspalum regnellii</i> e <i>Paspalum urvillei</i> UTILIZANDO GRÃOS DE PÓLEN CRIOPRESERVADOS	86
RESUMO	87

3.0 INTRODUÇÃO.....	90
3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	97
3.1.1 Material Vegetal	97
3.1.2 Cruzamentos intra e interespecíficos.....	99
3.1.3 Coleta de sementes e germinação.....	100
3.1.4 Identificação de híbridos de <i>Paspalum</i> spp. pelo uso de características morfológicas	100
3.1.5 Confirmação de hibridação usando marcadores SSR e ISSR.....	101
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
3.4 PERSPECTIVAS FUTURAS	124
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
Capítulo 4	133
SUPERANDO ASSINCRONIA DE FLORESCIMENTO EM <i>Paspalum</i> PELO USO DE GRÃOS DE PÓLEN CRIOPRESERVADOS	134
RESUMO	135
4.0 INTRODUÇÃO.....	138
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	141
4.1.1 Material Vegetal	141
4.1.2 Cruzamentos intra e interespecíficos.....	143
4.1.3 Coleta de sementes e germinação.....	143
4.1.4 Avaliação visual das plantas.....	143
4.1.5 Confirmação de hibridação com marcadores SSR e ISSR.....	144
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
4.3 CONCLUSÃO.....	159
4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS	160
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BAG: Banco Ativo de Germoplasma

BGP: Banco de Germoplasma de *Paspalum*

BOD: Demanda de oxigênio bioquímico

CAT: catalase exógena

CTAB: Hexadecil catiônico brometo de trimetil amônio

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECM: Matriz celular do estilete

ERO: espécies reativas de oxigênio

FCR: reação fluorocromática

FDA: técnica de coloração com diacetato de fluoresceína

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

LN: nitrogênio líquido

MDH: malato desidrogenase

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PIB: Produto Interno Bruto

PVS: solução de vitrificação de plantas

RH: umidade relativa

SSR: Simple Sequence Repeats

TTC: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UPGMA: Unweighted Pair Group Average Method

INTRODUÇÃO GERAL

Nas quatro últimas décadas, o setor agropecuário exerceu papel determinante na abertura de novas fronteiras no processo de desenvolvimento do Brasil. Na área agrícola, o cultivo de grãos e a pecuária se destacaram neste processo, obtendo melhorias significativas com a implantação de pastagens cultivadas com forrageiras tropicais (GONÇALVES; FRANCHINI, 2007). O Brasil detém o maior rebanho bovino comercial do mundo estimado em 213,5 milhões de animais (IBGE, 2019), para os quais a pastagem é a base alimentar, constituindo cerca de 20% de sua área agricultável coberta com gramíneas, estabelecidas após o desmatamento de floresta ou em substituição a outros tipos de vegetação nativa, o que equivale a cerca de 162,2 milhões de hectares perfazendo mais de 90% da dieta consumida por estes animais (MOREIRA et al., 2006; VILELA, 2001, COSTA, 2015).

De acordo com as estimativas da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), em 2019, a quantidade de carne bovina exportada pelo Brasil foi de aproximadamente 1,84 milhão de toneladas, o que equivale US\$ 7,59 bilhões. Logo, o agronegócio da pecuária bovina contribui com cerca de 2,3% no PIB da agropecuária brasileira, segundo dados do Instituto de Pesquisas Econômicas Aplicadas (IPEA) (2019).

Atualmente, a pecuária brasileira ocupa, aproximadamente, 167,5 milhões de hectares do território nacional e é sustentada por um número muito restrito de espécies forrageiras, sendo que 80% é ocupado com espécies forrageiras africanas, principalmente do gênero *Urochloa* (MACEDO, 2006; IBGE, 2019). A diversidade de espécies forrageiras está concentrada no uso do gênero *Urochloa*, o que limita a capacidade de se elevarem os patamares de produtividade da pecuária brasileira e aumenta a vulnerabilidade dos genótipos aos ataques de pragas e/ou doenças (STRAPASSON et al., 2000). Muitas pastagens do Paraguai, Bolívia, sul do Brasil, norte da Argentina e norte do Uruguai constituem a base da alimentação da pecuária bovina nessas regiões. Nos campos naturais, muitas das espécies nativas de gramíneas pertencem ao gênero *Paspalum*, isto faz supor que a introdução ao cultivo e o melhoramento genético de espécies nativas de *Paspalum* podem ser um caminho para diversificar a oferta de cultivares forrageiras para o Brasil e países vizinhos (ACUÑA, 2011; DIAS FILHO, 2011).

O gênero *Paspalum* compreende cerca de 310 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, basicamente no continente americano (MORRONE et al., 2012). Ocorre em todo Brasil, no leste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (ZULOAGA e MORRONE, 2005). A importância do gênero é evidenciada por sua adaptabilidade a diferentes ecossistemas, o que representa menor risco de causar desequilíbrio

biológico devido à grande diversidade genética existente. Esta é importante por assegurar maior estabilidade ao ecossistema (STRAPASSON et al., 2000).

A grande diversidade apresentada pelas espécies do gênero *Paspalum* levou à sua divisão em grupos informais, proposta por CHASE (1929). Dentre estes, o grupo informal Plicatula engloba espécies morfológicamente semelhantes a *Paspalum plicatulum* Michx. Dentre os caracteres morfológicos das espécies do grupo Plicatula utilizados por Chase (1929), destacam-se os ramos unilaterais rígidos das inflorescências, com espiguetas com convexidade geralmente pronunciada, antécio superior castanho escuro e brilhante e ondulações transversais no lema. Plicatula tem ocorrência restrita ao continente americano, dos Estados Unidos até o Uruguai e a Argentina. No Brasil, estimam-se cerca de 30 espécies anuais e perenes pertencem a esse grupo, algumas endêmicas de determinadas regiões e outras de ampla distribuição pelo continente americano (OLIVEIRA, 2004).

Várias espécies de *Paspalum* apresentam um importante papel forrageiro ou como cobertura vegetal, sendo que, no Brasil, há cerca de 215 espécies descritas dentro deste gênero (FLORA DO BRASIL 2020, 2020). O Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG) da Embrapa Pecuária Sudeste, abriga 387 acessos de 53 espécies de *Paspalum*, distribuídas em 16 grupos informais. O BAG vem sendo caracterizado para diferentes usos e diversos trabalhos publicados desenvolvidos na Embrapa Pecuária Sudeste mostram o grande potencial forrageiro destas espécies (BATISTA e GODOY, 1992a, 1992b, 2000; BELONI et al., 2017; PEZZOPANE et al., 2017). A maioria dos acessos disponíveis no BAG é do grupo Plicatula, que corresponde a 246 acessos. Este grupo é considerado complexo, com mais de 30 espécies, sendo que muitas das espécies são de difícil diferenciação devido a gradações morfológicas. As espécies desse grupo apresentam citotipos sexuais diploides e citotipos tetraploides apomíticos (AGUILERA et al., 2011). O modo de reprodução por apomixia consiste na formação de sementes sem que ocorra fecundação (pseudogamia) (DALL' AGNOL; SCHIFINO WITTMAN, 2005). É descrita para 326 gêneros representando 78 famílias de plantas, e prevalece em Poaceae, Rosaceae e Asteraceae (HOJSGAARD et al., 2014).

Além do grupo Plicatula, esse trabalho abrangeu espécies do grupo Malacophylla, que dentre outras características, possui espécies diplóides, tetraplóides e hexaplóides, sendo os tetraplóides de maior ocorrência (HONFI et al. 1990; HOJSGAARD et al., 2009). Além da grande diversidade morfológica principalmente, presente no grupo relacionada às lâminas foliares (HOJSGAARD et al. 2008; ZILLI et al. 2014), as espécies apresentam boa palatabilidade pelos animais, resistência a doenças e alta fertilidade das sementes (BURTON, 1940), do grupo Virgata que possui espécies perenes, de porte alto e hábito

cespitoso, de aspecto robusto e rizomas curtos, e como característica exclusiva do grupo, as inflorescências são piramidais ou quadrangulares e o antécio apresenta coloração castanho a amarelada (RIGHI GOMES, 1995), a importância desse grupo para produção de forragem foi relatada pela primeira vez por Valls e Pozzobon (1987) e do grupo Dilatata, que já foi amplamente estudado por ser um grupo que abrange várias espécies com potencial forrageiro (PIZARRO, 2002), formando um complexo poliploide nativo da América do Sul temperada, gramínea de estação quente que resiste a geadas durante o inverno (BURSON et al, 1991), essa característica permitiu que algumas espécies do grupo como *Paspalum urvillei* Steudel pudesse alcançar distribuições mundiais desde que tenha clima quente com precipitações frequentes (SPERANZA, 2009).

A partir do BAG (Embrapa), oito acessos (amostra de germoplasma representativa de um indivíduo da população) sexuais e quatro acessos apomíticos foram selecionados para este estudo. A escolha desses acessos/espécies está relacionada ao seu potencial forrageiro já conhecido e ao seu modo de reprodução. A espécie *P. urvillei* foi escolhida como genitor feminino, pois é uma espécie sexual que floresce praticamente o ano todo e já é conhecido por cruzar com algumas das espécies escolhidas como genitores masculinos e de interesse para o programa de melhoramento (BURSON, 1979; BURSON, 1992; BURSON e BENNET, 1972; QUARÍN et al., 1995; BENNETT e BASHAW, 1966; BURTON, 1943). Alguns dos acessos selecionados para serem utilizados como genitores masculinos apresentam boa produção de matéria seca e qualidade nutricional (BGP 98 e BGP 308, ambos *P. atratum* Sw.) (LEITE e FERNANDES, 1999), e outros com alta palatabilidade (BGP 6 e BGP 293, ambos *P. malacophyllum* Trin.) (BURTON, 1940) e outros com alta produção de matéria seca e tolerância à sombra (BGP 215 e híbridos intra-específicos, de *P. regnellii* Mez. (OLIVEIRA et al., 2015).

Um grande desafio enfrentado pelos melhoristas é que algumas espécies que apresentam características de interesse ao programa apresentam assincronia de florescimento, nesse caso, as espécies não poderiam ser cruzadas a campo ou utilizando pólen recém colhido. A assincronia pode ser minimizada pelo conhecimento da fisiologia de florescimento e pelo uso de metodologias que envolvam alteração de hormônios, temperatura ou fotoperíodo (SANTOS, 2002). Os mecanismos fisiológicos responsáveis pelas mudanças relacionadas ao florescimento ainda são pouco conhecidos. As mudanças no estágio de desenvolvimento das plantas dependem da interação entre diversos hormônios: auxinas; citoquininas; etileno; ácido abscísico; e giberelinas (METZGER, 1995). Uma ferramenta exequível para driblar esse

problema seria a conservação dos grãos de pólen até que o genitor feminino estivesse apto a recebê-los.

A conservação do grão de pólen pode ser feita em diferentes temperaturas (5°C, -20°C, -80°C), porém sabe-se que o método mais promissor descrito na literatura para armazenamento a longo prazo é o uso do nitrogênio líquido a -196°C (na fase líquida), ou a -150°C (na fase de vapor) (KARTHA, 1985). Do ponto de vista teórico, acredita-se que o metabolismo fisiológico dos biomateriais é extremamente lento a baixa temperatura e no nitrogênio líquido é praticamente interrompido a um estado de não divisão celular (KARTHA, 1985; BAJAJ, 1995). Soma-se a isto a redução da proliferação de microrganismos, e conseqüentemente à deterioração dos grãos de pólen. Com isto, as variações da taxa respiratória e outros processos metabólicos são minimizados, tornando o pólen quase inativo ou dormente durante o tempo que estiver armazenado. O tempo em que os biomateriais permanecem preservados não reduziria a sua atividade, mantendo a viabilidade por um período indefinido, porém as células devem manter sua estrutura intacta, o que permitirá o retorno de suas atividades normais, após o descongelamento (SNYDER E CLAUSEN, 1974; MEDEIROS E CAVALLARI, 1992; BENSON et al., 1998; CARVALHO e VIDAL, 2003).

O método normalmente adotado para a criopreservação de pólen é a imersão direta em nitrogênio líquido, após desidratação prévia por um agente dessecante, porém a desidratação não é um processo simples, pois a água exerce funções biológicas fundamentais nas células, como solvente, meio de transporte, equilíbrio osmótico, estabilizador da estrutura de macromoléculas e organelas. Portanto, o sucesso da criopreservação dependerá da definição do teor de água, que deverá ser baixo para evitar a formação de cristais de gelo, mas não tão baixo a ponto de causar injúrias nos grãos de pólen por desidratação excessiva (SANTOS, 2001). A temperatura de dessecação não poderá exceder 28°C (ARGERICH E GAVIOLA, 1995). Existem várias técnicas de dessecação como a liofilização (AKIHAMA et al., 1979) e a utilização de recipientes que proporcionem vácuo contendo substâncias higroscópicas, podendo ser sílica gel (AHLGREN e AHLGREN, 1978; PEREIRA et al., 2002, WINSTON e BATES, 1961), solução de cloreto de sódio (FERREIRA et al., 2007), ou outras soluções saturadas de sais.

O armazenamento de pólen é similar ao de semente, o teor de água deve ser ajustado para obter sucesso. A qualidade do pólen é um fator relevante, pois se as anteras forem coletadas muito novas ou velhas não sobrevivem bem ao armazenamento e também há uma baixa fertilidade quando as plantas se encontram estressadas (TOWILL, 2002)

Conforme Bajaj (1995), o descongelamento do pólen pode ser feito de forma lenta à temperatura ambiente ou rapidamente usando banho-maria (37 a 40°C). Assim, segundo dados coletados por Mazur (1969), o descongelamento rápido é mais danoso às células vegetais do que o lento, pois a desplasmólise rápida pode levar à morte celular. Vale ressaltar que os resultados de diferentes etapas interferem na eficiência do processo de criopreservação, como o preparo, criopreservação e descongelamento do material. Portanto, em comparação a outras partes da planta, a semente e o pólen são mais fáceis e simples de aplicar a criopreservação (TOWILL, 2002).

Verifica-se que alguns fatores podem afetar a tolerância de armazenamento do pólen no nitrogênio líquido como: a espécie, a adaptação ecológica, o teor de umidade, o tipo e tamanho de pólen. Portanto, para que se obtenha um resultado preciso sobre os fatores que afetam a viabilidade do pólen é preciso mais estudos específicos (REN et. al, 2019).

Neste contexto, a presente proposta visa estudar a conservação de grãos de pólen de *P. atratum*, *P. malacophyllum* e *P. regnellii* via criopreservação, para possibilitar o cruzamento dessas espécies com florescimento assíncrono com alta produtividade, qualidade e outras características de interesse para o programa de melhoramento. A metodologia aqui apresentada, será inserida no Programa de Melhoramento de Espécies Forrageiras da Embrapa Pecuária Sudeste e as plantas identificadas nesse trabalho como híbridos serão analisadas posteriormente a curto, médio e longo prazo dentro do mesmo programa de melhoramento.

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento dessa tese estão subdivididos em quatro capítulos e abrangem estudos da conservação por criopreservação de grãos de pólen, testes de viabilidade, estudos da morfologia polínica e hibridações intra e interespecíficas em *Paspalum*.

O **Capítulo 1** trata de estudo de revisão sobre conservação de grãos de pólen por criopreservação de diferentes espécies vegetais, intitulado: **Pollen Cryopreservation: A review for plant breeding and genetic resources approaches** e já aceito na revista CryoLetters, em dezembro de 2019 para publicação na edição de Maio/Junho de 2020.

O **Capítulo 2** apresenta estudos sobre os métodos de criopreservação de grãos de pólen de *Paspalum*, bem como a caracterização dos padrões de morfoanatomia polínica e a avaliação da viabilidade polínica pelo uso de teste histoquímico com 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) e germinação *in vivo* por fluorescência.

No **Capítulo 3** são apresentados resultados da hibridação interespecífica entre *P. urvillei* x *P. malacophyllum*, *P. urvillei* x *P. regnellii* e *P. regnellii* x *P. malacophyllum* e cruzamentos intraespecíficos entre *P. regnellii*, usando grãos de pólen criopreservados.

No **Capítulo 4** são apresentados resultados dos cruzamentos interespecíficos entre (*P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x *P. atratum* e (*P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x *P. malacophyllum*, usando grãos de pólen criopreservados.

LITERATURAS CONSULTADAS

ABIEC. Perfil da pecuária no Brasil. Assoc. Bras. Ind. Exportação Carne, 2019. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/Exportacoes.aspx>. Acesso em: novembro, 2019.

ACUÑA, C. A. et al. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. **Euphytica**, v. 179, n. 2, p. 227-235, 2011.

AGUILERA, P. M. et al. Interspecific Tetraploid Hybrids between Two Forage Grass Species: Sexual *Paspalum plicatum* and apomitic *P. guenoarum*. **Crop Science**, v. 51, Jul/Ago. 2011.

AHLGREN, C. E.; AHLGREN, I.F. Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5 needle species. **Forestry Science**, Washington, v.24, n.1, p.100-102, 1978.

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**. v. 13, n. 4, p. 238-241, 1979.

ARGERICH, C. A.; GAVIOLA, J. C. **Production de semilla de tomate**. 1 ed., Argentina: INTA-EEA la Consulta, 1995. Fascículo 6. 81p.

BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. **In: Bajaj, Y. P. S. Cryopreservation of plant germplasm: I. Biotechnology in agriculture and Forestry**. Berlim: Springer, p. 03-28, 1995.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Avaliação de germoplasma de forrageiras do gênero *Paspalum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29, 1992. Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ, 1992a. p. 79.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Capacidade de produção de sementes em acessos do gênero *Paspalum*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.5, p.841-847, 1998.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização de germoplasma do gênero *Paspalum* na região central do Estado de São Paulo, Brasil. Características vegetativas. In: REUNIÃO SABANAS, 1, 1992, Brasília. **Anais...** Brasília: Red Internacional de Evaluacion de Pastos Tropicales – RIEPT, 1992b. p. 97-106.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização preliminar e seleção de germoplasma do gênero *Paspalum* para produção de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 23-32, 2000.

- BELONI, T. et al. Morphological and physiological responses and the recovery ability of *Paspalum* accessions to water deficit and waterlogging. **Grass and forage science**, v. 72, n. 4, p. 840-850, 2017.
- BENNETT, H. W.; BASHAW, E. C. Interspecific Hybridization with *Paspalum* spp. 1. **Crop Science**, v. 6 n. 1, p. 52-54, 1966.
- BENSON, E. E.; LYNCH, P. T.; STACEY, G. N. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **AgBiotech News and Information** (United Kingdom), 1998.
- BURSON, B. L. Cytogenetics of *Paspalum urvillei* x *P. intermedium* and *P. dilatatum* x *P. paniculatum* Hybrids 1. **Crop Science**, v. 19, n. 4, p.534-538, jul. 1979.
- BURSON, B. L. Pollen germination, pollen tube growth and fertilization following self and interspecific pollination of *Paspalum* species. **Euphytica**, v. 36, n. 2, p. 641-650, 1987.
- BURSON, B. L. Homology of chromosomes of the X genomes in common and Uruguayan dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Genome**, v. 34, n. 6, p.950-953, 1 dez. 1991a.
- BURSON, B. L. Genome Relationships between Tetraploid and Hexaploid Biotypes of Dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, v. 152, n. 2, p.219-223, jun. 1991b.
- BURSON, B. L. Cytology and reproductive behavior of hybrids between *Paspalum urvillei* and two hexaploid *P. dilatatum* biotypes. **Genome**, v. 35, n. 6, p.1002-1006, 1 dez. 1992.
- BURSON, B. L.; BENNETT, H. W. Genome relations between an intraspecific *Paspalum dilatatum* hybrid and two diploid *Paspalum* species. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 14 n.3, p. 609-613, 1972.
- BURTON, G. W. A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. **J. Agric. Res**, v. 60, n. 3, p. 193-197, 1940.
- BURTON, G. W. Interspecific hybrids in the genus *Paspalum*. **Journal Of Heredity**, v. 34, n. 1, p. 15-23, jan. 1943.
- CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. Crioconservação no Melhoramento Vegetal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 22 p. (Documentos, 115).
- CHASE, A. C. L. The North American species of *Paspalum*. **Contr. U.S. Natl. Herb.**, v. 28, p. 1-310, 1929.
- COSTA, T. B. da. Uso de aditivos em suplementos para bovinos recriados em pastagem. 2015, 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia), Faculdade de Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 2, 2005.

DIAS FILHO, M. B. **Degradação de pastagens**: processos, causas e estratégias de recuperação. 4. ed. Belém: Edição do Autor, 2011. 215p.

FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: outubro, 2019.

GONÇALVES, S. L.; FRANCHINI, J. C. **Integração lavoura-pecuária**. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

HESLOP-HARRISON, J. Pollen-stigma interaction and cross-incompatibility in the grasses. **Science**, v. 215, p. 1358-1364, 1982.

HODNETT, G. L., et al. Pollen–pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent *Sorghum* species. **Crop science**, v. 45, n. 4, p. 1403-1409, 2005.

HOJSGAARD, D. et al. Taxonomy and biogeography of apomixis in angiosperms and associated biodiversity characteristics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 33, n. 5, p. 414-427, 2014.

HOJSGAARD, D. et al. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). **Genetic resources and crop evolution**, v. 56, n. 4, p. 533-545, 2009.

HOJSGAARD, D. et al. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 203, n. 7, p. 535-547, 2008.

HONFI, A. I.; QUARIN, C. L.; VALLS, J. F. M. Estudos citológicos em gramíneas sudamericanas. **Darwiniana**, p. 87-94, 1990.

IBGE, 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria.html>. Acesso em: novembro, 2019.

IPEA-INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Ipeadata. 2019.

KARTHA, K. K. **Meristem culture and germplasm preservation**. Cryopreservation of plant cells and organs, p. 115-134, 1985.

LEITE, G. G.; FERNANDES, F. D. Qualidade da forragem do capim *Paspalum atratum* cv. Pojuca. Brasília - DF: Embrapa Cerrados, 1999.

MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a produção de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: Barbosa, R. A. (Ed.) Morte de pastos de braquiárias. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, p. 35-65, 2006.

MAZUR, Peter. Freezing injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 419-448, 1969.

MEDEIROS, A. C de S.; CAVALLARI, D. A. N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196°C). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 14, n. 1, 1992.

METZGER, J. D. **Hormones and reproductive development**. In: DAVIES, P. J. *Plant hormones*. Holanda: Kluwer Academic, 1995. p. 617-648.

MOREIRA, J. N.; ARAÚJO, G. G. L.; FRANÇA, C. A. Potencial de produção de leite em pastagens nativas e cultivadas no semi-árido. In: Simpósio Nordestino de Alimentação de Ruminantes, 10, 2006, Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2006, p.61-79.

MORRONE, O. et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.

OLIVEIRA, R.C. **O gênero *Paspalum* L., grupo *Plicatula* (Poaceae: Paniceae), no Brasil**. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

OLIVEIRA, J. C. P.; KÖPP, M. M.; ECHEVARRIA, E. R. Época de colheita de sementes de *Paspalum regnellii* Mez. In: Embrapa Pecuária Sul-Resumo em anais de congresso (ALICE). Informativo Abrates, v. 23, n. 2, set. 2015.

PEREIRA; R.C.; DAVIDE, L.C.; RAMALHO, M.A.P.; ANDRADE, H.B. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de eucalyptus. **Cerne**, Lavras, v.8, n.2, p.60-69, 2002.

PEZZOPANE, C. de G. et al. Evaluation and strategies of tolerance to water stress in *Paspalum* germplasm. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 5, n. 3, p. 153-162, 2017.

PIZARRO, E. A. Potencial forrajero del género *Paspalum*. **Pasturas Tropicales**, v. 22, n.1, p. 38-46, 2000.

REN, R. et al. Changes of pollen viability of ornamental plants after long-term preservation in a cryopreservation pollen bank. **Cryobiology**, v. 89, p. 14-20, 2019.

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

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de germoplasma vegetal**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 20, p. 60-65, 2001.

SANTOS, P.M. **Controle do desenvolvimento das hastes no capim-Tanzânia: um desafio**. 2002. 98 p. Tese (Doutorado em Agromonia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SNYDER, E. B.; CLAUSEN, K. E. Pollen handling. Seeds of woody plants in the United States. **USDA Agric. Handbook**, v. 450, 1974.

- SPERANZA, P. R. Evolutionary patterns in the Dilatata group (*Paspalum*, Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 1-2, p. 43-56, 2009.
- STRAPASSON, E.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 373-381, 2000.
- TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. eds. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlin: Springer, 2002. p. 04-21.
- VALLS, J. F. M.; Pozzobon, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. **Anais...** do Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de *Paspalum*, p. 15-21, 1987.
- VILELA, L. et al. **Benefícios da integração entre lavoura e pecuária**. Embrapa Cerrados, 2001.
- WINSTON, E. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, v. 41, p. 232-237, 1960.
- ZILLI, A. L. et al. Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus Anachyris: Taxonomic and evolutionary implications. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 10, p. 604-612, 2014.
- ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América Del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur Del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)**. Missouri: Botanical Garden Press. 2005. 297 p.

OBJETIVOS

Geral

Estudar a morfologia polínica e a viabilidade de grãos de pólen de *Paspalum atratum*, *P. malacophyllum* e *P. regnellii* criopreservados.

Específicos

- Analisar a porcentagem de grãos de pólen criopreservados corados por 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio (TTC).
- Avaliar a germinação *in vivo* de grãos de pólen criopreservados no estigma de cruzamentos interespecíficos de *Paspalum* via microscopia de fluorescência.
- Analisar a morfologia polínica de acessos de *Paspalum* por acetólise láctica e fotomicrografia em MEV.
- Avaliar a viabilidade de pólen criopreservado pelo seu uso na obtenção de híbridos intra e interespecíficos
- Analisar fenotipicamente os híbridos por meio de descritores morfológicos e confirmação molecular da hibridação.

Capítulo 1

Pollen Cryopreservation: A review for plant breeding and genetic resources approaches

Naiana Barbosa Dinato ^{1*}, Izulmé Rita Imaculada Santos ²; Bianca Baccili Zanotto Vigna ³,
Ailton Ferreira de Paula ¹; Alessandra Pereira Fávero ³

1 Federal University of São Carlos, Center for Biological and Health Sciences; 2 Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology; 3 Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Southeast Livestock

* Corresponding author email: naiana.dinato@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: Pollen conservation is an important tool for the maintenance of plant genetic resources as well as it can promote the improvement of the efficiency of breeding programs and germplasm conservation and exchange. **OBJECTIVE:** The ability of plant tissues to survive cryopreservation depends on their moisture content and freezing tolerance. This review aims to outstand the importance of pollen cryopreservation and how to use it in distinct species in order to encourage the use of this methodology in germplasm bank management and plant breeding programs. **CONCLUSION:** It is our understanding that pollen cryopreservation is a possibility sometimes neglected by potential users. This technique offers viable alternatives for overcoming relevant challenges of breeding programs such as flowering asynchrony between different parent genotypes and insufficiency of pollen often resulted from a variety of reasons. Additionally, pollen cryopreservation is recognized as a way of conserving genetic material. With this review we expect to bring to the attention of plant breeders and germplasm curators the opportunities offered by the use of cryopreservation techniques and the fact that they are simple enough to be used routinely in research programs.

Keywords: germplasm conservation, hybridization, liquid nitrogen, plant cryopreservation, pollen grain.

1.0 INTRODUCTION

Pollen conservation is an important tool in the management of plant genetic resources. The creation of pollen banks and new methodologies applied to the maintenance of their long-term viability are interesting to embryologists and geneticists (33). Pollen conservation improves the efficiency of breeding programs and enable the exchange of germplasm (26; 38). In addition, it is another tool for the preservation of genetic diversity (16). Furthermore, conserved pollen may also be used as support for species with poorly efficient or non-existent pollinating agents (74), allows crosses between genotypes that present reproductive asynchrony, such as non-adapted materials and related species (16), or even to allow hybridization seasons

twice a year. In 1885, William King, referring to the requirement to learn how to store pollen, stated: "nothing would tend more toward the rapid termination of an experiment than control over the pollen supply, so that we may use it when and where convenient for ourselves" (36).

The successfulness of pollen storage for genetic conservation purposes consists in the maintenance of the material for future uses, and for this, it is necessary to keep its genetic integrity, high vigor and germination percentage (83). Thus, it is essential to evaluate the viability before, during and after using the pollen at long-term conservation (26). This recommendation is also cited by Dafni (20), who states that the pollen viability evaluation is the first step to verify the germination chances on the flower stigma, a fundamental factor for fertilization (21). But pollen preservation of several species in literature does not present a detailed

description of the extraction, drying and conservation methodology, which makes difficult its replication.

Few studies describe complete methodologies for pollen cryopreservation, from collection to thawing. The objective of this review was to present the important studies about pollen cryopreservation in order to broaden the understanding of the subject and to encourage the use of this methodology in germplasm banks and plant breeding programs.

1.1 CRYOPRESERVATION: DEFINITION AND ITS IMPORTANCE ON POLLEN CONSERVATION

Cryopreservation consists on the biological material conservation in liquid nitrogen (LN) at -196°C , or in its vapor phase at -150°C (45), maintaining the characteristics of the material, after thawing. This technique has been shown to be efficient and practical for long-term conservation of plant genetic resources, especially for species that present recalcitrant or intermediate seeds (66). Several cryopreservation protocols have been developed also for plants with vegetative propagation, grasses, ornamental, tropical and temperate fruit trees, leguminous and oleaginous, medicinal and aromatic plants (66). This method is considered the most promising means of long-term preservation of various plant parts such as seeds, somatic and zygotic embryos, vegetative parts such as roots, bulbs, tubers, buds, meristematic apices, pollen, etc, since it is able to interrupt cellular metabolism and it maintains the genetic stability and the phenotypic characteristics of the samples. It allows the storage for an undetermined period, using small spaces and requiring low maintenance (28; 75).

Cryopreservation can be performed by traditional or modern methods. The traditional method consists in freezing the material slowly or ultrafast. For slow freezing, a programmable freezer is used, at a certain freezing rate down to a temperature range of -30 to -40°C , prior to exposure to the LN, allowing the removal of most of the water inside the cells. For ultra-fast freezing, it is necessary to dissect the biological

material, expose it to dehydrating agents to avoid the formation of ice crystals inside the cells and dip it directly into the liquid nitrogen (28; 66).

However, the modern method includes the use of substances that interact and accelerate the distribution of water inside and outside the cell, besides promoting cell dehydration, protecting the biomembranes of injuries suffered by the cell during its freezing and thawing. These substances, derived from different chemical groups, are called cryoprotectants and share similar functions of reducing freezing depression (34). Two types of cryoprotectants are known in relation to their ability to penetrate membranes, those which diffuse through cell membranes (such as Me_2SO -dimethylsulfide, glycerol, propylene glycol, etc.) are known as internal cryoprotectants, and those which are not able to penetrate cell membranes, such as saccharose and starch, for example, are known as external cryoprotectants (29; 49).

The most modern cryopreservation methods known are: vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. Techniques combinations have been used, such as encapsulation-vitrification described by Kaviani et al. (44) for *Lilium ledebourii*, which combines the advantages of a rapid vitrification procedure, as well as the chemical and physical protection of the encapsulation, and the ease of manipulation of small explants. But, to be usual, protocols must be adjusted for each species.

Pollen cryopreservation is a simple and effective method of prolonged pollen storage as it can be kept in the LN for many years without loss of its essential pollination, fertilization and fruiting capabilities when used in plant breeding, controlled pollination or for resources genetics of plants conservation (2; 78).

Pollen storage is essential, especially for species that have a long vegetative period or that bloom a few times a year, or even for some plants that are propagated vegetatively, because it allows: 1) crossing between plants flowering at different times; 2) hybridization between plants that grow in different and distant locations; 3) lower transmission of diseases whose vectors are the pollinators; and 4) conservation of germplasm for long periods (7), which is an useful way to the gene pool conservation and to overcome the temporal and spatial isolation of the parent species in breeding programs (9). Also, it is not necessary

to wait for the growth and flowering of the plant to obtain the male parent.

Pollen conservation should, for these reasons, be integrated with germplasm banks. To avoid the male parent genetic material loss, pollen conservation should be an additional alternative for the conservation of germplasm and not a substitute for the storage of seeds or clones (76).

Pollen storage is also a valuable tool in a plant breeding program as it makes recurrent and breeding lines available as needed regardless of the response to flowering and planting date. Rapid exchange and use of germplasm between scientists at national and international level is facilitated by pollen storage. This technique enables the maintenance of germplasm of specific or unique genotypes for future crosses. The overall advantage of pollen storage is that it makes germplasm immediately available to cross female parents without having to continually plant recurring parents, hoping they will flower at the same time as females (37).

The majority of the published pollen conservation studies is related to fruit, floral or ornamental plants and many of them describe the freezer conditions conservation and just few of them report pollen cryopreservation (-196°C) (Table 1).

1.2 HOW CAN WE DO THE POLLEN CRYOPRESERVATION?

Storage can be classified into two types: short- and long-term. Generally, short-term storage is intended for genetic and breeding studies, and long-term storage for genetic resources conservation (69). To maintain the pollen viability as high as the fresh pollen during the long-term storage, it is necessary to follow protocols of collection, drying, storage and viability pollen tests (70). Sousa (69) states that genetic alterations are common in long-term storage and can lead, after many years, to genetically different populations from the original ones.

Among the cryopreservation techniques cited, the most used method for the conservation of pollen grains is the traditional methodology, in which dehydrating agents are used to desiccate the pollen grains before immersion in LN. The most commonly used dehydrating agents are silica gel, saturated salt

solutions, flow chamber and oven. Some authors use modern methodologies, such as the vitrification technique using the cryogenic solution PVS (plant vitrification solution) (Table 1).

1.2.1 Pollen Dehydration

Pollen storage success depends on factors such as pollen and environment humidity and storage temperature. Low temperatures and humidity are usually linked to pollen metabolism decrease, which allows its higher longevity (12; 70).

There are some methods for reducing temperature; among them the most sophisticated is the use of liquefied gases and the easiest is the use of freezers and refrigerators. The knowledge of which species need to be conserved and what are the storage purposes are crucial information to decide which method will be used (62). Besides the ideal temperature, the pollen conservation success depends on other factors such as the pollen moisture and environmental storage humidity, and is independent of the storage period (23; 51). When the pollen moisture content is high, its viability decreases with the occurrence of the ice crystals that break the cell membranes (4).

According to Santos (66), the formation of ice crystals in cells is one of the major problems encountered in cryopreservation. As the temperature decreases and approaches 0°C, the cell and its external environment reach a supercooling stage and ice crystals are formed in the extracellular environment, thus, the cell wall and the plasma membrane act as barriers that prevent the formation of ice crystals in the intracellular spaces, triggering the freezing of the cytoplasm, so that the contents of the supercooled cell remain thawed.

On the other hand, care must be taken with the pollen dehydration. When the environment is extremely dry, the pollen viability is also low due to its constitution water decrease (30). Another issue is that the drying temperature cannot exceed 28° C (6). According to Sprague and Johnson (72), a pollen moisture content from 8 to 10% avoid the formation of ice crystals in the freezing process, regardless of the storage method. A successful pollen long-term conservation requires a moisture content between 7 and 20% in a storage conditions

ranging from - 80 to - 196°C (16). Copes (17) and Towill (77) described analyses with desiccation-tolerant pollen successfully stored at 5% and 7% of pollen humidity to *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) and *Solanum* sp., respectively. Although there is an indication that to achieve success in cryopreservation, the water content of pollen grains should be below 20%, there are still no studies setting the minimum moisture for the pollen to remain viable (16).

Nevertheless, sometimes there are disagreements of which is the most favorable humidity level for pollen storage even within the same crop (33). Barnabas et al. (8) stated the corn pollen fertilization ability after liquid nitrogen storage was higher in samples with 13% water content, while Kerhoas et al. (47) ensured that corn pollen viability drops dramatically below 15% moisture. It is generally accepted that the pollen moisture reduction allows the long-term storage success, but the pollen viability appears to be also correlated to the ability to dehydration process tolerance (35).

Roberts (64) defined pollen that remain viable after drying as desiccation-tolerant, while pollen that lose viability during drying were called as desiccation-sensitive. Desiccation-tolerant pollen can be dehydrated at low water contents, ranging from 5 to 10%, using the same methods applied to the seeds, and then placed directly into LN and thawed at room temperature with success. Meanwhile, the optimal moisture levels to maintain pollen viability at low temperatures have not been determined yet for several species. Several species have pollen grains tolerant to dehydration, the behavior of pollen grains resemble that of orthodox seeds, since usually the plants with orthodox seeds have sensitive pollen and vice versa (75).

The pollen dissection is very similar to the seeds, but the moisture content in the pollen adjusts faster (38; 78). In spite of this, species with seeds susceptible to dissection can have pollen tolerant to dehydration or otherwise, seeds tolerant to dehydration have sensitive pollen. Tolerant pollens may be desiccated at low moisture levels (about 5-10% fresh weight basis), usually using solutions of saturated salt or naturally desiccated with air at room temperature (75). Desiccation-sensitive pollen cannot be treated as described above once it would have the viability decreased. Specific

protocols should be developed for this type of pollen (16).

The tolerance to dehydration is related to pollen morphology. Binucleate pollen is classified as tolerant and trinucleate pollen often as sensitive (42). Many authors describe that binucleate pollen has greater viability when compared to trinucleate pollen (31; 51; 73). This occurs due to the fact that the second meiotic division in trinucleate pollen spends enough reserves to ensure its good longevity and germination (69). On the other hand, binucleate pollen present a greater amount of surface compounds on its wall and there is no second meiotic division in this type of pollen, preventing reserve losses (48). Therefore, a suitable drying methodology to trinucleate pollen is necessary, since the nuclear components can be damaged, reducing its viability. In general, Poaceae species present trinucleate pollen, which makes difficult the male gametes storage (5).

Williams and Brown (86) in their recent study with tricellular and bicellular pollen found that the water content and the number of pollen cells are positively correlated. Thirty species were studied at random and it was verified that tricellular pollen presented 30% higher hydration index than the bicellular pollen in a same range of pollen size. They concluded that bicellular pollen gave evolution to tricellular pollen, and they emphasize that the less variable the duration of dispersion, the less the pollen depends on dehydration as a mechanism to guarantee longevity in the dispersion.

Bhat et al. (9) stated that the *Pyrus* spp. pollen viability decreases according to the storage condition. The maximum loss in viability was observed in storage at - 196°C (16.16% of viability), followed by - 20°C (22.16%) and 4°C (46.50%), respectively. The lowest viability (0%) was observed at room temperature (in anhydrous calcium chloride) after 12-week storage.

One widely used method to verify the pollen moisture content is to expose the pollen to saline solutions with distinct relative humidities. Some solutions' humidities are already well defined and can be used for this purpose, such as sulfuric acid solutions in variable concentrations (50) and several saturated salt solutions with well-known relative humidity (87; 88). These solutions keep constant the relative humidity in the atmosphere

because any non-volatile solution in water will have a defined water vapor pressure at a given temperature when the vapor phase is in equilibrium with the liquid. Vapor pressure constants can be explained by the Gibbs' phases rule discussed in physics-chemistry texts. Saturated solutions with an excess of solids (or the "supersaturated solution", according to some authors) keep the vapor pressure constant, even under the variable humidity condition, because the water gain causes salt precipitation, while there is not much liquid on the solid. The diffusion that occurs inside the solution is very slow, and the humidity conditions will remain unchanged. Thus, considerable amount of water can be gained or lost by the organism without changing the vapor pressure (87).

In seeds, the water sorption study is carried out using solid substances, such as isotherms. As the hygroscopy of the water vapor pressure in the seed is lower than the air pressure, water absorption (adsorption) occurs and, in the opposite case, the seed loses water to the air (desorption). When the water pressure of the seed surface equals the vapor pressure of the ambient air, equilibrium moisture is reached (59).

In pollen grains, the water content can be adjusted using silica gel, vacuum desiccation, oven, liquid nitrogen vapor or known saturated saline solutions, including: magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); sodium chloride (NaCl); lithium chloride hydrate ($\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$); sodium hydroxide (NaOH); magnesium nitrate ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), ammonium nitrate (NH_4NO_3); potassium chloride (KCl), copper sulphate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), phosphorus pentoxide (P_2O_5), zinc chloride (ZnCl_2), calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), sodium nitrate (NaNO_3) (4; 16; 41). Certain salts are unsuitable for this purpose because of their instability or irregular behavior. Winston and Bates (87) list several halides (ferric chloride (FeCl_3), aluminum bromide (AlBr_3), aluminum chloride (AlCl_3), and thorium (IV) chloride (ThCl_4)), which are prone to hydrolysis, and some others halides that are sensitive to light. The halide FeCl_3 , with a relative humidity of 5.0% at 25°C, is the only example that can be used with a great advantage, despite the difference among preparations. Buxton and Mellanby (13) pointed that NH_4Cl releases traces of NH_3 and that LiCl releases Cl_2 above 37°C. The choice of salts should be governed by the cost, availability and reproducibility of the results.

The pollen moisture rate depends on the salt, the gradient between the salt moisture content and the pollen moisture content and the type of pollen. According to Connor and Towill (16), placing the desiccation-tolerant pollen on a saturated salt solution with a low relative humidity for approximately two hours is a reasonable method for reducing moisture for storage purposes. Their study showed that pollen approached equilibrium within, approximately, 1-2 hours after being placed on all the saturated saline solutions for dehydration tested by the authors, but the moisture content generally did not stabilize for 6-24 h.

Several equilibrium relative humidity values have been published for many saline solutions at different temperatures. The results of these papers have been gathered and compared with previous results and are represented in explanatory charts and tables to enable researchers to choose which saline solutions are the best for their specific needs. These tables and graphs can be found in (16; 87 and 88). Some data are also presented on the equilibrium relative humidity on unsaturated salt solutions. The use of saturated salt solutions to control relative humidity is a simple and economical method. Most reagents are readily available in reasonable purity, are safe to handle and are non-volatile, thus avoiding contamination of the specimen (88).

According to Eira et al. (27), Vertucci and Roos (80) and Walters et al. (82), studies with saturated salt solutions can be handled to determine the relationship between relative air humidity, temperature and the equilibrium moisture content of the seeds, and the establishment of sorption isotherms (relationship between relative humidity and seed moisture), under a given temperature. The same can be done to set the critical seeds water content with storage purposes at different temperatures (81; 82).

To investigate the influence of relative air humidity and temperature on pollen longevity, research has already been conducted using saturated salt solutions (12). It is further known that the relative humidity of a saturated saline solution varies depending on the temperature, but it remains constant within an enclosed space for most salts. However, there is a lack of information on the pollen moisture content and kinetics of moisture gain or loss at a certain relative humidity (16). There are also species whose pollen grains lose viability with drastic

drying, such as *Simmondsia chinensis* and *Zea mays*. In the latter species, the trinuclear stage of pollen difficult the process.

1.2.2 Freezing of pollen grains

Many authors have achieved successful freezing of pollen of several species. Table 1 presents a review of studies that successfully preserved pollen at liquid nitrogen or freezer. After adequate pollen grains dehydration, it just needs to be put in the storage temperature you want, without any specific freezing protocol.

1.2.3 Thawing

Thawing must be taken into account for a successful pollen storage in LN once this is directly related to pollen metabolism and the reactivation of post-conservation metabolic processes (18). There are few papers describing the thawing methodology. Some studies listed in Table 1 do not clearly explain the process of thawing pollen prior to germination analysis.

Pollen thawing can be done slowly or quickly. In the quick technique, the tubes with pollen grains are put into water bath at 37°C for 5 minutes (68). The slow technique can be done by thawing the pollen grains for 30 minutes in the freezer (-20°C), then 30 minutes in the refrigerator (4°C) and the environment (25°C) for the same period (24) or leaving the cryotubes in running water at 25°C for 15 minutes.

Vendrame et al. (79) stored orchid pollen in LN and the thawing was performed by removing the pollen from the LN and leaving them at room temperature for three minutes. Bingfang et al. (10), after the *Brassica* sp. pollen freezing, thawed it using a 40°C water bath heating technique; Chaudhury et al. (14) thawed mango and lychee pollen into a ± 38 °C water bath for 30 seconds; Marchant et al. (54) kept the bottles with roses pollen into sterile water at about 45°C for 2 minutes; Wang et al. (84) kept the lychee pollen samples at room temperature for 5 minutes for thawing and Xu et al. (89) thawed ornamental plant pollen samples by rinsing in running water for 5 minutes. Therefore, the majority of the protocols used fast thawing. According Kulus and Zalewska (49), slow thawing is more time consuming and generally less efficient.

1.3 POLLEN VIABILITY AFTER CRYOPRESERVATION

In some studies, the viability was higher than in others (Table 1). Obtaining pollen with viable germination in a laboratory test does not mean that pollen is able to fertilize the egg and produce seeds, so the viability period depends on the species and can be from a few days to years (30).

Thus, some authors verified the pollen viability after the cryopreservation using in vivo germination techniques, such to *Lycopersion esculentum* (65), *Dendrobium* (79), peppers (56), *Imperata cylindrical* (63), *Delphinium* spp. (40), *Cocos nucifera* (46), *Mangifera indica* (14) and *Ananas* spp. (67) (Table 1).

The low viability of pollen after cryopreservation observed in some studies may be related to an oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS). In a recent study of cryopreservation of *Paeonia lactiflora* and *Magnolia denudata* pollen, Jia et al. (43) have observed that exogenous catalase (CAT) and malate dehydrogenase (MDH) can reduce oxidative damage through stimulation of antioxidant enzymatic activity and play a protective role for pollen during cryopreservation.

Table 1 - Pollen long-term conservation in different species.

Species	Treatments	Storage times	Germination (%)	References
<i>Aechmea bicolor</i>	Dehydration using desiccator with silica gel for 3h -freezing at – 196°C	365 days	> 92.00	Souza et al. (68)
<i>Actinidia</i> spp.	Dehydration at room temperature (30°C) for 24h – freezing at – 18°C and – 80°C *	– 18°C for up to 96 weeks – 80° C after 160 weeks	40.00-60.00 60.00	Bomben et al. (11)
<i>Ananas</i> spp.	Dehydration using desiccator with silica gel for 6h (water content = 28%) – freezing at – 196 °C	24h; 60 e 120 days	Approx. 62.67 (<i>in vitro</i>) and 70.83 (<i>in vivo</i>)	da Silva et al. (67)
<i>Brassica</i> spp.	PVS 10-20% sucrose, 40% Me ₂ SO, 0 ° C for 20 min mature pollen - -freezing at – 196°C * PVS 10-15% sucrose, 35-40% Me ₂ SO, 0 ° C for 15 minutes - almost ripe pollen - freezing at – 196°C *	1 day	65.00 – 80.00 50.00 – 63.50	Bingfang et al. (10)
<i>Bromelia</i> spp.	Dehydration – freezing (on silica gel inside the desiccator) *	6 months	2.00-82.00	Parton et al. (60)
<i>Capsicum</i> spp.	Not informed	47 days	7.00 13.00 – 98.00 (<i>in vivo</i>)	Mathad et al. (56)
<i>Carya illinoensis</i>	No information about dehydration – freezing at – 196°C *	13 years	60.00	Sparks & Yates (71)
<i>Carya illinoensis</i> , <i>Corylus avelana</i> , <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Picea pungens</i> , <i>Pinus ponderosa</i> , <i>Typha maxima</i> , <i>Zea mays</i>	Dehydration with saturated solution of MgCl ₂ and Mg(NO ₃) – freezing at – 196°C (water content = 7-10%)	Not informed	27.00-84.00	Connor & Towill (16)
<i>Carica papaya</i>	Dehydration with desiccator for 24h – freezing *	6 months	Approx. 40.00	Cohen et al. (15)
<i>Citrus cavaleriei</i> <i>Citrus máxima</i>	Dehydration air dried to 16 – 24 h at 25°C (water content = 5-14%) – freezing at – 196°C	2 years	93.00 and 80.00 55.53 and 65.00	Zhang et al (91)
<i>Clianthus formosus</i>	Dehydration for 3 hours – freezing *	Up to 4 hours	5.00-62.00	Hughes et al. (42)
<i>Cocos nucifera</i>	Desiccated in oven at 40°C for 24h, (water content = 7.5%) – freezing at – 196°C	3 years 4 years	26.00- 32.00 39.70 – 44.30 (<i>in vivo</i>)	Karun et al. (46)
<i>Colocasia esculenta</i>	No dehydration – freezing at – 196 °C (water content = 19.8 – 21.3%)	72 hours 2 months	13.68 – 16 .00 12.69 – 15.45	Mukherjee et al. (58)
<i>Delphinium</i> spp.	3h air drying at 20 °C and drying on silica gel – freezing at – 196 °C *	180 days	22.40 – 61.50 56.70 – 95.70 (<i>in vivo</i>)	Honda et al. (40)

<i>Dendrobium</i> spp.	Dehydration (on silica gel inside the desiccator for 24 hours) – freezing at – 196 °C PVS2 0°C or 27°C between 1 and 4 hours before NL Initial humidity: 8% Final moisture: 5%	48 hours	80 - majority 60 - PVS2 0 ° C - 3h 70 - PVS2 3h without pre-cooling (27°C) 90-95 seed formation method TTC and FDA	Vendrame et al. (79)
<i>Dioscorea</i> spp.	No dehydration – freezing at – 20 °C and – 80°C *	100 days (-20°C and -80°C) 365 days (-80°C) 730 days (-80°C)	74.00 and 78.00 76.00 40.00	Daniel et al. (22)
<i>Elaeis guineensis</i>	Dehydration at stove to 37°C for 6 hours -freezing *	- 15°C for 12 months	Approx. 100% seed formation	da Silva and Engelmann (19)
<i>Eucalyptus</i> spp.	Dehydration using desiccator with silica gel for 24h – freezing at – 18°C*	3 months	> 40	Pereira et al. (61)
<i>Hylocereus</i> spp.	Dehydration freezing (dehydration on silica gel in vacuum desiccator; water content = 5-10)	3 or 9 months	>90	Metz et al. (57)
<i>Imperata cylindrica</i>	Not informed	-20°C and 65% HR (for 1 month)	25.53 (<i>in vivo</i>)	Rather et al. (63)
<i>Juglans regia</i>	Dehydration at room temperature for 2 hours -freezing (water content = 5-7.5%)	1 month	18.40-70.40	Luza & Polito (52)
<i>Juglans regia</i>	Dehydration – freezing (water content = 4.6-12.1%)	12 months	3.0-84.80	Luza & Polito (53)
<i>Litchi chinensis</i>	Electric dryer at 35°C for 6 hours – freezing *	-86C for 2 years	> 70.00	Wang et al. (84)
<i>Luisia macrantha</i>	Dehydration using desiccator with silica gel for 120 min- freezing at – 196°C PVS2 – 10min - freezing at – 196°C Dehydration at 27°C inside a laminar flow cabinet to 120 min - freezing at – 196°C *	24 hours 668 days 24 hours	51.00 – 52.00 51.00 54.00	Ajeeshkumar and Decruse (1)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Dehydration using desiccator with CaSO ₄ for 15 min- freezing at – 80°C *	- 80 °C to 5 weeks	98 – 100 seed formation	Sacks and Clair (65)
<i>Mangifera indica</i> <i>Litchia chinensis</i>	Dehydration using desiccator with silica gel for 1 hour- freezing at – 196°C *	4 years	18 – fruits 57–87 FCR method 47-72 FCR method 26 -32 (<i>in vitro</i>)	Chaudhury et al. (14)
<i>Medicago sativa</i>	Dehydration on vacuum drying and freezing at – 21°C	11 years	36.00-57.00	Hanson & Campebell (39)
<i>Olea europea</i>	Dehydration using desiccator with silica gel at 25°C for 24 hours- freezing at – 196°C *	1 year	22.30 – 32.70	Alba et al. (3)
Ornamental plants	Drying for 24 hours at 22 ° C and 5% RH- freezing at – 196°C *	1 year	0 – 70.90	Xu et al. (89)
<i>Paspalum notatum</i>	Dehydration using desiccator with silica gel for 120 min. and Lithium Chloride for 30 min. – freezing at – 196°C.	180 days	68.70 and 66.20	Dinato et al. (24)

<i>Pennisetum glaucum</i>	Dehydration in an oven at 38°C- Freezing at – 18°C Freezing at – 73°C	461 days 1089 days	100.00 100.00	Hanna et al. (36)
<i>Pennisetum glaucum</i>	Dehydration in an oven at 38°C Freezing at – 73°C Freezing at – 18°C	8 years 7 years	100.00 100.00	Hanna (37)
<i>Phoenix dactylifera</i>	Dehydration at room temperature for 2 days – freezing at – 20°C and – 80°C	12 months	– 20°C = 71.22 – 80°C = 32.24	Maryam et al. (55)
<i>Prunus mume</i>	Not informed	4 years	5.90 – 68.70	Zhang et al. (90)
<i>Pseudotsuga menziessi</i>	Dehydration at room temperature – freezing at – 196°C (water content = 4 to 7%)	3 years	80.90	Copes (17)
<i>Pyrus</i> spp.	Not informed	- 196°C for 12 weeks	55.67	Bhat et al. (9)
<i>Rosa</i> spp.	Dehydration using desiccator with silica gel 24h and 12h photoperiod– freezing at – 196°C *	48 hours	13.10 – 26.60	Marchant et al. (54)
<i>Saccharum</i> spp.	Dehydration – freezing (on silica gel inside the desiccator to 4°C for 1 hour) *	-18°C for up 50 days	22.47; 24.52 and 44.72	Duarte Filho (25)
<i>Solanum</i> spp.	No method for desiccation – freezing at – 20°C and at – 196°C	9 months	at – 20°C = 42- 29	Weatherhead et al. (85)
<i>Vitis vinifera</i> L.	Dehydration using desiccator with silica gel - freezing at – 196°C	64 weeks	75.60	Ganeshan (32)
<i>Zea mays</i>	Dehydration at room temperature for 1 hour –freezing at – 196°C (water content = 30%)	1 year	74.00	Georgieva & Kureleva (33)
<i>Zea mays</i>	Flotation dehydration – freezing at – 196°C (water content = 13%)	7 days	78.70	Barnabas et al. (8)

* water content not informed

1.4 FINAL CONSIDERATIONS

Cryopreservation is an efficient technique for pollen conservation, since it can be stored for an indeterminate time when the adequate methodology is used. However, each species behaves differently in relation to these processes, so it is of paramount importance to conduct more research and to further develop this technique for each species of interest (70).

It is common to hear reports from breeders about the non-synchronization of flowering in species to be crossed, or that when the female plant is fit, the male plant does not release enough pollen. Would not it be the case of storing this pollen for crosses? The literature shows that this is possible and feasible.

Funding: This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Association for Promotion of Breeding Research in Tropical Forages (Unipasto), and the Empresa Brasileira

de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Project SEG # 01.15.02.002.05.12)

1.5 REFERENCES

1. Ajeeshkumar, S. and Decruse, W. S. Fertilizing ability of cryopreserved pollinia of *Luisia macrantha*, an endemic orchid of Western Ghats. *CryoLetters*, 34(1) (2013), pp. 20-29.
2. Akihama, T., Omura, M., Kozaki, I. . Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. *Trop. Agric. Res.*, 13(4) (1979) pp. 238-241.
3. Alba, V., et al. G. B. Effects of cryopreservation on germinability of olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 58(7) (2011), p. 977-982.
4. Almeida, C., et al. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*) [Conservation and in vitro germination of corn pollen (*Zea mays* subsp. *mays*)] , *BrazJBot*, 34 (4) (2011) pp. 493–497.

5. Alvim, P. de O., et al. Meios de cultura para germinação de grãos de pólen de milho. [Culture media for germination of corn pollen grains]. *Revista Agrarian*, 5(17) (2012), pp. 206-211.
6. Argerich, C. A., Gaviola, J. C. Production de semilla de tomate, primeira edição, Argentina: INTA-EEA la Consulta, Fascículo 6, 1995.
7. Bajaj, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Cryopreservation of plant germplasm: I. Biotechnology in agriculture and Forestry*, Springer, Berlim, 1995, pp. 03-28.
8. Barnabas, B., et al. Effect of pollen storage by drying and deep-freezing on the expression of different agronomic traits in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 39(3) (1988), pp. 221-225.
9. Bhat, Z. A., et al. Influence of Storage Temperature on Viability and In Vitro Germination Capacity of Pear (*Pyrus* spp.) Pollen. *J. Agric. Sci.*, 4(11) (2012).
10. Bingfang, X., Hongmei, H., Congyi, Z. and Mengxiang, S. Cryopreservation of pollen by vitrification in *Brassica*. *Wuhan University J. Nat. Sci. Res.*, 2(1) (1997), pp. 120-123
11. Bomben, C., et al. R. Long term storage of kiwifruit pollen. *Acta Horti*, 498 (1999), pp. 105-110.
12. Buitink, J., et al. Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents: Interpretation on the basis of water activity and glass concepts, *Physiologia Plantarum*, 103(2) (1998), pp. 145-153.
13. Buxton, P. A. and Mellanby, K. The Measurement and Control of Humidity, *Bulletin of Entomological Research*, 25(2) (1934), pp. 171-175.
14. Chaudhury, R., Malik, S. K. and Rajan, S. An improved pollen collection and cryopreservation method for highly recalcitrant tropical fruit species of mango (*Mangifera indica* L.) and litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *CryoLetters*, 31(3), (2010) , pp. 268-278.
15. Cohen, E., Lavi, U. and Spiegel-Roy, P. Papaya pollen viability and storage, *Sci. Horticult.*, 40(4) (1989), pp. 317-324.
16. Connor, K. F. and Towill, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. *Euphytica*, 68(1-2) (1993), pp. 77-84.
17. Copes, D. L. Fertility of Douglas-fir pollen after one year of storage in liquid nitrogen. *Forest Science*, 31(3) (1985), pp. 569-574.
18. Cuchiara, C. C., et al. Efeito do tempo de descongelamento de grãos de pólen de mamoneira armazenados em diferentes temperaturas [Effect of thawing time of castor pollen grains stored at different temperatures], *Biotemas*, 25(4) (2012), pp. 22-25.
19. da Silva, J. A. T. and Engelmann, F. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) *Cryobiology*, 77 (2017), pp. 82-88.
20. Dafni, A. *Pollination ecology: a practical approach*. New York: IRL Press Ltd, 1992.
21. Damasceno Junior, P. C., et al. Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.) [Conservation of papaya (*Carica papaya* , L.) pollen], *Revista Ceres*, 5(55) (2008), pp. 433-438.
22. Daniel, I. O., et al. Wet-cold preservation of West African yam (*Dioscorea* spp.) pollen. *J. Agric. Sci.*, 138(1) (2002), pp. 57-62.
23. Dean, C. E. Effects of temperature and humidity on the longevity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pollen in storage. *Crop Sci.*, 5 (1965), pp. 148-150.
24. Dinato, N. B., et al. Storage of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüge) pollen at different temperatures. *Crop Sci.*, 58 (2018), pp.1-8.
25. Duarte Filho, L. S. C., et al. Pollen viability of sugarcane after storage. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* 5 (2017) pp. 88-94.
26. Einhardt, P. M., Correa, E. R., Raseira, M. C. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de Pessegueiro. [Comparison between methods to test the viability of Pessegueiro pollen]. *Rev. Bras. Frutic.*, 28(1) (2006), pp. 5-7.
27. Eira, M. T. S., et al. Tolerance of *Coffea* spp. to desiccation at low temperature. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 11(2) (1999), pp. 97-105.
28. Engelmann, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects, *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, (40)(5) (2004), pp. 427-433.
29. Fornari, D. C., et al. Effect of cryoprotectants on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. *Zygote*, 22(01) (2011), pp.58-63.

30. França, V. L., et al. Viability of eggplant pollen. *Crop breed appl. biotechnol.* 9(4) (2009), pp. 320-327.
31. Frankel, R., Galun, E. Pollination mechanism reproduction and plant breeding. New York: Springer Verlag, 1977.
32. Ganeshan, S. Cryogenic preservation of grape (*Vitis vinifera* L.) pollen. *Vitis*, 24 (1985), pp. 169-173.
33. Georgieva, I. D. and Kruleva, M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. *Euphytica*, 72(1-2) (1994), pp. 87-94.
34. Gonzalez, R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBiUSP (2004), 94 p.
35. Guilluy, C. M., et al. New data and concepts in angiosperm fertilization. In: B. Dale (Eds.) Mechanism of Fertilization: Plants to Humans. Springer, Berlin: Heidelberg, 1990, pp. 253-270.
36. Hanna, W., Burton, G. W. and Monson, W. G. Long-term storage of pearl millet pollen. *Journal of Heredity*, 77(5) (1986), pp. 361-362.
37. Hanna, W. Long-term storage of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. Pollen. *Theor appl genet* 79(5) (1990), pp. 605-608.
38. Hanna, W. W. and Towill, L. E. Long-Term Pollen Storage. In: J. Janick (Eds.), *Plant Breeding Reviews*, John Wiley & Sons Inc, New York, 2010, pp. 179-207.
39. Hanson, C. H. and Campbell, T. A. Vacuum-dried pollen of alfafa (*Medicago Sativa* L.) viable after eleven years. *Crop Sci.*, 12(6) (1972), p. 874.
40. Honda, K., Watanabe, H. and Tsutsui, K. Cryopreservation of Delphinium pollen at –30°C. *Euphytica*, 126(3) (2002), pp. 315-320.
41. Hong, T. D., et al. A Model of the Effect of Temperature and Moisture on Pollen Longevity in Air-dry Storage Environments. *Annals of Botany*, 83(2) (1999), pp. 167-173
42. Hughes, H. G., Lee, C. W., Towill, L. E. Low-temperature preservation of *Clanthus formosus* pollen. *HortScience*, 26(11) (1991), pp. 1411-1412.
43. Jia, M. X., et al. CAT and MDH improve the germination and alleviate the oxidative stress of cryopreserved *Paeonia* and *Magnolia* pollen. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(2) (2018), pp. 37.
44. Kaviani, B., et al. Cryopreservation of *Lilium ledebourii* (Baker) Bross. by encapsulation-vitrification and *in vivo* media for planting of germplasm. *Am Eurasian J Agric Environ Sci.*, 8(5) (2010), pp. 556-560.
45. Kartha, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: K. K. Kartha (Eds.), *Cryopreservation of plant cells and organs*, CRC Press Inc, Florida 1985, pp. 115-134.
46. Karun, A., et al. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation. *CryoLetters*, 35(5) (2014), pp. 407-417.
47. Kerhoas, C., Gay, G., Dumas, C. A multidisciplinary approach to the study of the plasma membrane of *Zea mays* pollen during controlled dehydration. *Planta*, 171(1) (1987), pp. 1-10.
48. Kirby, E. G., Smith, J. E. Elutable substances of pollen grain walls. In: H. F. Linskens (Eds.), *Fertilization in higher plants: Proceedings of the International Symposium on Fertilization in Higher Plants*, Amsterdam: North-Holland, 1974, p.127-130.
49. Kulus, D. and Zalewska, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. *Sci. Hortic.*, 168, (2014), pp. 88-107.
50. Lanner, R. M., Forest, P. S. Controlling the moisture content of conifer pollen. *Silvae Genetica*, 11(4) (1962), pp.114-117.
51. Linskens, H. F. Pollen physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 15(1) (1964), pp. 225-226.
52. Luza, J. G. and Polito, V. S. Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen. *Euphytica*, 37(2) (1988), pp. 141-148.
53. Luza, J. G. and Polito, V. S. *In vitro* germination and storage of English walnut pollen. *Sci. Hortic.*, 27(3-4) (1985), pp. 303-316.
54. Marchant, R., et al. Cryopreservation of pollen from two rose cultivars. *Euphytica*, 66(3) (1992), pp.235-241.
55. Maryam, M., et al. Evaluation of pollen viability in date palm cultivars under different storage temperatures. *Pak J Bot.*, 47(1) (2015), pp. 377-381.
56. Mathad, R. C., Vasudevan, S. N., Patil, S. B. Cryo-preservation of Pollen for Hybrid Seed Production in Hot Pepper. In: A. Sabu, A.

- Augustine (Eds.), *Prospects in Bioscience: Addressing the Issues*, Springer: India, 2012, pp.273-276.
57. Metz, C., Nerd, A., Mizrahi, Y. Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. *HortScience*, 35(2) (2000), pp. 199-201.
 58. Mukherjee, A., et al. Development of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) hybrids overcoming its asynchrony in flowering using cryostored pollen. *Euphytica* 212 (1) (2016), pp. 29-36.
 59. Nellist, M. E., Hughes, M. Physical and biological processes in the drying of seed. *J. Seed Sci*, 1(3) (1973), pp. 613-643.
 60. Parton, E., et al. Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125(2) (2002), pp. 155–161.
 61. Pereira, R. C., et al. Alternativas para aumentar a eficiência dos cruzamentos em programas de melhoramento de *Eucalyptus*. [Alternatives to increase the efficiency of crosses in *Eucalyptus* breeding programs]. *Cerne*, 8(2) (2002), pp. 60-69.
 62. Pio, L. A. S., et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento [Viability of pollen from sweet oranges in different storage conditions], *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1) (2007), pp. 147–153.
 63. Rather, S. A., Chaudhary, H. K. and Kaila, V. Pollen preservation potential of *Imperata cylindrica*—an efficient source for doubled haploid production in wheat. *Cereal Res. Commun*, 45(3) (2017), pp. 525-534.
 64. Roberts, E. H. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1 (1973), pp. 499-514.
 65. Sack, E. J. and Clai, D. A. S. Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity. *HortScience* 31(3) (1996), pp. 447-448.
 66. Santos, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conversação de germoplasma vegetal. *Rev. Bras. Fisiol. Veg*, 12 (2000), pp. 70-84.
 67. da Silva, R. L., et al. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions, *Sci. Hort*, 219 (2017) pp. 326–334.
 68. de Souza, et al. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest, *Euphytica*, 204 (1) (2015), pp. 13–28.
 69. Sousa, V. A. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. [Cryopreservation of *Eucalyptus* spp. pollen]. *Boletim de Pesquisa Florestal*, 21 (1990), pp. 15 - 19.
 70. Sousa, V. A., Schemberg, E. A., Aguiar, A. V. Germinação *in vitro* do pólen de jerivá (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham) [In vitro germination of sycamine pollen (*Syagrus romanzoffiana* (S.) Cham)]. *Scientia Forestalis*, 38(86) (2010), pp. 147-151.
 71. Sparks, D., Yates, I. E. Pecan pollen stored over a decade retains viability. *HortScience*, 37(1) (2002), pp. 176-177.
 72. Sprague, J. R., Johnson, V. W. Extraction and storage of loblolly pine (*Pinus taeda*) pollen. In: Proceedings of 14 Southern forest tree improvement conference, Eastern Tree Seed, Macon, 1977, pp. 20-27.
 73. Stanley, R. G., Linskens, H. E. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. New York: Springer-Verlag, 1974.
 74. Tighe, M. E. Manual de recolección y manejo de polen de pinus tropicales y subtropicales procedentes de rodales naturales [Manual of collection and management of tropical and subtropical pinus pollen from natural stands], primeira edição, Carolina del Norte Estados Unidos: CAMOCORE, 2004. 20p.
 75. Towill, L. E. Cryopreservation of plant germplasm: Introduction and Some Observations. In: L. E. Towill, Y. (Eds.) *Cryopreservation of plant germplasm II*. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Springer, Berlin, 2002, pp. 03-21.
 76. Towill, L. E. Germplasm preservation. In: R. N. Trigiano, D. J. Gray (Eds.), *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. Boca Raton: CRC Press, 2000, pp. 337-353.
 77. Towill, L. E. *Solanum etuberosum*: A model for studying the cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Science Letters*, 20(4) (1981), pp. 315–324.
 78. Towill, L. E. Low temperature and freeze-/vacuum-drying preservation of pollen. In: K. K. Kartha (Eds.), *Cryopreservation of plant cells and organs*, Boca Raton: CRC Press, 1985, pp. 171-198.
 79. Vendrame, W. A., et al. Pollination of *Dendrobium* hybrids using cryopreserved pollen. *Hort Science*, 43(1) (2008), pp. 264-267.

80. Vertucci, C. W. and Roos, E. E. Theoretical Basis of Protocols for Seed Storage. *Plant Physiology*, 94(3) (1990), pp. 1019-1023.
81. Vertucci, C. W., Roos, E. E., Crane, J. Theoretical Basis of Protocols for Seed Storage III. Optimum Moisture Contents for Pea Seeds Stored at Different Temperatures. *Annals of Botany*, 74(5) (1994), pp. 531–540.
82. Walters, C., Rao, N. K., Hu, K. Optimizing seed water content to improve longevity in *ex situ* genebanks. *Seed Science Research*, 8(1) (1998), pp. 15-22.
83. Wang, B. S. P. Metodología de la conservación de los recursos genéticos forestales [Methodology for the conservation of forest genetic resources]. *Roma: FAO*, p. 93-103, 1975.
84. Wang L., et al. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Scientia Horticulturae* 188 (2015), pp.78–83.
85. Weatherhead, M. A., Grout, B. W. W. and Henshaw, G. G. Advantages of storage of potato pollen in liquid nitrogen. *Potato Research*, 21(3) (1978), pp. 331–334.
86. Williams, J. H. and Brown, C. D. Pollen has higher water content when dispersed in a tricellular state than in a bicellular state. *Acta Bot. Bras.*, 32(3) (2018), pp. 454-461.
87. Winston, P. W. and Bates, D. H. Saturated Solutions For the Control of Humidity in Biological Research. *Ecology*, 41(1) (1960), pp. 232–237.
88. Young, J. F. Humidity control in the laboratory using salt solutions-a review. *J. Appl. Chem.*, 17(9) (1967), pp. 241–245.
89. Xu, J., et al. Wide-scale pollen banking of ornamental plants through cryopreservation. *CryoLetters*, 35(4) (2014), pp. 312-319.
90. Zhang, Y. L., et al. Cryo-banking of *Prunus mume* pollen and its application in cross-breeding. *CryoLetters*, 30(3) (2009), pp. 165-170.
91. Zhang, J. M., et al. Cryopreservation of Citrus anthers in the National Crop Genebank of China. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* , 53(4) (2017), pp. 318–327.

Capítulo 2

**MORFOLOGIA E VIABILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE GRÃOS DE PÓLEN
CRIOPRESERVADOS DE *Paspalum* SPP. (POACEAE)**

Naiana Barbosa Dinato; Bianca Baccili Zanotto Vigna; Joana Dias Bresolin; Alessandra
Pereira Fávero

Naiana Barbosa Dinato

Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rodovia
Washington Luís, Km 235, São Carlos-SP, 13565-905, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6623-6396>

E-mail: nanadinato@hotmail.com

Bianca Baccili Zanotto Vigna

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia
Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0192-9877>

E-mail: bianca.vigna@embrapa.br

Joana Dias Bresolin

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
de Instrumentação Agropecuária (Embrapa Instrumentação), Rua XV de Novembro, 1.452 -
Centro - Caixa Postal 741, - São Carlos-SP, 13560-970 Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2867-4395>

E-mail: joana.bresolin@embrapa.br

Alessandra Pereira Fávero

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia
Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9461-1539>

E-mail: alessandra.favero@embrapa.br

Autor correspondente: Naiana Barbosa Dinato, nanadinato@hotmail.com, +55 (16) 99462-
4334

RESUMO

O gênero *Paspalum* é o mais importante gênero da família Poaceae nas Américas, possui cerca de 310 espécies que podem ser encontradas nas regiões tropicais e temperadas do mundo. Cerca de 215 espécies são encontradas no Brasil em diferentes condições ecológicas e algumas espécies apresentam potencial forrageiro. Dentro desse gênero, muitas espécies formam complexos agâmicos, que cruzam entre si e geram híbridos viáveis. A grande maioria dos acessos de *Paspalum* é tetraploide apomítica, mas existem espécies tetraplóides sexuais e outras com citotipos tetraplóides apomíticos e diplóides sexuais. Para agregar características localizadas em acessos distintos é necessário cruzá-los ao nível tetraplóide e selecionar aqueles que têm melhores características agrônômicas. Para isso, uma das premissas é a sincronização de florescimento entre os genitores. Quanto isso não ocorre naturalmente, uma ferramenta interessante é a criopreservação de pólen. O trabalho visou 1) determinar a porcentagem de grãos de pólen viáveis de *P. atratum* e *P. malacophyllum* criopreservados por 12 meses, 2) avaliar a germinação *in vivo* de grãos de pólen criopreservados e 3) caracterizar padrões da morfologia polínica das espécies/acessos: *Paspalum malacophyllum* (BGP 6 e BGP 293); *Paspalum atratum* (BGP 98 e BGP 308); *Paspalum regnellii* (BGP 215); *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - planta F₁ #10, *Paspalum urvillei* (BGP 393) e *Paspalum notatum*. Os grãos de pólen foram coletados em vasos dentro de casa de vegetação e a campo no BAG, na Embrapa Pecuária Sudeste, com três repetições de cada tratamento. Foram testados dois agentes de desidratação (LiCl e Sílica gel) por três tempos distintos (30', 60' e 120') e um tratamento sem desidratação. Após descongelamento lento, os grãos de pólen foram avaliados quanto à eficiência por coloração daqueles possivelmente viáveis com solução de coloração, 2,3,5 – trifetil cloreto de tetrazólio (TTC) 0,25%, estes foram testados periodicamente ao longo de 12 meses. A coloração de grãos recém-colhidos também foi avaliada como controle. Observou-se que os grãos de pólen permaneceram viáveis após 12 meses quando foram desidratados com cloreto de lítio por 30 minutos (67,25% para *P. malacophyllum* e 64,95% para *P. atratum*) e Sílica gel por 120 minutos (69,15% para *P. malacophyllum* e 64,80% para *P. atratum*) e que foram iguais estatisticamente à testemunha (69,15% para *P. malacophyllum* e 65,45% para *P. atratum*), os quais podem ser considerados bons protocolos de conservação a longo prazo do pólen de *Paspalum*. As amostras que não foram desidratadas apresentaram a seguinte porcentagem de coloração por genótipo: 35,20% para *P. malacophyllum* e 33,01% para *P. atratum* após 12 meses de armazenamento. Os grãos de pólen criopreservados foram utilizados nos seguintes cruzamentos interespecíficos realizados entre janeiro e fevereiro de 2018: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); *P. urvillei* x *P. regnellii* (BGP 215), *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - planta F₁ #37 x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308). Plantas utilizadas como genitores femininos foram emasculadas e polinizadas com pólen criopreservado. Para o teste de germinação *in vivo*, as espiguetas foram retiradas periodicamente, por tempos distintos após a polinização e fixadas em solução de F.A.A. (1: formaldeído, 1: ácido acético glacial, 8: álcool etílico 80%) por 30 minutos. As amostras foram armazenadas em etanol 70%. Os resultados de germinação *in vivo* mostraram que para todos os cruzamentos realizados, houve germinação do tubo polínico no estigma, nos cruzamentos em que *Paspalum urvillei* foi usado como genitor feminino, a germinação variou de 54,55% a 70,73% com grãos de pólen desidratados com cloreto de lítio e de 46,88% a 55,56% desidratado com sílica gel. Já nos cruzamentos envolvendo *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. azulão, a germinação variou de 13,85% a 53,45% para os tratamentos com cloreto de lítio e de 32,76% a 37,50% com sílica gel. A quantidade de grãos de pólen depositadas no estigma também pode influenciar a eficiência da elongação do tubo polínico. Observou-se que, apenas nos cruzamentos *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6 e BGP 293), o tubo polínico

atingiu a micrópila, sendo após 2 horas e 15 minutos de polinização para o cruzamento BGP 393 x BGP 6 e 6 horas para cruzamento BGP 393 x BGP 293. Para a caracterização morfológica polínica, foi realizada acetólise láctica e fotomicrografia em MEV (microscopia eletrônica de varredura), o resultado das análises morfométrica mostrou que, para as espécies estudadas, os grãos de pólen podem ter forma de prolato-esferoidal e subprolato e que não há ornamentação na exina e pouca diferença quanto ao tamanho. A criopreservação de grãos de pólen podem ser um caminho para resolver o desafio da assincronia de florescimento entre genótipos de *Paspalum*.

Palavras-chave: germoplasma, criopreservação, viabilidade por coloração, gramíneas, hibridação interespecífica

ABSTRACT

The genus *Paspalum* is the most important genus of the Poaceae family in the Americas, it has about 310 species that can be found in the tropical and temperate regions of the world. About 215 species are found in Brazil under different ecological conditions and some species have forage potential. Within this genus, many species form agamic complexes, which interbreed and generate viable hybrids. The vast majority of *Paspalum*'s accessions are apomitic tetraploids, but there are sexual tetraploid species and others with apomitic tetraploid and diploid sex cytotypes. To aggregate characteristics located in different accesses it is necessary to cross them at the tetraploid level and select those that have better agronomic characteristics. For this, one of the premises is the synchronization of flowering between the parents. When this does not occur naturally, an interesting tool is the pollen cryopreservation. The work aimed to 1) determine the percentage of viable pollen grains of *P. atratum* and *P. malacophyllum* cryopreserved for 12 months, 2) evaluate the in vivo germination of pollen grains cryopreserved and 3) characterize patterns of pollen morphology of the species / accessions: *Paspalum malacophyllum* (BGP 6 and BGP 293); *Paspalum atratum* (BGP 98 and BGP 308); *Paspalum regnellii* (BGP 215); *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - F1 # 10 plant, *Paspalum urvillei* (BGP 393) and *Paspalum notatum*. Pollen grains were collected in pots inside a greenhouse and in the field at the BAG, at Embrapa Pecuária Sudeste, with three replicates of each treatment. Two dehydrating agents (LiCl and silica gel) were tested for three different times (30', 60' and 120') and a treatment without dehydration. After slow thawing, pollen grains were evaluated for efficiency by staining those possibly viable with staining solution, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 0.25%, these were tested periodically over 12 months. The color of freshly harvested grains was also evaluated as a control. It was observed that the pollen grains remained viable after 12 months when they were dehydrated with lithium chloride for 30 minutes (67.25% for *P. malacophyllum* and 64.95% for *P. atratum*) and Silica gel for 120 minutes (69, 15% for *P. malacophyllum* and 64.80% for *P. atratum*) and which were statistically equal to the control (69.15% for *P. malacophyllum* and 65.45% for *P. atratum*), which can be considered good protocols for the long-term conservation of *Paspalum* pollen. The samples that were not dehydrated had the following percentage of staining by genotype: 35.20% for *P. malacophyllum* and 33.01% for *P. atratum* after 12 months of storage. The cryopreserved pollen grains were used in the following interspecific crossings carried out between January and February 2018: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); *P. urvillei* x *P. regnellii* (BGP 215),); *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - F1 # 37 plant x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308). Plants used as female parents were emasculated and pollinated with cryopreserved pollen. For the in vivo germination test, the spikelets were removed periodically, for different times after pollination and fixed in F.A.A. (1: formaldehyde, 1: glacial acetic acid, 8: 80% ethyl alcohol) for 30 minutes. The samples were stored in 70% ethanol. The results of in vivo germination showed that for all crosses performed, there was germination of the pollen tube in the stigma, in the crosses where *Paspalum urvillei* was used as female parent, the germination ranged from 54.55% to 70.73% with grains of pollen dehydrated with lithium chloride and from 46.88% to 55.56% dehydrated with silica gel. In the crossings involving *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. blue, germination varied from 13.85% to 53.45% for treatments with lithium chloride and from 32.76% to 37.50% with silica gel. The amount of pollen grains deposited in the stigma can also influence the efficiency of the elongation of the pollen tube. It was observed that, only at the crossings *P. urvillei* (BGP 393)

x *P. malacophyllum* (BGP 6 and BGP 293), the pollen tube reached the micropyle, being after 2 hours and 15 minutes of pollination for the crossing BGP 393 x BGP 6 and 6 hours for crossing BGP 393 x BGP 293. For pollen morphological characterization, lactic acetolysis and SEM photomicrography (scanning electron microscopy) were performed, the result of the morphometric analysis showed that, for the studied species, the pollen grains they may have a prolate-spheroidal and subprolate shape and there is no ornamentation on the exine and little difference in size. The cryopreservation of pollen grains can be a way to solve the challenge of flowering asynchrony among *Paspalum* genotypes.

Keywords: germplasm, cryopreservation, staining viability, grasses, interspecific hybridization

2.0 INTRODUÇÃO

Paspalum é um gênero que pertence à família Poaceae, é originário das Américas e compreende cerca de 310 espécies distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, basicamente no continente americano (MORRONE et al., 2012). Ocorre em todo Brasil, no leste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (ZULOAGA e MORRONE, 2005). No Brasil são encontradas cerca de 215 espécies (FLORA DO BRASIL 2020, 2020) sob diferentes condições ecológicas, apresentando alta diversidade genética nas mais variadas formações vegetais (BARRETO, 1974).

A importância do gênero é evidenciada por sua adaptabilidade a diferentes ecossistemas, o que representa menor risco de causar desequilíbrio biológico devido à grande diversidade genética existente, que é importante por assegurar maior estabilidade ao ecossistema (STRAPASSON et al., 2000). Apesar de o Brasil estar entre os países com maior diversidade genética de *Paspalum* disponível, o seu uso é ainda restrito como forrageira, principalmente com ocorrência natural nas pastagens nativas do sul do país. As poucas variedades de *Paspalum* disponíveis no mercado foram obtidas por meio da seleção de germoplasma nativo. Já em outros países, como nos Estados Unidos, diversas espécies de *Paspalum* nativas do Brasil, como *Paspalum notatum* Flüggé, *P. dilatatum* Poir., *P. plicatulum* Michx. e *P. guenoarum* Arechav. são utilizadas em programas de melhoramento genético, obtendo resultados positivos (ACUÑA et al., 2019).

A grande maioria dos acessos de *Paspalum* é tetraploide com 40 cromossomos e de reprodução apomítica, sendo que algumas espécies apresentam também citótipos diplóides sexuais. Além disso, algumas espécies são tetraplóides sexuais (ORTIZ, et al., 2013). A apomixia é descrita para cerca de 15% das famílias das angiospermas, sendo que 75% das espécies apomíticas estão nas famílias Poaceae, Asteraceae e Rosaceae (ASKER; JERLING, 1992). Para que seja possível agregar características de interesse localizadas em acessos apomíticos distintos, é necessário cruzar acessos apomíticos com sexuais ao nível tetraplóide e selecionar os melhores ao longo do programa de melhoramento. No entanto, são encontradas duas barreiras principais para estes cruzamentos: 1) em alguns casos, os sexuais são diplóides, necessitando a duplicação do número de cromossomos, para cruzamentos no nível tetraplóide, a indução de poliploidia é feita utilizando substâncias antimitóticas, sendo a colchicina a mais amplamente usada em plantas forrageiras; 2) ocorre assincronia de florescimento entre os genitores, os quais, muitas vezes, florescem em épocas diferentes, principalmente em se tratando de cruzamentos interespecíficos.

Dentre os acessos que apresentam características de interesse para o programa de melhoramento, observa-se que há espécies de um mesmo grupo que florescem entre os meses de janeiro a março, como *P. plicatum* (grupo Plicatula) e *P. regnellii* (grupo Virgata), e outras espécies que apresentam florescimento tardio, entre os meses de abril a junho, como *P. atratum* (Plicatula) e *P. malacophyllum* (Malacophylla), representando assincronia de florescimento entre os genitores de interesse. Uma ferramenta aplicável a essa situação é o armazenamento de grão de pólen, visando preservar a viabilidade dos gametas masculinos por diferentes períodos, sob condições artificiais (FERREIRA et. al., 2007). O armazenamento adequado do grão de pólen viabiliza cruzamentos intra e interespecíficos utilizando esses diferentes acessos.

Um dos métodos de conservação que se mostra eficaz para grão de pólen é a criopreservação, que é a conservação de material biológico em nitrogênio líquido, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. A capacidade de sobrevivência dos tecidos vegetais à criopreservação depende de sua tolerância à desidratação e à criotemperatura (SANTOS, 2000).

Contudo, há poucos relatos na bibliografia de estudos de conservação a longo prazo utilizando criopreservação de grãos de pólen em *Paspalum*. Dinato et al (2018) identificou que os melhores tratamentos para criopreservação de *P. notatum* foram com o uso do agente de desidratação Cloreto de Lítio por 30 minutos e Sílica gel por 120 minutos.

Sabe-se que para a conservação adequada do grão de pólen em nitrogênio líquido, este deve ser desidratado para evitar formação de cristais de gelo no interior das células (SANTOS, 2000). O teor de água no grão de pólen pode ser ajustado de acordo com o uso de soluções salinas saturadas conhecidas, como: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de magnésio hexahidratado); NaCl (cloreto de sódio); $\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (cloreto de lítio); NaOH (hidróxido de sódio). Segundo Connor e Towill (1993), os grãos de pólen podem sobreviver aos procedimentos de secagem com soluções salinas saturadas e respondem com sucesso ao armazenamento em temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. De acordo com Winston e Bates (1960), as soluções saturadas mantêm uma pressão de vapor muito constante, mesmo sob as condições de mudança de umidade, porque o ganho de água faz com que o material se precipite. Não havendo muito líquido sobre o sólido, há uma difusão dentro da solução lentamente e as condições de umidade permanecem inalteradas. Para obter sucesso na conservação a longo prazo de grão de pólen é necessário que o teor de água esteja entre 7% e 20% para o armazenamento em temperaturas que variam de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (YATES et al., 1991). O pólen tolera dessecação até certo ponto, sendo que a perda da viabilidade em diferentes espécies tem sido correlacionada com a perda de água e a manutenção do estado de desidratação em condições naturais e de laboratório (LINSKENS e CRESTI, 1988; NEPI e PACINI, 1993). Na literatura, dificilmente são mencionadas formas de

secagem do pólen, e nos casos em que isso ocorre (MCGUIRE, 1952; KWAN et al., 1969; AKIHAMA et al., 1979; FERREIRA et al., 2007; SILVA FILHO, 2007) não há uma descrição detalhada da metodologia utilizada e do teor de água residual presente no grão de pólen. Isto dificulta sua repetibilidade e utilização prática na produção de sementes híbridas.

Os grãos de pólen armazenados precisam estar viáveis para garantir sucesso nas hibridações, portanto seu monitoramento é necessário, sendo realizado antes e após a conservação. Estes poderão ser utilizados em cruzamentos entre genótipos com características de interesse que apresentem assincronia de florescimento. Para determinar a viabilidade do pólen são usados dois métodos: (1) diretos, que consistem na indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e (2) indiretos, que são baseados em parâmetros citológicos, como a coloração dos grãos de pólen (DAFNI, 1992; SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992).

Dentre os corantes mais utilizados destacam-se: carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (SHARMA; SHARMA, 1994; STANLEY; LINSKENS, 1974), cloreto de trifeniltetrazólio, tetrazólio vermelho (SHIVANNA; RANGASWAMY, 1992; STANLEY; LINSKENS, 1974) e verde malaquita com fucsina ácida (ALEXANDER, 1980), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen. Por ser um procedimento barato e simples, a coloração é muito utilizada e fornece resultados em curto espaço de tempo. Esse método é muito utilizado para a palinologia, ciência que estuda os grãos de pólen (ALVIM, 2008).

O teste de germinação *in vivo* consiste na deposição de grãos de pólen no estigma receptivo e, na retirada da espigueta após um determinado período. Em seguida é realizada a contagem do número de tubos que penetraram no estigma, e comparado ao número total de grãos de pólen (SOUSA, 1988). Nesse método, ocorre a coloração do tubo polínico germinado e então é feita a contagem utilizando microscópio de fluorescência. A microscopia de fluorescência é utilizada em vários campos e, em plantas, a técnica pode ser aplicada para observação do crescimento do tubo polínico no estilete e ovário (SUN et al., 1991; YI et al., 2006). O procedimento é baseado na fluorescência secundária, que é a captação de substâncias chamadas fluorocromos pelas células, que fluorescem quando irradiadas com raios que não são perceptíveis para os olhos (KHO & BAER, 1968). De acordo com Kears & Inoue (1993), essa técnica permite analisar características associadas à taxa de crescimento e à germinação dos tubos polínicos, sendo utilizada também para analisar hibridações efetivas em programas de melhoramento genético e, assim, explicar algumas formas de incompatibilidade entre genótipos.

O corante azul de anilina é muito usado nessa técnica para avaliar o crescimento do tubo polínico no estigma quando visto sob luz ultravioleta, a calose produzida no tubo polínico é iluminada com o corante e a viabilidade e a germinação do tubo pode ser vista e determinada por essa mancha azul (DUMAS e KNOX, 1983; YI et al., 2006; MARTIN, 1959). A adequação da coloração parece estar relacionada à quantidade de calose presente, e isso, por sua vez, pode ser influenciado por fatores ambientais, como umidade e temperatura. Linskens e Esser (1957) encontraram a quantidade de calose nos tubos polínicos de *Petunia hybrida*, maior após autopolinização do que após a polinização cruzada. A maturidade da flor no momento da polinização, pode também influenciar a quantidade de calose produzida. Plantas que estão com mais nutrientes, produzem calos de forma mais confiável do que plantas deficientes em nutrição (MARTIN, 1959).

Destaca-se aqui algumas desvantagens dessa metodologia, do ponto de vista prático, que podem refletir na avaliação da viabilidade, tais como a dificuldade de penetração do tubo polínico na superfície estigmática devido a superfície cuticular; a presença de água no estigma, que pode levar à ruptura do pólen, de forma que o mesmo não germine e; a não receptividade do estigma ou a incompatibilidade genética entre o pólen e o pistilo; a aplicação de alta concentração de pólen que irá inibir a penetração do tubo polínico no estilete; a dificuldade de se identificar os tubos polínicos dos grãos germinados no estigma e a ocorrência de uma queda acentuada na temperatura, podendo modificar drasticamente a germinação do pólen *in vivo* e conduzir a uma viabilidade aparentemente baixa (STANLEY; LINSKENS, 1974). Resultados de pesquisa mostraram que a porcentagem de germinação e viabilidade do pólen estão em completa anuência (BOLAT; PIRLAK, 1999). Nesse aspecto, SCORZA e SHERMAN (1995) acreditam que um grão de pólen vigoroso deve apresentar de 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos.

Além de saber se o pólen está viável, outra ferramenta importante para estudo da conservação, taxonomia, filogenia e melhoramento genético é a caracterização morfológica. Grãos de pólen da família Poaceae se apresentam mônades, de âmbito circular, prolato-esferoidais a oblato-esferoidais, abertura do tipo poro, com presença de ânulo e opérculo, exina rugulada-pilada (de difícil visualização em microscopia óptica) e areolada, com aréolas de diferentes tamanhos, com contornos irregulares e recobertos por espículos quando vistos em microscopia eletrônica de varredura (CORRÊA et al., 2005).

Este estudo visou: 1) determinar a concentração e tempo de dessecação por meio de dissecantes: sal saturado de Cloreto de Lítio e Sílica gel azul para ajustar o teor de água do grão de pólen antes da criopreservação; 2) indicar a viabilidade dos grãos de pólen de *P. atratum*

e *P. malacophyllum*, após armazenamento em nitrogênio líquido por até 12 meses pelo uso de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio; 3) identificar a germinação *in vivo* de grãos de pólen criopreservados e 4) caracterizar padrões da morfologia polínica de diferentes acessos de *Paspalum* de interesse para o programa de melhoramento genético.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Material vegetal e cruzamentos

Dentre os acessos de *Paspalum* em avaliação para uso como forrageira na Embrapa Pecuária Sudeste foram selecionados para este estudo: dois genótipos de *Paspalum malacophyllum* Trin. BGP 6 (V5095) e BGP 293 (V14606), um de *Paspalum regnellii* Mez. BGP 215 (Lr2), e dois de *Paspalum atratum* Swallen BGP 98 (V9880), e BGP 308 (V14525), para serem doadores de pólen, e como genitor feminino, foram utilizados *Paspalum urvillei* Steudel BGP 393 (Af34) e o híbrido (*P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42), o código indicado entre parênteses na coluna Código da Tabela 2 se refere ao número pelo qual cada genótipo será referenciado no texto para melhor entendimento. O genitor feminino tetraploide sintético da espécie *P. plicatum* denominado 4PT foi desenvolvido por Sartor et al. (2009), pela duplicação cromossômica de um acesso diploide sexual com colchicina, e NOVO et al. (2017) obtiveram a progênie F₁ do cruzamento entre *P. plicatum* 4PT e *P. guenoarum* cv. Azulão.

Os ensaios de criopreservação de grão de pólen de *Paspalum* foram realizados na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP). Sementes dos acessos utilizados como genitores masculinos (doadoras de pólen) foram cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Paspalum*. Estas sementes estavam conservadas em câmara fria, foram plantadas em sementeiras (5,3 X 33,7 X 67,2 cm), com 162 células, de dimensão 3,5 X 3,5 cm e volume 31 cm³, com substrato para plantas Carolina Soil e posteriormente colocadas em saquinhos de mudas (10 x 16 cm), sendo 20 saquinhos para cada acesso. Após três meses, essas plantas foram transplantadas para vasos (22,5 x 23 cm), volume 8 litros, com substrato para plantas Carolina Soil mantidas em casa de vegetação. As plantas dos genitores femininos (*P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) foram obtidas por mudas e colocadas em saquinhos de mudas (10 x 16 cm), (20 de cada planta), na casa de vegetação. O material *P. urvillei* (1) foi obtido de uma coleta no talude da Estrada Municipal Guilherme Scatena, próximo ao Parque Ecológico em São Carlos, SP, foram feitas 20 mudas que foram

transplantadas para saquinhos de mudas (10 x 16 cm) e colocadas dentro do telado, posteriormente, após seis meses as plantas foram transplantadas para vasos de 2 litros (18 x 15 cm). As mudas do acesso de *P. regnellii* (2), foram obtidas diretamente no canteiro deste acesso no BAG, pois as mesmas foram introduzidas posteriormente no trabalho.

Tabela 2 - Relação das espécies de *Paspalum* estudadas para identificar a viabilidade de pólen após criopreservação e seu uso em cruzamentos intra e interespecíficos.

Código	Espécie	Código do Coletor	Local	Grupo Informal Botânico	Modo de reprodução	Genona	Ploidia
BGP 393 (1)	<i>Paspalum urvillei</i> Steud.	Af 34	São Carlos /SP - BR	Dilatata	Sexual	IIJJ	Autotetraplóide
BGP 6 (2)	<i>Paspalum malacophyllum</i> Trin.	V 5095	Itumbiara/GO - BR	Malacophyla	Apomítico	MMMM	Autotetraplóide
BGP 293 (3)	<i>Paspalum malacophyllum</i> Trin.	V 14606	Japorã /MS - BR	Malacophyla	Apomítico	MMMM	Autotetraplóide
BGP 215 (4)	<i>Paspalum regnellii</i> Mez	Lr 2	Itirapina /SP - BR	Virgata	Sexual	RRSS	Autotetraplóide
BGP 98 (5)	<i>Paspalum atratum</i> Swallen	V S W 9880	Terenos/MS - BR	Plicatula	Apomítico	-----	Alopoliploide segmentar
BGP 308 (6)	<i>Paspalum atratum</i> Swallen	V 14525	Terenos/MS - BR	Plicatula	Apomítico	-----	Alopoliploide segmentar
F1#10, F1#04, F1#37 e F1#42 (7)	(<i>Paspalum plicatulum</i> 4PT) x <i>Paspalum guenoarum</i> cv azulão)	β-----	-----	Plicatula	Sexual	-----	Tetraplóide

Código do coletor: Af = Alessandra Pereira Fávero; V = José Francisco Montenegro Valls; Lr = Luis Alberto Rocha Batista; S = Charles S. Simpson; W = Wantuil Werneck

β material proveniente do programa de melhoramento genético de *Paspalum* da Universidad Nacional del Nordeste, Argentina

2.1.2 Coleta e armazenamento de grãos de pólen

As inflorescências das plantas em vasos foram cobertas com saquinhos de papel (25x16cm), no dia anterior à deiscência das anteras e foram mantidas assim até a manhã seguinte, dentro da casa de vegetação, conforme protocolo descrito por Novo et al. (2016). As inflorescências de plantas a campo (BGP 215) foram coletadas e acondicionadas em copos de plástico e cobertas com saquinhos de papel da mesma forma que as inflorescências plantadas em vasos.

Pela manhã, após a deiscência das anteras, aproximadamente às oito horas para os acessos BGP 6, 293 e 215 e às 10h e 30 minutos para BGP 98 e 308, as inflorescências foram levemente agitadas, induzindo à liberação do pólen. As amostras de grãos de pólen foram colocadas em placas de petri (100x15mm) e levadas ao Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Pecuária Sudeste para serem submetidas aos testes de desidratação e conservação a longo prazo.

2.1.3 Desidratação de grãos de pólen por meio de sais saturados e criopreservação

Para a desidratação dos grãos de pólen foram utilizadas sílica gel azul (15g) e solução saturada de cloreto de lítio (LiCl) (75%).

Para a desidratação, foi necessário criar um ambiente fechado para abrigar os grãos de pólen. Colocou-se o agente de desidratação em uma placa petri (90x15mm) aberta dentro de uma caixa plástica gerbox de material poliestireno cristal transparente capacidade de 250 ml com calço, medindo 11x11x3,5cm e embaixo de uma tela em aço inox com tamanho 11x11cm. Em cima desta tela colocou-se uma placa de petri contendo os grãos de pólen e manteve-se as caixas gerbox fechadas por diferentes intervalos de tempo: 30, 60 e 120 minutos à temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ (DINATO et al., 2018) Após esse tempo armazenou-se os grãos de pólen em cápsulas de gelatina dentro de criotubos imersos em nitrogênio líquido (Figura 1). Foi utilizado também um tratamento correspondente aos grãos de pólen que não foram submetidos à desidratação. Para cada tratamento foram conservados três tubos com grãos de pólen e foi avaliada uma testemunha, que consistiu no pólen recém-colhido na inflorescência. As amostras dos diferentes tratamentos permaneceram armazenadas imersas em nitrogênio líquido por 1, 10, 30, 90, 180, 270 e 365 dias.

Após descongelamento lento, técnica que consiste em descongelar os grãos de pólen por 30' no freezer, 30' na geladeira e 30' em temperatura ambiente, os grãos de pólen foram avaliados quanto à porcentagem de grãos de pólen corados.

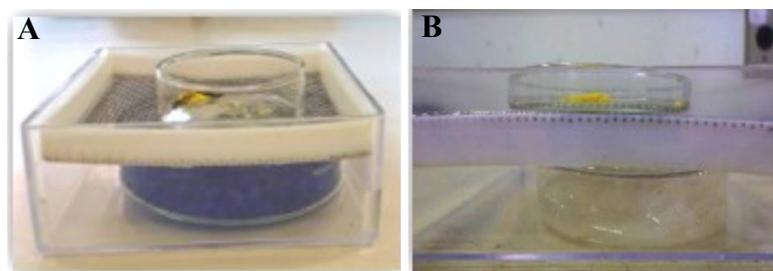


Figura 1. Esquema da desidratação dos grãos de pólen, utilizando agentes de desidratação. A) Sílica gel azul. B) Solução saturada de Cloreto de Lítio. Fonte: autora

2.1.4 Porcentagem de grãos de pólen corados com solução de tetrazólio (teste histoquímico)

A avaliação foi feita em todas as fases da pesquisa, logo após coletados os grãos de pólen das anteras (testemunha com pólen fresco) e após cada tratamento realizado, para os

acessos BGP 6, 293, 308 e 98. Após as coletas das amostras, os grãos de pólen foram corados com solução de 2,3,5 – trifetil cloreto de tetrazólio (0,25%). Uma gota desta solução foi colocada na lâmina, posteriormente foi colocada a amostra de grãos de pólen. A lâmina foi colocada em uma caixa de gerbox com papel de filtro umedecido com água destilada. Esta foi mantida em estufa a 27°C por duas horas. As estimativas de viabilidade de pólen (%) foram feitas pela contagem ao acaso, no microscópio óptico, do número de grãos de pólen corados em relação ao total.

Os critérios para considerar os grãos de pólen como viáveis foram os grãos estarem bem desenvolvidos e inteiramente corados, sendo que os grãos mal desenvolvidos ou parcialmente coloridos, foram considerados como inviáveis. Foram contados 200 grãos em cada lâmina, sendo utilizadas três lâminas (três repetições). As porcentagens de grãos de pólen corados foram calculadas para cada amostra de todos os indivíduos envolvidos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE INC., 2004).

2.1.5 Viabilidade de pólen por germinação *in vivo*

Para o teste *in vivo* foram realizados os seguintes cruzamentos: *P. urvillei* (1) x *P. malacophyllum* (3; 4); *P. urvillei* (1) x *P. regnellii* (2); (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - planta F₁ #37) (5) x *P. atratum* (6; 7). Inflorescências de *Paspalum* foram colocadas em uma câmara úmida dentro da casa de vegetação, na tarde antes do florescimento. Na manhã seguinte, devido à alta umidade relativa do ar, a deiscência das anteras foi atrasada por um período curto, o que proporcionou tempo suficiente para remover as anteras com uma pinça antes que elas se abrissem. Após a emasculação, a planta foi removida da câmara úmida para permitir a secagem dos estigmas. Periodicamente, os estigmas das espiguetas emasculadas foram examinados sob lupa para verificar a ocorrência de contaminação. As espiguetas com estigmas contaminados foram retiradas da inflorescência. Os floretes emasculados com estigmas limpos foram polinizados com o pólen armazenado em nitrogênio líquido. Foram utilizados grãos de pólen que foram desidratados com cloreto de lítio por 30 minutos ou com sílica gel por 120 minutos. Espiguetas foram coletadas em diferentes intervalos de tempo para os diferentes cruzamentos (Tabelas 2 e 3). Em seguida as estruturas foram fixadas em solução

de F.A.A. (1: formaldeído, 1: ácido acético glacial, 8: álcool etílico 80%) por 30 minutos e armazenadas em etanol 70%.

Posteriormente, os pistilos foram dissecados e preparados para análise em microscopia de fluorescência. Os pistilos dissecados foram colocados em solução de NaOH 1N por 30 minutos e depois transferidos para solução de azul de anilina 0,1 % por 30 minutos. Foram examinados em microscópio de fluorescência marca Zeiss, equipado com filtro de luz T400lp. A porcentagem de grãos de pólen germinados foi determinada por uma contagem de amostras ao acaso, seguindo protocolo de Burson e Young (1983).

2.1.6 Morfologia polínica

Para caracterização morfológica e ultraestrutural, as anteras de cada amostra foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (2%), CaCl₂ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 24 horas. Posteriormente, foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio (0,05 M) e imediatamente pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%), por 1 h, em temperatura ambiente, seguido de lavagens com água destilada. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (30-100%), por 10 min cada, sendo a última de 100%, repetidas três vezes de 10 minutos. Em seguida, as amostras foram levadas ao ponto crítico (Leica EM-CPD300) utilizando dióxido de carbono, por 1 hora e 30 minutos.

As amostras dos acessos (1, 4, 6 e 7) foram submetidas ao protocolo de fixação com solução de Karnovsky, exceto para o acesso 1, o qual as amostras foram fixadas em solução F.A.A. por 1h, e posteriormente todas as amostras listadas acima foram secas em liofilizador por, pelo menos, 18 horas.

As anteras foram seccionadas e os grãos de pólen foram colocados sobre uma fita carbono nos stubs, as amostras então foram recobertas com ouro (15nm de ouro, 60 segundos com 40μA, no aparelho Sputter coater, modelo SCD050 (Leica)). Posteriormente, as amostras foram analisadas no MEV convencional Modelo JSM – 6510 (Jeol).

Para as medidas, os grãos de pólen foram submetidos à acetólise láctica fraca (ACLAC 40), conforme Raynal e Raynal (1979). Foram medidos aleatoriamente o diâmetro polar, equatorial e exina de 25 grãos de pólen, utilizando software da Axio Vision 40 x 64 v. 4.9 1.0, estes foram caracterizados de acordo com a nomenclatura proposta por Punt et al. (2007) e Hesse et. al (2009).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Porcentagem de grãos de pólen corados com solução de tetrazólio (teste histoquímico)

As análises estatísticas demonstraram que houve diferenças significativas na porcentagem de grãos de pólen corados após os diferentes tratamentos de desidratação de grãos de pólen. Observou-se que a porcentagem de grãos de pólen variou entre os genótipos e tratamentos.

Os grãos de pólen dos dois acessos de *P. malacophyllum* estudados obtiveram porcentagem de grãos de pólen corados variando de 44% a 80,67%. Sendo que aqueles desidratados com Cloreto de Lítio por 30 minutos apresentaram viabilidade de 65,33% a 80,67%, por 60 minutos, a viabilidade variou de 54% a 65% e desidratados por 120 minutos, teve porcentagem entre 47,67% a 56%. Os resultados com o dessecante Sílica gel, mostraram que ao ser desidratado por 30 minutos, a porcentagem de viabilidade manteve-se entre 49% a 60%, por 60 minutos foi de 60,67% a 69,33% e por 120 minutos o resultado foi de 68% a 79%, a testemunha (pólen fresco) variou de 70,67% a 77,67% e os grãos de pólen que não sofreram desidratação teve uma viabilidade de 44% a 30 % considerando os dois genótipos (BGP 6 e BGP 293).

Ao observar os resultados de porcentagem de grãos de pólen corados dos acessos de *P. atratum*, nota-se que a variação foi de 29,33% a 79%. Sendo que para o agente de desidratação Cloreto de Lítio pelo tempo de 30 minutos, a viabilidade variou de 61,33% a 79%, 60 minutos foi de 53,33% a 66,33%, desidratação de 120 minutos teve porcentagem variando de 42,33% a 58%, já para o outro agente dissecante, pelo tempo de 30 minutos a porcentagem de viabilidade foi de 40,67% a 57,0%, por 60 minutos foi de 48,67% a 65,33% e por 120 minutos variou de 60,0% a 77,0%, a testemunha (pólen fresco) teve viabilidade de 69,0% a 73,67% e os grãos de pólen que não sofreram ação de desidratação permaneceram com viabilidade que variou de 29,33% a 35,67%, considerando os dois genótipos (BGP 98 e BGP 308).

Sendo assim, nota-se que nesse estudo com grãos de pólen de espécies de *Paspalum*, que aqueles desidratados com LiCl por 30' e com sílica gel por 120' mantiveram a coloração de pólen estatisticamente igual a testemunha, sendo, aproximadamente, de 70% a 80 %, após 12 meses de armazenamento, sendo considerados tratamentos adequados para criopreservação de grãos de pólen de *Paspalum* (Tabela 3). Acredita-se que o uso dos agentes de desidratação

LiCl e Sílica Gel por 30 e 120 minutos respectivamente resultou em porcentagens de grãos de pólen viáveis similares a testemunha porque os sais utilizados apresentam umidade relativa de 12% e 10% respectivamente, a uma temperatura de 25° C, de acordo com os trabalhos realizados por Winston e Bates (1960); Young (1967); Almeida et al. (2011).

Na Tabela 3 também é possível observar que aqueles que não sofreram a ação do agente de desidratação apresentaram viabilidade de aproximadamente 29-44% após 12 meses de armazenamento, considerando os quatro genótipos estudados. A redução da viabilidade de pólen pode ser explicada pois quando o pólen é submetido a baixas temperaturas, a redução da umidade é necessária para evitar o rompimento dos tecidos provocado pelo congelamento intracelular da água contida no grão de pólen. Este resultado é corroborado por Barnabás e Rajki (1976), que enfatizam que os grãos de pólen para serem armazenados, necessitam de uma umidade adequada, pois se muito secos pode haver perda viabilidade e se muito úmidos pode gerar formação intracelular de cristais de gelo quando o armazenamento é feito sob temperaturas abaixo do ponto de congelamento (0°C).

Para que uma polinização eficiente ocorra, é necessário que sejam feitas estimativas sobre a quantidade, qualidade, viabilidade e capacidade de germinação do grão de pólen a ser utilizado (GÖKBAYRAK e ENGIN, 2016). Os estudos da viabilidade e germinação do pólen são de extrema importância para estimar o potencial de reprodução da espécie (GADZE et al., 2011; PICCININI et al., 2012).

O uso de corantes é um método relativamente seguro para estimar a quantidade de grãos de pólen corados que são considerados viáveis, o que permite fazer inferências importantes sobre a integridade dessas estruturas (MENCK et al., 1990). Considera-se que existe uma correlação positiva entre a viabilidade e a coloração. A viabilidade do pólen é considerada alta, acima de 70%, mostrando-se confiável para estudos de melhoramento genético sem causar problemas de reprodução (RUGGIERO et al., 1996).

Tabela 3 - Porcentagem de grãos de pólen corados com 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio (TTC), após 1 dia a 365 dias de armazenamento em nitrogênio líquido.

Acesso Tempo (min) - Tempo (dias)/Trat	BGP 6		BGP 293		BGP 98		BGP 308	
	LiCl	Sílica gel	LiCl	Sílica gel	LiCl	Sílica gel	LiCl	Sílica gel
30 / 1d	65,33 a	54,00 c	80,33 a	60,00 b	68,67 a	50,67 c	75,33 a	51,33 c
60 / 1d	54,00 c	60,67 c	64,33 b	69,33 b	56,67 bc	58,67 c	59,33 b	60,67 b
120 / 1d	49,00 c	69,00 a	54,00 c	78,67 a	48,00 c	68,33 ab	51,33 c	70,67 a
30 / 10d	68,67 a	52,00 c	80,67 a	58,00 bcd	68,33 a	50,00 c	76,67 a	49,00 c
60 / 10d	54,33 c	62,33 bc	65,00 b	69,00 b	57,33 bc	60,67 bc	59,67 b	61,67 b
120 / 10d	49,67 c	71,33 a	55,33 bc	79,00 a	48,33 c	68,33 ab	49,33 d	69,67 a
30 / 30d	66,00 a	55,00 c	80,67 a	58,00 bcd	68,00 a	52,33 c	77,00 a	49,67 c
60 / 30d	54,33 c	63,33 bc	64,00 b	68,33 b	58,00 b	62,33 bc	60,33 b	60,33 b
120 / 30d	48,67 c	68,33 a	55,67 bc	78,33 a	48,33 c	69,00 a	49,33 d	70,33 a
30 / 90d	64,67 a	53,67 c	80,33 a	58,67 bc	68,33 a	53,33 bc	75,67 a	52,00 c
60 / 90d	54,00 c	65,00 b	64,33 b	68,33 b	57,00 bc	64,67 b	59,33 b	59,33 b
120 / 90d	49,33 c	69,33 a	56,00 b	78,33 a	48,67 c	70,33 a	51,00 c	67,33 a
30 / 180d	66,00 a	53,67 c	70,00 a	51,00 de	79,00 a	57,00 b	74,33 a	53,67 c
60 / 180d	54,67 c	63,00 bc	57,67 bc	62,00 c	66,33 b	65,33 b	60,00 b	61,00 b
120 / 180d	50,00 c	69,00 a	47,67 d	70,67 a	58,00 bc	77,00 a	51,33 c	69,33 a
30 / 270d	65,67 a	53,00 c	69,67 a	49,00 e	69,33 a	49,67 c	62,00 ab	42,00 d
60 / 270d	55,00 c	63,00 bc	58,00 bc	61,67 c	56,67 bc	58,67 c	53,33 c	49,33 c
120 / 270d	49,00 c	70,00 a	48,00 d	70,33 a	48,33 c	68,67 a	43,67 d	60,00 b
30 / 365d	65,67 a	52,67 c	69,33 a	51,33 cde	69,00 a	51,00 c	61,33 b	40,67 d
60 / 365d	54,67 c	63,33 bc	55,67 bc	62,00 c	56,33 bc	60,67 bc	54,33 c	48,67 c
120 / 365d	48,00 c	68,00 a	47,67 d	71,00 a	48,33 c	69,00 a	42,33 d	61,00 b
C1		70,67 a		77,67 a		73,67 a		69,00 a
C2 1d		33,67 f		44,00 d		35,00 f		35,67 f
C2 10 d		32,67 f		42,00 e		35,00 f		33,67 f
C2 30 d		32,33 f		42,67 e		34,67 f		33,00 f
C2 90 d		31,67 fg		41,33 e		34,33 f		32,33 f
C2 180d		30,67 fg		40,00 e		36,00 ef		32,67 f
C2 270 d		30,00 g		33,00 fg		32,67 f		29,67 g
C2 365 d		30,00 g		31,67 fg		31,67 fg		29,33 g

C1 -pólen fresco C2 - não desidratado

p > 0,05

O cloreto de 2,3,5 trifêniltetrazólio é um dos corantes mais utilizados para esse fim, o teste é baseado na atividade das enzimas desidrogenases (BULAT, 1961; COOK; STANLEY, 1960), que por sua vez catalizam as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Estas enzimas, particularmente a desidrogenase do ácido málico, reduzem o sal de tetrazólio (2,3,5-trifênil cloreto de tetrazólio ou TTC) nos tecidos vivos (MOORE, 1973). Quando o TTC é reduzido nas células vivas, a reação de redução resulta na formação de um composto vermelho, estável e insolúvel, conhecido por trifênilformazan. Essa reação revela que há atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade na célula e no

tecido. Esse corante é um marcador da atividade das enzimas desidrogenase envolvidas na atividade respiratória dos tecidos vivos, assim quanto maior a taxa de respiração celular, mais intensa será a coloração do grão de pólen (Figura 2). A atividade enzimática presente no grão de pólen está associada à capacidade de germinação do pólen. Vários autores propuseram que o teste com 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) é a estimativa mais confiável da viabilidade do pólen, ficando próximo ao observado com a germinação *in vitro* (ABDELGADIR et al., 2012; BOLAT e PIRLAK, 1999; HUANG et al., 2004; HUANG et al., 2004; MUNHOZ et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2019). No entanto, em algumas espécies, há relatos de resultados falso-positivos no teste de viabilidade, quando comparado com os resultados dos testes de germinação (DAFNI et al., 2005; STONE et al., 1995).

Em estudos com diferentes corantes para testar a viabilidade do pólen de pinhão manso (Euphorbiaceae), Abdelgadir et al. (2012) observaram que apenas a solução de cloreto de tetrazólio foi capaz de distinguir o pólen viável do não viável, concluindo que é uma técnica confiável para a espécie estudada. Desse modo, a coloração vermelha da reação é a indicação da viabilidade através da detecção da respiração a nível celular, sendo assim, tecidos não viáveis não reagem e conseqüentemente não apresentam coloração. Associa-se neste caso a capacidade de germinação com a atividade enzimática (SOUSA, 1988).

Segundo Diamantino et al. (2016), em seus estudos com mamona, a viabilidade de pólen do genótipo MPA17 (98%) foi superestimada pelo ensaio com o corante acetocarmina, os testes feitos com cloreto de tetrazólio, mostrou uma viabilidade de 60%, e foi um resultado mais próximo do observado na germinação *in vitro* (51,50%) para o meio de cultura M10 (35 mL de M 10 composto por: 200 g/L de sacarose + 0,3 g/L de Ácido Bórico (H_3BO_3) + 0,5 g/L de Nitrato de Cálcio ($Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$) + 0,414 g/L de Sulfato de Magnésio ($Mg(SO_4) \cdot 7H_2O$) + 0,3 g/L de Nitrato de Potássio (KNO_3), solidificado com ágar a 0,8% e pH 7,0.

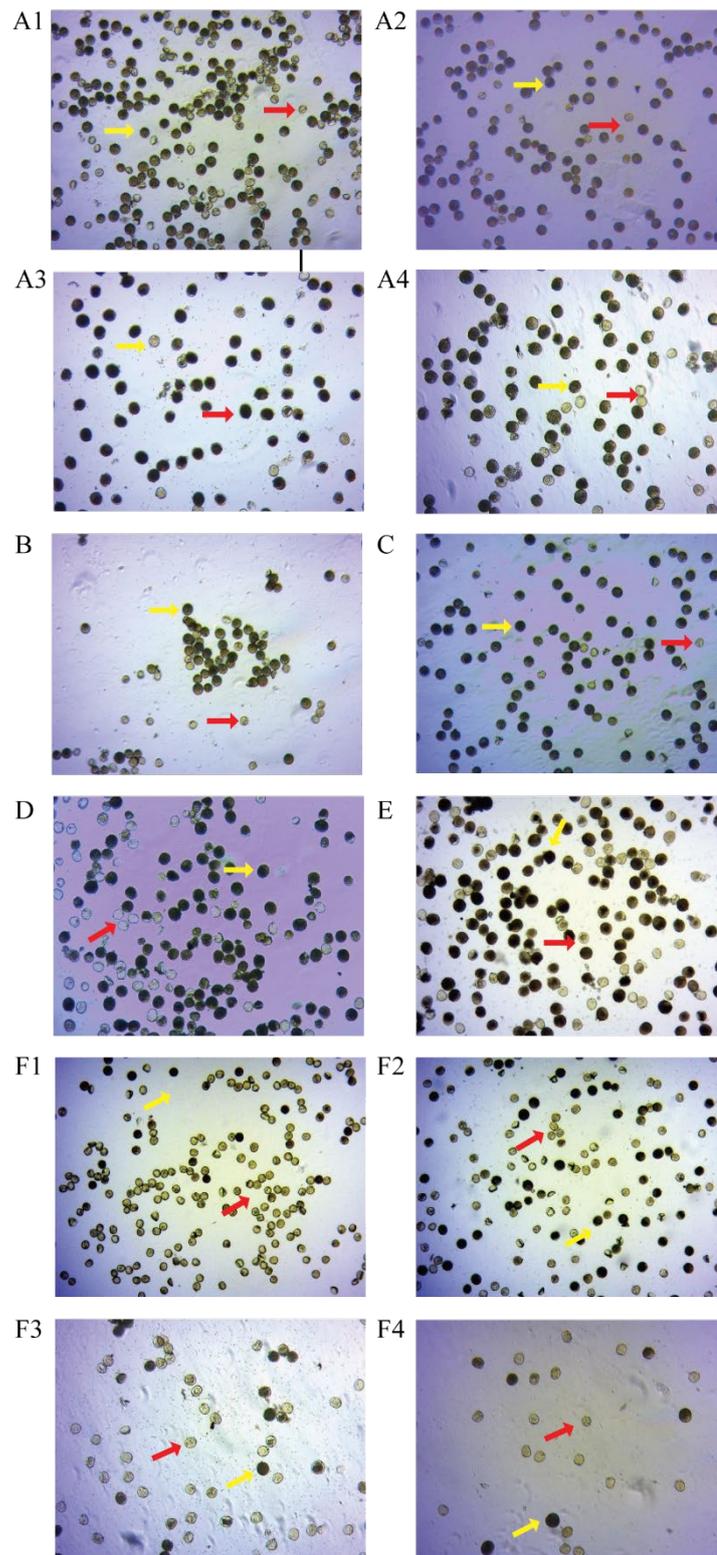


Figura 2. Grãos de pólen viáveis (seta amarela) e inviáveis (setas vermelhas), das testemunhas (A1: *P. malacophyllum* - BGP 6; A2: *P. malacophyllum* - BGP 293; A3: *P. atratum* - BGP 98; A4: *P. atratum* - BGP 308), dos melhores tratamentos da tabela 3 por genótipo: BGP 6 (B); BGP 293 (C); BGP 98 (D); BGP 308 (E) e do pólen sem desidratação (F1: BGP 6; F2: BGP: 293; F3: BGP 98; F4: BGP 308), após 12 meses de armazenamento. Fonte: autora.

Resultados semelhantes foram observados por Munhoz et al. (2008), que descobriram que a coloração com acetocarmina superestimou a viabilidade do pólen de mamão em relação ao cloreto de tetrazólio. Neste estudo, ficou evidente que o ensaio de viabilidade utilizando TTC foi mais confiável, pois os resultados obtidos com esse corante foram semelhantes aos obtidos no sistema de germinação *in vitro*, portanto é uma ferramenta confiável para estimar a viabilidade polínica de forma rápida e simples. As taxas de germinação *in vitro* e os resultados obtidos na análise colorimétrica estão diretamente relacionados (SCORZA & SHERMAN, 1995).

De acordo com Dinato et al. (2018), os grãos de pólen de *Paspalum notatum*, foram corados com TTC, após armazenados em nitrogênio líquido por 180 dias, de todos tratamentos utilizados pelos autores, os agentes de desidratação Cloreto de Lítio e Sílica gel apresentaram maior viabilidade de grãos corados no estudo, sendo 68,7% e 66,2% respectivamente, valores que foram estatisticamente semelhantes à testemunha (73,3%).

Apesar de ser um método simples, os resultados de coloração podem fornecer uma informação sub ou superestimada da viabilidade, pois possuem limitações, por isso faz-se necessário a comparação dos dados obtidos por coloração com outras técnicas. Pode-se optar pelo método de observação da capacidade germinativa do grão de pólen, visto que a germinação é um caráter que se correlaciona diretamente com a capacidade de fertilização (ALVIM, 2008). Esses testes têm sido empregados principalmente quando é necessário armazenar grãos de pólen com o objetivo de realização de cruzamentos controlados entre parentais com diferentes períodos de florescimento ou que se encontram em regiões distantes (TECHIO et al., 2006).

Nota-se a presença de umidades relativas bem estabelecidas nessas soluções saturadas. Define-se por umidade relativa fixa quando qualquer solução de sal a uma concentração definida e a uma temperatura constante estará em equilíbrio com uma pressão parcial de vapor de água fixa (YOUNG, 1967). Para determinar o teor de umidade de equilíbrio é preciso de um certo tempo de exposição dos grãos de pólen na solução saturada. Portanto, um método aceitável para a redução da umidade para fins de armazenamento é colocando o pólen tolerante a dessecação sobre uma solução saturada de sal com uma umidade relativa baixa por até 2 horas. A propósito, a extensão e a taxa de variação de umidade do pólen dependem do sal, o gradiente entre o teor de umidade do sal e do conteúdo de umidade do pólen e do tipo de pólen (CONNOR; TOWILL, 1993).

Para validar a porcentagem de umidade inicial e final dos grãos de pólen, deveria ter sido medida a umidade relativa das amostras, no entanto, devido a pequena quantidade de grãos de pólen disponível (< 0,05g), não obtivemos sucesso nessa estimativa.

Observa-se que para os dois agentes de desidratação estudados, os resultados são semelhantes, portanto, a escolha de qual dos dois tratamentos utilizar dependerá da disponibilidade dos agentes de desidratação e do tempo disponível para realizar o trabalho, além do custo da pesquisa, uma vez que a sílica gel tem menor custo que o cloreto de lítio. Dinato et al. (2018) obtiveram mesmo resultado para *Paspalum notatum*, os autores afirmaram que esses agentes de desidratação são eficazes para manter a viabilidade do pólen em nitrogênio líquido pelo período de 180 dias. Esses dados fazem supor que o mesmo aconteça para outras espécies de *Paspalum*.

Os resultados apresentados para até 365 dias de armazenamento, sugere que os grãos de pólen podem ser utilizados em banco de germoplasma de pólen, como conservação de recurso genético, uma vez que a viabilidade foi praticamente inalterada entre 1 e 365 dias de armazenamento, considerando os melhores agentes de desidratação: Silica gel por 120 minutos e Cloreto de Lítio por 30 minutos.

Cloreto de Lítio e Silica gel azul são relatados na literatura assim como outros sais como eficientes para desidratar e ajustar a umidade de grãos de pólen para armazenamento a baixas temperaturas (CONNOR e TOWILL, 1993; HANNA e TOWILL, 1995; TOWILL, 2002; ALMEIDA et al., 2011).

Esses resultados corroboram com outros autores, que afirmam que a criopreservação é uma alternativa segura de conservação de grãos de pólen, pois possibilita a exposição do material biológico às temperaturas negativas, o que paralisa as atividades do material vegetal, como divisão celular e reações metabólicas, permitindo o armazenamento por períodos indeterminados (ENGELMANN, 2004; BENSON et al., 1998; SARTOR et al., 2013; CHEN et al., 2011).

Reed et al. (2011) afirmam que diferentes tipos de biomateriais podem ser criopreservados com sucesso, como embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares, sementes, pólen, gemas laterais, cultura de células em suspensão em calos. Diferentes técnicas também podem ser utilizadas para a criopreservação, dependendo da espécie e do explante a ser criopreservado (PANIS e LAMBARDI, 2006).

De acordo com os estudos de Stanley e Linskens (1974), após o pólen ter sido armazenado, nenhum teste de viabilidade é satisfatório. Isso pode ser explicado uma vez que os testes químicos usam corantes que reagem com constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar. Outra razão que explica esse fato é que amostras de grãos de pólen que germinam bem *in vitro*, mas podem não produzir alongação suficiente do tubo polínico para efetuar a fertilização. Em contrapartida, amostras de

pólen que parecem não-viáveis quando testadas *in vitro*, podem produzir boa porcentagem de sementes *in vivo*, nesse caso, o pólen armazenado pode germinar diferentemente em amostragens repetidas ou em meios distintos.

Considera-se que o método do corante superestima a porcentagem de germinação do pólen, enquanto o teste *in vitro* a subestima (GALETTA, 1983). Dessa forma, realizamos também a análise de viabilidade do pólen por germinação *in vivo*.

2.2.2 Viabilidade de pólen por germinação *in vivo* via fluorescência (desenvolvimento do tubo polínico no estigma)

Os resultados de germinação *in vivo* mostraram que para todos os cruzamentos realizados, houve germinação do tubo polínico no estigma (Figura 3), nos cruzamentos em que *Paspalum urvillei* foi usado como genitor feminino, a germinação variou de 54,55% a 70,73% com grãos de pólen desidratados com cloreto de lítio e de 46,88% a 55,56% desidratado com sílica gel (Tabela 4).

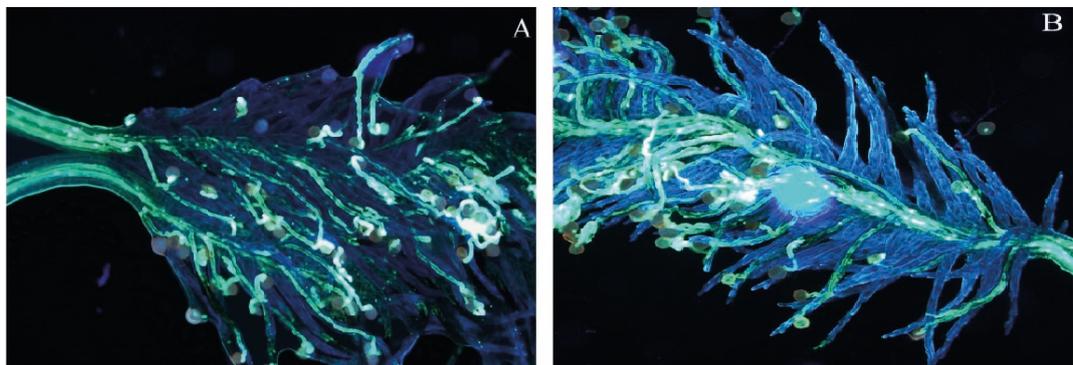


Figura 3. Germinação do tubo polínico no estigma após 5 horas de polinização com grão de pólen criopreservado. A: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215), B: *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 393). Imagem em microscópio óptico com filtro de fluorescência.

A taxa de germinação no cruzamento entre *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (293) variou de 0% a 54% (Tabela 4), considerando os dois agentes de desidratação. Observa-se que o pico de germinação para grãos de pólen desidratados com Cloreto de Lítio foi de 54,55% após 1 hora e 45 minutos de polinização e para grãos de pólen desidratados com sílica gel, o pico foi de 54,76%, após 2h e 45 minutos de polinização (Tabela 4 - negrito). A variação nos picos observada, está relacionada à quantidade de grãos de pólen que foi inicialmente depositada no estigma. A taxa de germinação no cruzamento entre *P. urvillei* (BGP 393) x *P.*

malacophyllum (BGP 6) variou de 0% a 70% (Tabela 4), o pico de germinação para grãos de pólen desidratados com Cloreto de Lítio foi de 67,90%, após 24 horas de germinação e para grãos de pólen desidratados com sílica gel, o pico foi de 70,73%, após 5 horas de polinização (Tabela 4 - negrito).

A taxa de germinação no cruzamento entre *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (215) variou de 10% a 57% (Tabela 4), o pico de germinação para grãos de pólen desidratados com Cloreto de Lítio foi de 57,89% e para grãos de pólen desidratados com sílica gel azul, o pico foi de 46,88% (Tabela 4 - negrito), porém o tubo polínico não atingiu a micrópila, dentro dessa amostragem. As tentativas de polinização nos cruzamentos, foram maiores que no teste *in vivo*. Apesar de não ter observado que o tubo polínico atingiu a micrópila, foi possível identificar híbridos nesse cruzamento.

Tabela 4 - Quantidade de grãos de pólen criopreservados de *P. malacophyllum* e *P. regnellii* germinados após polinização cruzada em *Paspalum urvillei*.

Cruzamento	Tratamento	Tempo de Polinização	Grãos de pólen observados	Grãos de pólen germinados	% Grãos germinados	Grãos de pólen no estilete	Grãos de pólen na micrópila	
<i>Paspalum urvillei</i> x <i>Paspalum malacophyllum</i> (BGP 293)	LiCl 30'	15'	11	5	45.45	0	0	
		45'	16	5	31.25	0	0	
		1h 15'	22	12	54.55	0	0	
		1h 45'	13	6	46.15	0	0	
		2h 15'	41	16	39.02	0	0	
		2h 45'	73	28	38.36	2	0	
		5 horas	25	11	44.00	0	0	
		6 horas	34	14	41.18	0	0	
		24 horas	39	8	20.51	0	0	
		Sílica 120'	15'	2	0	0.00	0	0
			45'	62	23	37.10	0	0
			1h 15'	15	3	20.00	0	0
	1h 45'		58	27	46.55	3	0	
	2h 15'		34	12	35.29	1	0	
	2h 45'		42	23	54.76	4	0	
	5 horas		30	3	10.00	1	0	
	6 horas		48	17	35.42	4	1	
	24 horas		59	18	30.51	0	0	

... Continuação da tabela 4

Cruzamento	Tratamento	Tempo de Polinização	Grãos de pólen observados	Grãos de pólen germinados	% Grãos germinados	Grãos de pólen no estilete	Grãos de pólen na micrópila	
<i>Paspalum urvillei</i> x <i>Paspalum malacophyllum</i> (BGP 6)	LiCl 30'	15'	6	0	0.00	0	0	
		45'	16	8	50.00	0	0	
		1h 15'	5	0	0.00	0	0	
		1h 45'	53	11	20.75	0	0	
		2h 15'	51	20	39.22	2	1	
		2h 45'	54	16	29.63	5	1	
		5 horas	82	58	70.73	2	1	
		6 horas	111	33	29.73	0	0	
		24 horas	32	5	15.63	0	0	
		Sílica 120'	15'	12	6	50.00	0	0
	45'		59	4	6.78	0	0	
	1h 15'		3	0	0.00	0	0	
	1h 45'		10	4	40.00	0	0	
	2h 15'		24	6	25.00	3	2	
	2h 45'		10	4	40.00	2	1	
	5 horas		9	5	55.56	0	0	
	6 horas		13	5	38.46	0	0	
	24 horas		81	55	67.90	0	0	
	<i>Paspalum urvillei</i> x <i>Paspalum regnellii</i> (BGP 215)		LiCl 30'	15'	17	3	17.65	0
		45'		13	4	30.77	0	0
1h 15'		19		11	57.89	0	0	
1h 45'		12		4	33.33	0	0	
2h 15'		44		11	25.00	0	0	
2h 45'		30		3	10.00	0	0	
5 horas		26		4	15.38	0	0	
6 horas		45		12	26.67	0	0	
24 horas		25		7	28.00	0	0	
Sílica 120'		15'		28	9	32.14	0	0
		45'	18	4	22.22	0	0	
		1h 15'	11	2	18.18	0	0	
		1h 45'	22	6	27.27	0	0	
		2h 15'	46	17	36.96	0	0	
		2h 45'	60	21	35.00	0	0	
		5 horas	51	19	37.25	0	0	
		6 horas	32	15	46.88	0	0	
		24 horas	24	5	20.83	0	0	

Em todos cruzamentos descritos na Tabela 4, foi possível observar que houve uma variação na taxa de porcentagem de grãos de pólen germinados em função do tempo de polinização, em alguns casos, quanto mais tempo após a polinização, menor foi o número de

pólen germinados, isso também foi observado nos trabalhos de BURSON (1987) e BURSON e YOUNG (1983), essa variação pode estar relacionada ao número de grãos de pólen durante as polinizações como também pelo número de grãos observados durante a elongação do tubo polínico.

Wang (2012) observou em cruzamentos de genótipos diferentes de *Paspalum vaginatum* Sw., que o grão de pólen foi capaz de aderir ao estigma papilar, hidratar, germinar, estender um tubo que entrou no estilo e, eventualmente, atingir a micrópila do óvulo, confirmando a viabilidade *in vivo* dos grãos de pólen utilizados no trabalho. Calose se formam periodicamente no tubo polínico enquanto ele cresce através do tecido estilar. Em conclusão, o pólen do SeaIsle 1 e SeaIsle 2000 é funcional *in vivo*, além disso ele inferiu que a coloração com azul de anilina pode fornecer mais informações além da viabilidade do pólen, como a compatibilidade pólen-pistilo, o vigor do pólen e até a morfologia do desenvolvimento do tubo polínico.

Burson e Young (1983), também fizeram estudos da viabilidade de grãos de pólen no estigma após polinizações, em seus estudos eles inferiram que na autopolinização de espécies de *Panicum* a germinação começou após 1h da polinização e obteve taxa de germinação de 90%, já observando o desenvolvimento dos tubos polínicos nos cruzamentos entre as espécies, eles relataram que a germinação variou de 77 a 88%, e que em alguns casos não houve crescimento do tubo no estilete e nenhum tubo polínico penetrou a micrópila, ainda houve perda da orientação do tubo polínico, muitos cresceram além da micrópila, foi a primeira vez que esse fenômeno foi observado em *Panicum* ou em outras espécies de gramíneas. No entanto, Heslop-Harrison (1982) mencionou que a perda de orientação do tubo com crescimento aleatório e falha dos tubos em localizar o micrópilo pode ser uma das causas da rejeição do tubo polínico, causando incompatibilidade cruzada nas gramíneas, isso pode explicar o fato de que em *Panicum* há falha na produção de híbridos.

Um outro relato encontrado na literatura, corresponde ao trabalho de Burson (1987), utilizando espécies de *Paspalum*, ele encontrou resultados parecidos com o trabalho de *Panicum*, no que diz respeito a alta taxa de germinação em auto- polinizações e taxas mais baixas em cruzamentos, porém, diferente do que ocorreu em *Panicum*, nos cruzamentos, o tubo polínico atingiu a micrópila, indicando que não há incompatibilidade cruzada entre as espécies de *Paspalum* estudadas por ele, apenas uma ressalva, foi que na autopolinização de *P. intermedium*, a maioria dos grãos de pólen não cresceram além do estigma e poucos penetram o estilete, esses achados indicam que a baixa produção de sementes autopolinizadas em *P. intermedium* é causada pela falha dos tubos polínicos em penetrar e crescer no estilo.

Aparentemente, existe um sistema de auto-incompatibilidade entre o tecido estilar e os tubos polínicos nessa espécie.

É possível observar nos resultados apresentados nesse trabalho que apenas para os cruzamentos com *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6 e BGP 293) o tubo polínico atingiu a micrópila, após 2 horas e 15 minutos de polinização para o cruzamento BGP 393 x BGP 6 e 6 horas para cruzamento BGP 393 x BGP 293 (Figura 4).

Esses resultados corroboram com os observados por HODNETT et al. (2005), que para *Sorghum bicolor* entre cruzamentos intraespecíficos, mais de 98% do pólen de *S. bicolor* BTx623 germinou quando colocado em estigmas de ATx623. Os tubos polínicos entraram rapidamente nos ramos do estigma e, dentro de 45 minutos após a polinização, cresceram para o estilete, respectivamente, mas não para o ovário, apenas após 1h da polinização, que os tubos atingiram o ovário.

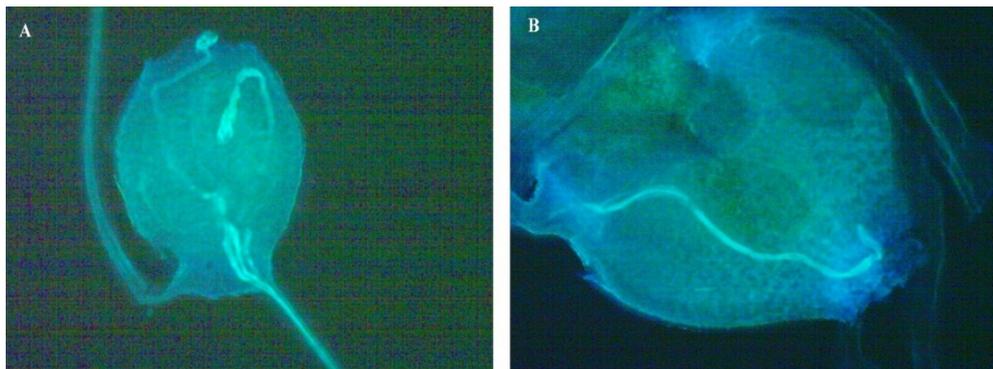


Figura 4. Desenvolvimento do tubo polínico no estigma até atingir a micrópila. A) Cruzamento entre BGP 393 x BGP 6 após 2 horas e 15 minutos de polinização, o tubo atinge a micrópila. B) Cruzamento entre BGP 393 x BGP 293, após 6 horas de polinização, o tubo polínico atinge a micrópila. Fonte: autora.

Wang et al. (2012), em estudos com *Nelumbo nucifera* Gaertn, observaram que nos cruzamentos realizados, alguns grãos de pólen germinaram dentro de 0,5 h após a polinização artificial. Após 4 horas de polinização, o número de germinação de pólen atingiu o pico, havendo em média 63 e 174,2 grãos de pólen germinados por estigma, porém ao fim de 12 horas de polinização, o número de grãos de pólen germinados caiu gradualmente para 13,8 e 7,4, para os dois genótipos estudados pelos autores.

O mesmo comportamento foi observado nos cruzamentos com *Paspalum*, após 24 horas de polinização, no cruzamento com BGP 393 x BGP 293, houve uma queda de grãos de pólen germinados que foram tratados com Cloreto de lítio, caiu de 14 para 8 (Tabela 4).

O número de grãos de pólen observados, foram aquém do esperado em comparação com o trabalho de Dinato et al. (2018), que utilizaram autofecundação em *Paspalum notatum*, isso pode ter ocorrido, pois provavelmente houve uma incompatibilidade entre os genitores, ou como relatado em outros trabalhos, há uma tendência na diminuição da germinação do grãos de pólen em cruzamentos comparado a auto-polinizações.

Se o pólen e o pistilo não conseguem se reconhecer normalmente, a maioria dos grãos de pólen pode falhar em germinar ou germinar de maneira anormal, mesmo que possuam uma viabilidade muito alta. Como consequência, a baixa receptividade do pistilo resultará em falha da fertilização e baixa fecundidade nos cruzamentos (WANG et al, 2012).

Observou-se que nos cruzamentos realizados entre o híbrido *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#37 x *P. atratum* (BGP 98), a taxa de germinação variou de aproximadamente 0,5% a 53% (Tabela 5), o pico de germinação para grãos de pólen desidratados com Cloreto de Lítio foi de 53,45% e para grãos de pólen desidratados com sílica gel, o pico foi de 37,50% (Tabela 5 - negrito), porém o tubo polínico não atingiu a micrópila, dentro dessa amostragem.

A quantidade de grãos de pólen depositadas no estigma também pode influenciar a eficiência da elongação do tubo polínico.

Já nos cruzamentos realizados entre o híbrido *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#37 x *P. atratum* (BGP 308), a taxa de germinação variou de aproximadamente 1,7% a 32% (Tabela 5), o pico de germinação para grãos de pólen desidratados com cloreto de lítio foi de 14,75% após 30 minutos de polinização e para grãos de pólen desidratados com sílica gel, o pico foi de 32,76% após 18 horas de polinização (Tabela 5 - negrito), porém o tubo polínico não atingiu a micrópila, dentro dessa amostragem. Apesar dessa taxa de germinação, para ambos os cruzamentos com 4PT a maioria das lâminas apresentavam grãos de pólen sem tubo polínico germinando conforme ilustrado na figura 5, isso se deve de ter ocorrido uma incompatibilidade entre os genitores, para apontar com certeza, outros testes deverão ser realizados.

Tabela 5 - Porcentagem de grãos de pólen germinados no estigma por cruzamento após período de polinização estimado entre 30 minutos e 24 horas.

Cruzamento	Tratamento	Tempo de Polinização	Grãos de pólen observados	Grãos de pólen germinados	% Grãos germinados	Grãos de pólen na micrópila
<i>P. plicatulum</i> 4PT x <i>P. guenoarum</i> cv. Azulão – planta F1#37 x <i>P. atratum</i> (BGP 98)	LiCl 30'	30'	20	4	20.00	0
		1h 30'	58	31	53.45	0
		3h	58	12	20.69	0
		18h	145	13	8.97	0
		24h	79	6	7.59	0
	Sílica 120'	30'	30	1	3.33	0
		1h 30'	48	18	37.50	0
		3h	54	14	25.93	0
		18h	42	10	23.81	0
		24h	210	1	0.48	0
<i>P. plicatulum</i> 4PT x <i>P. guenoarum</i> cv. Azulão – planta F1#37 x <i>P. atratum</i> (BGP 308)	LiCl 30'	30'	61	9	14.75	0
		1h 30'	60	7	11.67	0
		3h	65	9	13.85	0
		18h	147	10	6.80	0
		24h	130	14	10.77	0
	Sílica 120'	30'	64	12	18.75	0
		1h 30'	15	1	6.67	0
		3h	141	25	17.73	0
		18h	58	19	32.76	0
		24h	175	3	1.71	0

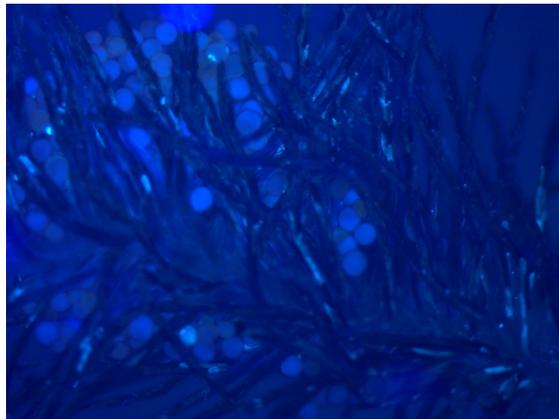


Figura 5. Grãos de pólen aderidos no estigma sem a germinação do tubo polínico, cruzamento realizado entre o híbrido *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#37 x *P. atratum* (BGP 308), após 3 horas de polinização. Imagem em microscópio óptico com filtro de fluorescência.

Sabe-se que o tubo polínico da angiosperma se comunica com o meio ambiente, permitindo que os tecidos reprodutivos maternos reconheçam e aceitem pólen compatível, a fim de evitar falhas na fertilização. A aceitação de pólen compatível e as etapas subsequentes

que levam à fertilização bem-sucedida compreendem processos complexos e cooperativos entre o pólen e o pistilo receptivo. Durante essa jornada, o tubo polínico de *Arabidopsis*, por exemplo, interage com pelo menos sete tipos diferentes de células de pistilo antes da chegada ao seu destino final dentro do óvulo (PALANIVELU e TSUKAMOTO, 2012). Para adicionar complexidade, existem outras camadas de reconhecimento. Isso inclui o auto-reconhecimento e processos especializados para impedir a auto-fertilização e a consequente consanguinidade, bem como barreiras interespecíficas, pouco conhecidas no nível molecular / celular (DRESSELHAUSA e TONG, 2013).

O pólen e o pistilo ao interagirem geram eventos na adesão, hidratação e germinação do pólen no estigma, possivelmente, a primeira dificuldade para o pólen em sua relação com o pistilo é a adesão física do grão de pólen às células papilares do estigma. Esse fato foi estudado principalmente nas Brassicaceae, que possuem um estigma "seco". Os resultados apontaram que polinizações entre *Brassica* spp. e *Arabidopsis thaliana* resultaram em baixa adesão ao pólen, enquanto cruzamentos interespecíficos entre várias outras espécies de Brassicaceae resultaram em altos níveis de adesão ao pólen, comprovado pela medida das forças adesivas do pólen (LUU et al., 1998; ZINKL et al., 1999), apontando algum nível de especificidade nas interações entre pólen e estigma na fase de adesão (DRESSELHAUSA e TONG, 2013).

Se a adesão ocorrer de forma satisfatória, o próximo passo é a hidratação do pólen para que a germinação ocorra. O estigma está diretamente relacionado a esse evento, uma vez que ele produz água e outros fatores necessários à hidratação. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nesse processo, Lush et al. (2000), Wolters-Arts (1998); Mayfield e Preuss, 2000; Mayfield et al., 2001, acreditavam que a hidratação do pólen era ocasionada por lipídeos de revestimento na membrana do pólen, porém, Samuel et al. (2009), em estudos com *Brassica napus* e *A. thaliana* identificaram uma proteína estigmática localizada na membrana plasmática, Exo70A1, em seus estudos, ele reduziu ou anulou a proteína nos cruzamentos, o que resultou em baixa hidratação do pólen e identificou com que EXo70A1 marcado com RFP, poderia resgatar essa hidratação defeituosa. Essa é provavelmente a primeira evidência de uma proteína envolvida na regulação das interações pólen-pistilo no estágio de hidratação do pólen (DRESSELHAUSA e TONG, 2013).

Após atingir o estilo, os tubos polínicos são induzidos pela matriz celular do estilete (ECM), que fornece sinais de orientação por quimiorreceptores para o tubo polínico atingir a micrópila e também nutrientes para o crescimento da região polar do tubo. Em Poaceae, cruzamentos interespecíficos (*Zea mays* x *Tripsacum dactyloides*) e cruzamentos intraespecíficos incompatíveis envolvendo os genótipos Ga1S e gal do milho resultaram na

desorientação do tecido transmissor e no crescimento insuficiente, mostrando a importância da existência desses quimiorreceptores de sinalização do trato transmissor nas gramíneas (LAUSSER et al., 2010).

Dentre os mecanismos de incompatibilidade pólen-pistilo, é possível identificar entre falhas no crescimento do tubo polínico, bem como a perda da orientação do tubo dentro do estilete até atingir a micrópila. Outra evidência é que os tubos polínicos permanecem mais curtos durante o mesmo período de tempo dos cruzamentos regulados, além disso, as extremidades são mais espessas, e, nesse caso, o crescimento do tubo polínico é interrompido ou retardado (KHO & BAER, 1968).

Foi observado em todos os cruzamentos realizados, que os grãos de pólen estavam aderidos no estigma e foram induzidos por mecanismos para o desenvolvimento do tubo polínico, uma vez que muitos grãos de pólen apresentavam tubo polínico de tamanho considerável germinando no estigma, porém, um número pequeno de grãos de pólen atingiram o ovário e a micrópila, isso pode ser explicado pelo fato de ter poucos grãos de pólen no estigma comparado com trabalho de Dinato et al. (2018) que realizou uma auto-polinização com *Paspalum notatum* e obtiveram porcentagem de germinação de 82% com pólen criopreservado, valor semelhante à testemunha (83%). Os resultados de germinação *in vivo* mostraram que para todos os cruzamentos realizados, houve germinação do tubo polínico no estigma, apesar disso, não foi observado em todos os cruzamentos que o tubo polínico atingiu a micrópila, a quantidade de grãos de pólen depositadas no estigma também pode influenciar a eficiência da alongação do tubo polínico.

2.2.3 Morfologia polínica

Durante as polinizações com *Paspalum atratum*, observou-se que os grãos de pólen apresentavam aspecto diferente dos demais, um pouco granuloso e pegajoso, com isso, resolvemos analisar a morfologia polínica dos acessos estudados nesse trabalho, bem como o acesso de *Paspalum notatum* (DINATO et al, 2018), a fim de inferir se a morfologia e uma possível ornamentação da exina poderiam influenciar a aderência do grão de pólen no estigma e aumentar ou diminuir a eficácia das polinizações.

Dentro do gênero *Paspalum* é comum encontrar uma pequena diversidade quanto ao tamanho e morfologia do grão de pólen. Em estudos recentes, Radaeski e Bauermann (2018) identificaram, pela técnica de acetólise proposta por Erdtman (1952), o diâmetro médio do grão de pólen de cinco espécies de *Paspalum*.

Observou-se que há pouca diferença entre os grãos de pólen estudados, os quais, no geral, apresentam-se mônades, de tamanho médio (25 - 50 μ m), com simetria radial, heteropolar, âmbito circular, prolato esférico, monoporado, poro circular, exina tectada com parede em forma de baculum (Tabela 6) (Figura 6).

Tabela 6 - Características morfométricas de grãos de pólen de acessos do gênero *Paspalum*

Genótipo / Espécie	Diâmetro Polar (DP)	Diâmetro Equatorial (DE)	Exina	DP/DE ₁	Forma ²
BGP 6 (<i>P. malacophyllum</i>)	29.01 \pm 1.96	24.37 \pm 2.37	1.58 \pm 0.18	1.10	Prolato - esferoidal
BGP 293 (<i>P. malacophyllum</i>)	39.32 \pm 1.50	37.38 \pm 1.51	1.50 \pm 0.16	1.05	Prolato - esferoidal
BGP 308 (<i>P. atratum</i>)	49.72 \pm 2.20	45.36 \pm 2.57	1.42 \pm 0.14	1.10	Prolato - esferoidal
BGP 98 (<i>P. atratum</i>)	50.15 \pm 1.47	45.79 \pm 1.84	1.40 \pm 0.15	1.10	Prolato - esferoidal
BGP 215 (<i>P. regnelli</i>)	44.48 \pm 1.04	41.27 \pm 1.02	1.50 \pm 0.12	1.08	Prolato - esferoidal
BGP 393 (<i>P. urvillei</i>)	36.37 \pm 1.65	32.83 \pm 1.24	1.54 \pm 0.10	1.11	Prolato - esferoidal
<i>P. notatum</i>	42.17 \pm 1.06	37.72 \pm 1.24	1.34 \pm 0.10	1.12	Prolato - esferoidal
F1#10 (<i>P. plicatulum</i> 4PT x <i>P. guenoarum</i> cv. Azulão)	45.65 \pm 1.01	39.79 \pm 1.14	1.59 \pm 0.10	1.15	Subprolato

n = 25 replicatas \pm desvio padrão. ¹ proporção entre diâmetro polar e diâmetro equatorial em vista equatorial.

² De acordo com a nomenclatura proposta por Salgado_Labouriau (1973).

De acordo com o esperado e encontrado na literatura (RADAESKI, et al., 2014; RADAESKI e BAUERMANN, 2018), os grãos de pólen da família Poaceae não apresentam ornamentação na exina (Figura 6), a morfologia da parede do pólen é importante para a sobrevivência e manutenção da integridade do grão de pólen, além do aumento de volume devido à hidratação, necessários para evitar a ruptura do pólen (VIDAL et al., 2016). Muitos mecanismos estruturais, fisiológicos e moleculares são utilizados pelos grãos de pólen para se ajustar às mudanças no teor de água e para manter a estabilidade interna (FIRON, NEPI & PACINI, 2012).

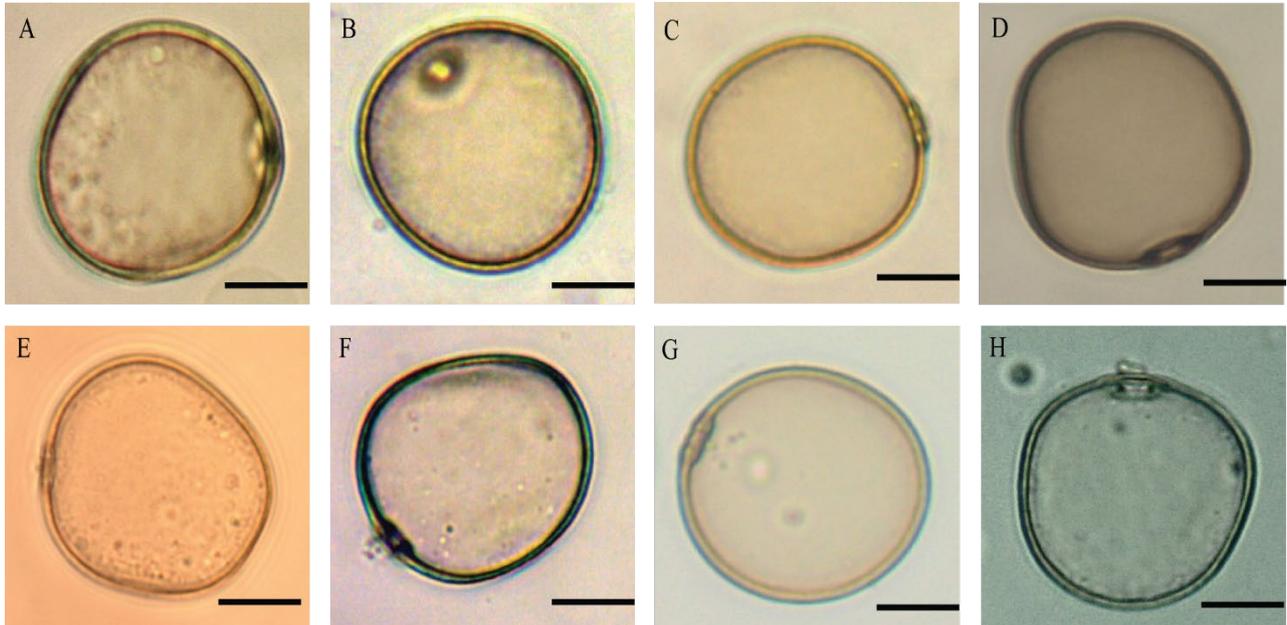


Figura 6. Visão polar e equatorial de grãos de pólen acetolisados de genótipos de *Paspalum*. A) *Paspalum malacophyllum* (BGP 6), B) *Paspalum malacophyllum* (BGP 293), C) *Paspalum regnellii* (BGP 215), D) *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão E) *Paspalum atratum* (BGP 98), F) *Paspalum atratum* (BGP 308), G) *Paspalum urvillei* (BGP 393), H) *Paspalum notatum*. Barras: 20 μ m. Imagens obtidas em microscopia de luz por acetólise lática. Fonte: autora.

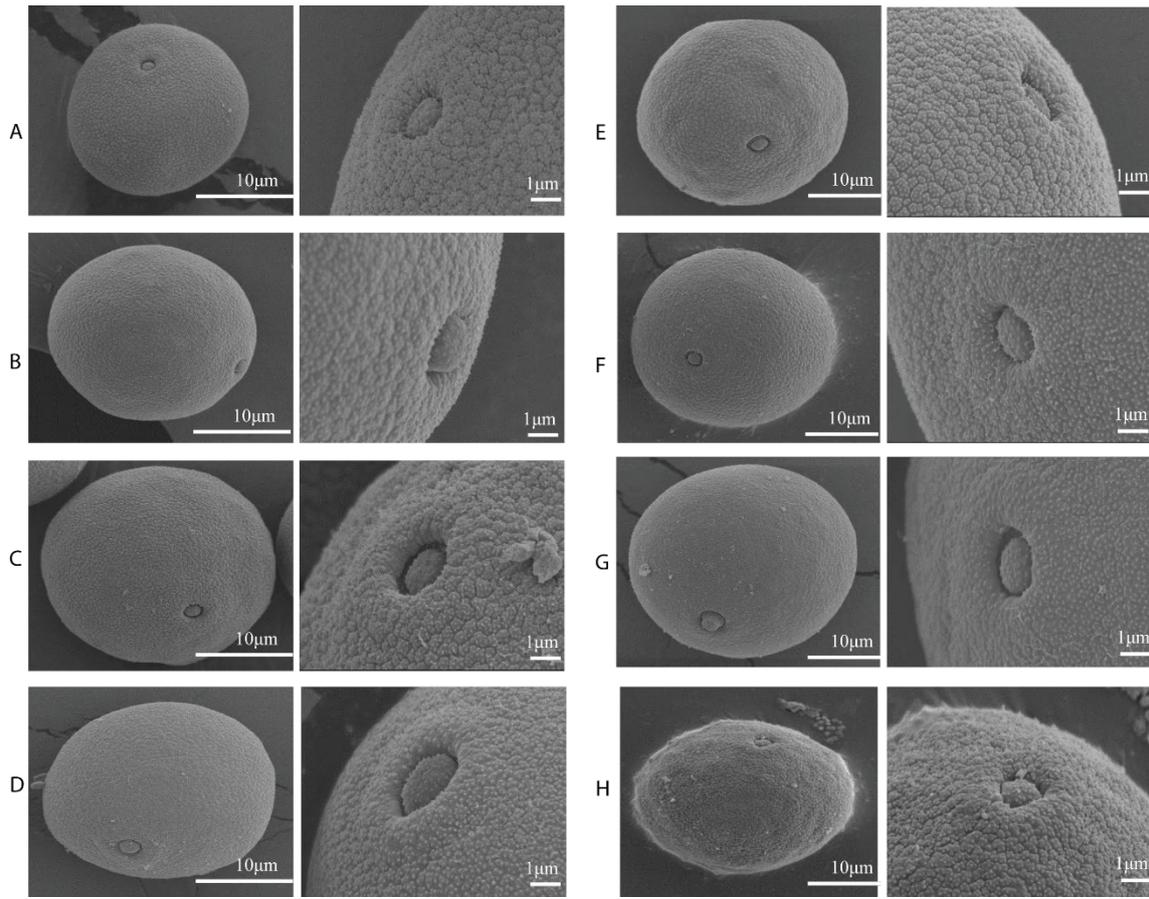


Figura 7. Grãos de pólen de *Paspalum* em MEV- aspecto geral do grão de pólen monosporado, mostrando opérculo. Exina com espínulos densamente dispostos. A) *Paspalum malacophyllum* (BGP 6), B) *Paspalum atratum* (BGP 98), C) *Paspalum regnellii* (BGP 215), D) *Paspalum notatum* E) *Paspalum malacophyllum* (BGP 293), F) *Paspalum atratum* (BGP 308), G) *Paspalum plicatum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão, H) *Paspalum urvillei* (BGP 393). Imagens obtidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Barras indicadas na figura. Fonte: autora.

As amostras foram submetidas às fotomicrografia em MEV (Figura 7), observou-se pouca diferença entre as amostras estudadas, exceto para *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F₁#10 que apresentou uma estrutura mais ovalada, o que condiz com a análise de acetólise, onde a razão entre o diâmetro polar e equatorial foi igual a 1,15. Esse dado, de acordo com a nomenclatura proposta por Salgado_Labouriau (1973), trata-se de um grão de pólen com forma subprolato, com corpo mais arredondado (Figura 7G).

2.3 CONCLUSÃO

A criopreservação é adequada para *Paspalum malacophyllum* e *Paspalum atratum* quando os grãos de pólen são desidratados com LiCl por 30 minutos e Sílica gel por 120 minutos, pois a viabilidade manteve-se estatisticamente igual ao pólen fresco.

A análise de germinação *in vivo* por microscopia de fluorescência mostrou que os grãos de pólen permaneceram viáveis após criopreservação, pois ocorreu efetiva germinação do tubo polínico no estigma, nos cruzamentos entre *Paspalum urvillei* x *Paspalum malacophyllum*, *Paspalum urvillei* x *Paspalum regnelli*, no cruzamento entre (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) - plantas F₁ #37 x *Paspalum atratum*, apesar do tubo polínico não ter chegado à micrópila, foi possível verificar a germinação no estigma.

Foi possível identificar pela análise de morfologia polínica, que para os acessos de *Paspalum atratum*, *Paspalum malacophyllum*, *Paspalum urvillei*, *Paspalum regnellii* e *Paspalum notatum*, os grãos de pólen podem ter forma de prolato-esferoidal e subprolato para (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) - plantas F₁ #10 x *Paspalum atratum*. A caracterização morfométrica dos grãos de pólen mostra que grãos de pólen de *Paspalum* tem pouca diferença entre as espécies analisadas bem como comparados com dados da literatura. Não apresenta ornamentação na exina e difere no tamanho.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; VAN STADEN, J. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 132-139, 2012.

ACUÑA, C. A., et al. Reproductive Systems in *Paspalum*: Relevance for Germplasm Collection and Conservation, Breeding Techniques, and Adoption of Released Cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

AKIHAMA, T.; OMURA, M.; KOSAKI, I. Long-term of fruit tree pollen and its application in breeding. **Tropical Agriculture Research**, v.13, n.4, p.238-241, 1979.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**. v. 55, p. 13-18. 1980.

ALMEIDA, C. et al. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 493-497, 2011.

- ALVIM, P. de O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 1992. 298p.
- BARNABÁS, B.; RAJKI, E. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at – 196°C in liquid nitrogen. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 747-752, 1976.
- BARRETO, I. L. **O Gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258 f. Tese (Livre Docência em Fitotecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1974.
- BENSON, E. E.; LYNCH, P. T.; STACEY, G. N. Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. **AgBiotech News and Information (United Kingdom)**, 1998.
- BOLAT, Ý.; PIRLAK, L. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. **Turkish Journal of Agriculture Forestry**, Ankara, v.23, p.383-388, 1999.
- BULAT, H. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Copenhagen, v. 26, p. 686-696, 1961.
- BURSON, B. L.; YOUNG, B. A. Pollen-pistil interactions and interspecific-incompatibility among *Panicum antidotale*, *P. coloratum*, and *P. deustum*. **Euphytica**, v. 32, n. 2, p. 397-405, 1983.
- CHEN, W., et al. Male Sterile2 encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 157, n. 2, p. 842-853, 2011.
- CONNOR, F. K.; TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, Wageningen, v. 68; p. 77-84, 1993.
- COOK, S. A.; STANLEY, R. G. Tetrazolium chloride indicator of pine pollen germinability. **Silvae Genetica** 9, Heft 5, p. 121-148, 1960.
- CORRÊA, A. M. S. et al. Flora polínica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). Família 176 – Poaceae (Gramineae). **Hoehnea**, v. 32, n. 2p. 269-282, 2005.
- DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: IRL Press Ltd, 1992. 250p.
- DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. **Practical pollination biology**. Enviroquest Ltd., Ontario., 2005. 590 p.
- DIAMANTINO, M. S. A. S. et al. Morphology and viability of castor bean genotypes pollen grains. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 77-83, 2016.
- DINATO, N. B. et al. Storage of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) pollen at different temperatures. **Crop Science**, v. 58, pp.1-8, 2018.

- DOS SANTOS, B. N. V., et al. Protocolo de viabilidade de grãos de pólen de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) baseado em distintos métodos de coloração e 2,3,5 cloreto de trifênil tetrazólio – TTC . **Revista de ciências agroambientais**, v. 16, n. 2, p. 134-138, 2019.
- DRESSELHAUS, T.; FRANKLIN-TONG, N. Male–female crosstalk during pollen germination, tube growth and guidance, and double fertilization. **Molecular plant**, v. 6, n. 4, p. 1018-1036, 2013.
- DUMAS, C.; KNOX, R. B. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, n.1, p. 1-10, 1983.
- ENGELMANN, Florent. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.
- ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy. **New York**, p. 6-24, 1952.
- Firon, N.; Nepi, M.; Pacini, E. Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. **Annals of Botany**, v. 109, n. 7, p. 1201-1214, 2012.
- FERREIRA, C. A. et al. Conservação e determinação da viabilidade de grão de pólen de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n. 2, p. 159-173, 2007.
- GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N., JANIK, J. eds. **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University, v.1, p. 23–47, 1983.
- GADŽE, J.; RADUNIIC, M.; PETRIC, I. V.; ERCISLI, S. In vitro pollen viability, germination and pollen tube growth in some pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars from Croatia and Bosnia and Herzegovina. **Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus**, v. 10, n. 3, p. 297-305, 2011.
- GÖKBAYRAK, Z.; ENGIN, H. Effects of brassinosteroids and gibberellic acids applied in vitro conditions on pollen viability and germination of some grape cultivars. In: **VII International Scientific Agriculture Symposium, "Agrosym 2016", 6-9 October 2016, Jahorina, Bosnia and Herzegovina. Proceedings**. University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture, 2016. p. 562-567.
- HANNA, W. W.; Towill, L. E. Long-term pollen storage. **Plant Breeding Rev** v. 13, p. 179-207, 1995.
- HESSE, M. et al. **Pollen terminology: an illustrated handbook**. New York, Springer, 2009, 264p.
- HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, v. 93, n. 3, p. 295-301, 2004.
- Karnovsky, M. J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol**, v. 27, p. 137– 139, 1965.

- KWAN, S.C.; HAMSON, A.R.; CAMPBELL, W.F. Storage conditions for *Allium cepa* L., pollen. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.94, n.6, p.569-570, 1969.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. University press of Colorado, Niwot, 1993, 583 p.
- KHO, Y. O.; BAER, J. Observing pollen tubes by means of fluorescence. **Euphytica**, Wageningen, v. 17, n. 2, p. 298-302, 1968.
- LAUSSER, A.; DRESSELHAUS, T. Sporophytic control of pollen tube growth and guidance in grasses. **Biochem Soc Trans** 1, v. 38, n. 2, p. 631–634, Abril, 2010.
- LINSKENS, H. F.; ESSER, K. L. Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und remdung. **Naturwissenschaften**, v. 44, n. 1, p. 16-16, 1957.
- LINSKENS, H.F.; CRESTI, M. The effect of temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers. **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie an Wet**, v.91, p.369-375, 1988.
- LUU, D. T.; PASSELEQUE E., DUMAS C., HEIZMANN P. Pollen-stigma capture is not species discriminant within the Brassicaceae family. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 321, n. 9, p. 747-755, 1998.
- LUSH, W. M.; SPURCK, T.; JOOSTEN, R. Pollen tube guidance by the pistil of a solanaceous plant. **Annals of Botany**, v. 85, n. suppl_1, p. 39-47, 2000.
- MATAMORO-VIDAL, A., et al. Links between morphology and function of the pollen wall: an experimental approach. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 180, n. 4, p. 478-490, 2016.
- MAYFIELD, J. A.; PREUSS, D. Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 128, 2000.
- MAYFIELD, J. A.; FIEBIG, A.; JOHNSTONE, S. E.; PREUSS, D. Gene families from the Arabidopsis thaliana pollen coat proteome. **Science**, v. 292, n. 5526, p. 2482-2485, 2001.
- MARTIN, F. W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. **Stain technology**, v. 34, p. 125-128, 1959.
- McGUIRE, D.C. Storage of tomato pollen. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.60, p.419-424, 1952.
- MENCK, A. L. M.; ODA, S.; MARCHI, E. L.; KOVALSKI, M. E. Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de *Eucalyptus* spp. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 43/44, p. 20-23, 1990.
- MOORE, R.P. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: HEYDECKER, W. ed. **Seed ecology**. London: Butterworth, 1973. p.347-366.

MORRONE, O. et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. **Annals of Botany**, v. 72, n. 6, p. 527-536, 1993.

NOVO, P. E. et al. Hybridization and heterosis in the Plicatula group of *Paspalum*. **Euphytica**, v. 213, n. 8, 2017.

ORTIZ, Juan Pablo A. et al. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 767-787, 2013.

PALANIVELU, R.; TSUKAMOTO, T. Pathfinding in angiosperm reproduction: pollen tube guidance by pistils ensures successful double fertilization. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 96-113, 2012.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. FAO, Rome, 2006, p. 61-78.

Paspalum in: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 28 Out. 2019.

PICCININI, F. et al. Pollen viability of *Eragrostis plana* genotypes from different geographic populations in Rio Grande do Sul. **Embrapa Pecuária Sul-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

PUNT, W. et al. A. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of palaeobotany and palynology**, v. 143, n. 1-2, p. 1-81, 2007.

RADAESKI, J. N. et al. Diversidade de grãos de pólen e esporos dos Campos do sul do Brasil: descrições morfológicas e implicações paleoecológicas. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 69, n. 1, p. 107-132, 2014.

RADAESKI, J. N.; BAUERMANN, S. G. Poaceae pollen grains from southern Brazilian grasslands: Pollen grain size in species from dry and humid environments. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 13, n. 2, p. 111-123, 2018.

RAYNAL, A.; RAYNAL, J. Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. **Adansonia**, v.2, n.11, p.77-79, 1979.

REED, B. M., et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 1-4, 2011.

RUGGIERO, C. et al. **Maracuja para exportacao: aspectos tecnicos para producao**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996.

- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 12, (Esp.), p. 70-84, 2000.
- SAMUEL, M. A. et al. Cellular pathways regulating responses to compatible and self-incompatible pollen in Brassica and Arabidopsis stigmas intersect at Exo70A1, a putative component of the exocyst complex. **The Plant Cell**, v. 21, n. 9, p. 2655-2671, 2009.
- SARTOR, M. E.; QUARIN, C. L.; ESPINOZA, F. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. **Crop Science**, v. 49, n. 4, p. 1270-1276, 2009.
- SARTOR, M. E. et al. Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. **Plant systematics and evolution**, v. 299, n. 7, p. 1295-1306, 2013.
- SAS Institute Inc. In: SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS 82 Institute Inc., 2004.
- SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. P. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding**, New York, p. 325-440, 1995.
- SHARMA, A. K; SHARMA, A. **Chromosome techniques**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1994. 367p.
- SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. Pollen biology. A laboratory manual. Berlin/New York: **Springer-Verlag**, Berlin/Heidelberg, 1992.
- SILVA FILHO, J. G. **Avaliação da temperatura e do período de armazenamento na conservação de grãos de pólen de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), visando a produção de sementes híbridas**. 2007. 32f. Monografia (Especialização em Biotecnologia vegetal) - Faculdade JK, Brasília, 2007.
- SOUSA, V. A. de. **Manejo e viabilidade do pólen de Eucalyptus spp.** 1988. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP., 1988.
- STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. E. **Pollen: Biology, Biochemistry, Management**. New York: Springer-Verlag, 1974.
- STONE J. L.; THOMSON J. D.; DENT-ACOSTA S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **Am J. Bot**, v. 82, p.1186–1197, 1995.
- STRAPASSON, E.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 373-381, 2000.
- Sun, Y., et al. Pollen tube growth in reciprocal interspecific pollinations of *Sorghum bicolor* and *S. versicolor*. **Plant Breed**, v. 107, p. 197– 202, 1991.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEDROZO, C. Â.; VANDER PEREIRAM A. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim elefante x milheto). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006.

TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. eds. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, volume 50, Berlin: Springer, 2002. p. 04-21.

WANG, Y. Li; GUAN, Z. Y.; CHEN, F. D.; FANG, W. M.; TENG, N. J. Pollen viability, pistil receptivity, and embryo development in hybridization of *Nelumbo nucifera* Gaertn. **The Scientific World Journal**, 2012.

WINSTON, E. W.; BATES, D. H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, v. 41, p. 232-237, 1960.

WOLTERS-ARTS, M. et al. Water-conducting properties of lipids during pollen hydration. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 4, p. 513-519, 2002.

YATES, I. E.; SPARKS, D.; CONNOR, K.; TOWILL, L. Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. **Journal of the American Society Horticultural Science**, v. 116, n. 3, p. 430-434, 1991.

YI, W., et al. Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). **Annals of Botany**, v. 97, n. 1, p. 57-63, 2006.

YOUNG, J. F. Humidity control in the laboratory using salt solutions—a review. **Journal of Applied Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 241-245, 1967.

ZINKL, G. M.; ZWIEBELI, B. I.; GRIER, D. G.; PREUSS, D. Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. **Development**, v. 126, n. 23, p. 5431-5440, 1999.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América Del Sur Austral** (Argentina, Bolivia, Sur Del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Missouri: Botanical Garden Press. 2005. 297 p.

Capítulo 3

**CRUZAMENTOS INTRA E INTERESPECÍFICOS ENTRE *Paspalum malacophyllum*,
Paspalum regnellii e *Paspalum urvillei* UTILIZANDO GRÃOS DE PÓLEN
CRIOPRESERVADOS**

Naiana Barbosa Dinato; Bianca Baccili Zanotto Vigna; Frederico de Pina Matta; Alessandra Pereira Fávero

Naiana Barbosa Dinato

Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos-SP, 13565-905, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6623-6396>

E-mail: nanadinato@hotmail.com

Bianca Baccili Zanotto Vigna

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0192-9877>

E-mail: bianca.vigna@embrapa.br

Frederico de Pina Matta

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3992-5831>

E-mail: frederico.matta@embrapa.br

Alessandra Pereira Fávero

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9461-1539>

E-mail: alessandra.favero@embrapa.br

Autor correspondente: Naiana Barbosa Dinato, nanadinato@hotmail.com, +55 (16) 99462-4334

RESUMO

Paspalum é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae, suas espécies estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais das américas e algumas podem ser encontradas na Ásia e África. No Brasil o gênero ocupa destaque por ter várias espécies nativas cobrindo pastagens naturais principalmente na região Sul do país. A grande variedade de espécies e variações morfológicas existentes entre elas, permite aos melhoristas cruzá-las a fim de obter progênies com características agronômicas de interesse em uma população de espécies originalmente nativas, porém, um dos problemas enfrentados pelos melhoristas é a assincronia de florescimento presente no gênero. Para isso, um dos possíveis desafios é a necessidade da sincronização de florescimento entre os genitores. A criopreservação de pólen pode superar esta situação de espécies com assincronia de florescimento. Este estudo visou realizar cruzamentos entre espécies que possuíam florescimento assíncrono e características de interesse para o melhoramento utilizando pólen criopreservado, confirmando assim sua viabilidade *in vivo*. Os grãos de pólen foram coletados em campo e em vasos na Embrapa Pecuária Sudeste e foram desidratados utilizando LiCl por 30' e sílica gel por 120' seguido da criopreservação. Os grãos de pólen ficaram armazenados em nitrogênio líquido por cerca de 12 meses, quando foram realizados os seguintes cruzamentos inter e intraespecíficos entre janeiro e abril de 2018: ((A) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); (B) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215); (C) 366_C 33 (*P. regnellii* / BGP 258 x *P. regnellii* / BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (D) 399_D 27 (*P. regnellii*/ BGP 215 x *P. malacophyllum* /BGP 293) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (E) 365_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215); (F) *P. regnelli* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215). Plantas utilizadas como genitores femininos foram emasculadas pela manhã em casa de vegetação e polinizadas com pólen criopreservado. As inflorescências polinizadas foram protegidas para evitar contaminações. Após um mês, coletaram-se as sementes. A não produção de sementes pode ocorrer quando: 1) o pólen não é viável, 2) a emasculação produziu danos fisiológicos nas espiguetas ou 3) houve uma incompatibilidade genética total ou parcial entre espécies. Foram polinizadas 1601 espiguetas que resultaram em 594 cariopses cheias (37,10%), as quais foram plantadas em sementeiras. Houve maior porcentagem de cariopses nos seguintes cruzamentos: BGP 393 x BGP 6 (41,14%); BGP 393 x BGP 293 (38,72%); BGP 393 x BGP215 (31,15%). Destas, 425 plântulas germinaram e foram posteriormente transplantadas em saquinhos de muda. Para confirmar o sucesso dos cruzamentos com o pólen criopreservado, todas as plântulas das progênies obtidas foram selecionadas fenotipicamente com o uso de descritores morfológicos, que foram descritos para *Paspalum* e, posteriormente, foi realizada a análise de marcadores microssatélites (SSR) e inter-microssatélites (ISSR). Marcadores moleculares foram selecionados na literatura com base nas espécies para os quais foram desenvolvidos e/ou avaliados. Observou-se que, dos sete marcadores ISSR testados, quatro conseguiram diferenciar os genitores de alguns cruzamentos (CT)₈-G, (AC)₈-T, (ATG)₅-GA e (GA)₈-C e dos 50 SSR, 16 diferenciaram os genitores dos cruzamentos realizados. Foram avaliados, pelo menos, quatro marcadores polimórficos para cada cruzamento, os quais confirmaram 68 híbridos no total. Verificou-se também que pelo menos um híbrido foi observado em cada combinação de genitores. Já nas observações morfológicas, não foi possível diferenciar a progênie com os descritores utilizados, muitas características eram semelhantes entre genitor masculino e feminino, mas em alguns cruzamentos foi possível perceber que os híbridos tinham características bem específicas do genitor masculino principalmente no cruzamento entre *P. urvillei* x *P. malacophyllum* (BGP 293). Com os resultados positivos de confirmação da

hibridação pelos marcadores moleculares, fica evidente que grãos de pólen desidratados com Sílica gel azul e com Cloreto de Lítio, armazenados em nitrogênio líquido, continuam viáveis após 10 meses de conservação e são capazes de gerar progênie híbrida entre genitores com florescimento assíncrono.

Palavras-chave: criopreservação; hibridação; microssatélite, intermicrossatélite

ABSTRACT

Paspalum is one of the most important genera of the Poaceae family, its species are distributed in tropical and subtropical regions of the Americas and some can be found in Asia and Africa. In Brazil, the genus occupies prominence for having several native species covering natural pastures mainly in the southern region of the country. The great variety of species and morphological variations existing between them, allows breeders to cross them in order to obtain progenies with agronomic characteristics of interest in a population of originally native species, however, one of the problems faced by breeders is the present flowering asynchrony in the genre. For this, one of the possible challenges is the need for flowering synchronization between parents. Pollen cryopreservation can overcome this situation of species with flowering asynchrony. This study aimed to perform crosses between species that had asynchronous flowering and characteristics of interest for breeding using cryopreserved pollen, thus confirming their in vivo viability. Pollen grains were collected in the field and in pots at Embrapa Pecuária Sudeste and were dehydrated using LiCl for 30 'and silica gel for 120' followed by cryopreservation. The pollen grains were stored in liquid nitrogen for about 12 months, when the following inter and intraspecific crosses were performed between January and April 2018: (A) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); (B) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215); (C) 366_C 33 (*P. regnellii* / BGP 258 x *P. regnellii* / BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (D) 399_D 27 (*P. regnellii*/ BGP 215 x *P. malacophyllum* /BGP 293) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (E) 365_C 33 (*P. regnellii*/ BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215); (F) *P. regnellii* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215). Plants used as female parents were emasculated in the morning in a greenhouse and pollinated with cryopreserved pollen. The pollinated inflorescences were protected to avoid contamination. After one month, the seeds were collected. Failure to produce seeds can occur when: 1) pollen is not viable, 2) emasculation produced physiological damage to the spikelets or 3) there was total or partial genetic incompatibility between species. 1601 spikelets were pollinated, resulting in 594 full karyopses (37.10%), which were planted in seedbed. There was a higher percentage of cariopses in the following crossings: BGP 393 x BGP 6 (41.14%); BGP 393 x BGP 293 (38.72%); BGP 393 x BGP215 (31.15%). Of these, 425 seedlings germinated and were later transplanted into seedling bags. To confirm the success of the crosses with the cryopreserved pollen, all the seedlings of the progenies obtained were selected phenotypically using morphological descriptors, which were described for *Paspalum* and, subsequently, the analysis of microsatellite markers (SSR) and inter-microsatellites was performed (ISSR). Molecular markers were selected in the literature based on the species for which they were developed and / or evaluated. It was observed that, of the seven ISSR markers tested, four managed to differentiate the parents of some crosses (CT)₈-G, (AC)₈-T, (ATG)₅-GA and (GA)₈-C and 50 SSR, 16 differentiated the parents from the crosses performed. At least four polymorphic markers were evaluated for each cross, which confirmed 68 hybrids in total. It was also found that at least one hybrid was observed in each combination of parents. In the morphological observations, it was not possible to differentiate the progeny with the descriptors used, many characteristics were similar between male and female parent, but in some crosses it was possible to notice that the hybrids had very specific characteristics of the male parent mainly at the crossing between *P. urvillei* x *P. malacophyllum* (BGP 293). With the positive results of confirmation of hybridization by molecular markers, it is evident that pollen grains dehydrated with blue silica gel and with lithium chloride, stored in liquid nitrogen, remain viable after 10 months of conservation and are capable of generating hybrid progeny.

Keywords: cryopreservation; hybridization; microsatellite, intermicrosatellite

3.0 INTRODUÇÃO

O gênero *Paspalum* é um dos mais importantes dentro da família Poaceae, devido principalmente ao seu valor ecológico, forrageiro, por apresentar diferentes sistemas reprodutivos e ploidias, como apomixia, aloploidia, autopoliploidia e hibridações nas espécies (ORTIZ et al., 2013). Possui ampla distribuição geográfica habitando, principalmente, regiões tropicais e subtropicais da América, com poucas espécies nativas da África e Ásia (ALISCIONI, 2002). O gênero foi descrito pela primeira vez por Linnaeus em sua obra *Systema Naturae* de 1759, e as características representadas nesse grupo incluem inflorescências em forma de racemo com espiguetas dispostas unilateralmente na ráquis solitárias ou emparelhadas, plano-convexas ou côncavo-convexas, gluma inferior geralmente ausente, gluma superior voltada para a ráquis e lema inferior herbáceo a membranoso, antécio inferior com pálea inferior geralmente ausente, antécio superior de consistência endurecida a membranácea (HATTERSLEY e WATSON, 1976; BROWN, 1977; ALISCIONI E DENHAM, 2008; ZULOAGA e MORRONE, 2005; RUA, 1997; DELFINI et al., 2017).

Vários estudos taxonômicos e moleculares vêm sendo realizados a fim de estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies. Estudos moleculares colocam *Paspalum* pertencente a tribo denominada Paspaleae, subtribo Paspalineae (MORRONE et al., 2012) juntamente com outros gêneros que compartilham um número cromossômico básico de $x = 10$ (ALISCIONI et al., 2003; QUARÍN, 1992; QUARIN e BURSON, 1991; ADAMOWSKI et al., 2005; MORRONE et al., 2006; POZZOBON et al., 2008; HOJSGAARD et al., 2009). Contudo, exceções foram relatadas na literatura, com espécies contendo $x = 6, 9$ e 16 (QUARÍN, 1974; PEÑALOZA et al., 2008; HONFI et al., 1990; POZZOBON et al., 2000). O número básico $x = 10$ é o estado plesiomórfico de *Paspalum*, enquanto números incomuns de cromossomos básicos seriam estados derivados originados pela fusão de cromossomos inteiros ou rearranjos cromossômicos (SOUZA-CHIES et al., 2006; SCATAGLINI et al., 2014).

De acordo com Morrone et al. (2012), o gênero é constituído por cerca de 310 espécies e foi reconhecido três subgêneros para *Paspalum*: *Anachyris* (Nees), *Ceresia* (Pers.) Rchb. e o subgênero típico *Paspalum* (ZULOAGA e MORRONE, 2005), que inclui várias categorias de acordo com os grupos informais propostos por Chase (1929). O subgênero *Paspalum* é o mais numeroso, com cerca de 300 espécies, enquanto que o *Anachyris* é o menos numeroso, com apenas seis espécies: *P. malacophyllum* Trin., *P. procurrens* Quarin, *P. simplex* Morong, *P. usterii* Hack., *P. volcanensis*, todas espécies perenes, e *P. costellatum* Sw., uma espécie anual (MORRONE et al., 2000). Análises filogenéticas parciais do gênero *Paspalum* mostraram que

o subgênero *Anachyris* é um grupo monofilético (RUA et al., 2010) que compartilha características morfológicas, citológicas e embriológicas definidas (HOJSSGAARD et al., 2008; MORRONE et al., 2000; URBANI et al., 2002).

As principais características morfológicas do subgênero *Anachyris* estão relacionadas às espiguetas: côncavo-convexas e em forma de barco, ambas as glumas suprimidas (raras com uma gluma superior rudimentar) e a superfície abaxial do lema superior com sulcos visivelmente longitudinais (CHASE, 1929; MORRONE et al., 2012).

A poliploidia é uma característica comum em *Paspalum*, estando presente em quase 80% das espécies (SCATAGLINI et al., 2014). A poliploidização é um evento comum em plantas e teve um papel importante na diversificação de espécies durante a evolução das angiospermas e representa o maior mecanismo de adaptação e especiação (RAMSEY e SCHEMSKE, 1998; ESTEP et al., 2014; MURAT et al., 2017).

Jiao e colaboradores (2011) propuseram que pelo menos dois eventos de poliploidização podem ter ocorrido nas monocotiledôneas divergentes, levando à diversificação das gramíneas. Como a poliploidização traz isolamento reprodutivo de progenitores diplóides, ela representa uma barreira ao fluxo gênico (HUSBAND e SABARA, 2004). Os poliplóides são classificados em autopoliplóides, originados pela duplicação de um mesmo genoma, e alopólíplóides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação. As consequências citogenéticas e genéticas dos diferentes tipos de poliploidização são diferentes. Nos autotetraplóides, por haver cópias iguais de um mesmo genoma, espera-se pareamento cromossômico em multivalentes (nas primeiras gerações) e herança polissômica, já em alotetraplóides, a existência de genomas diferentes levaria à formação de bivalentes e herança dissômica. Os alopólíplóides se comportariam semelhantemente aos diplóides, por possuírem uma cópia de genomas diferentes (SYBENGA, 1992; SCHIFINO-WITTMANN et al., 2004).

Paspalum é um gênero que exibe uma ampla gama de níveis de ploidia e sistemas reprodutivos em muitas espécies constituem complexos agâmicos com diferentes citótipos. Essas espécies frequentemente têm um citótipo diplóide ($2n = 2x = 20$) e um ou mais citótipos poliploides, geralmente um tetraploide ($2n = 4x = 40$). Ortiz et al. (2013) afirmam que *Paspalum urvillei* Steud. e *Paspalum regnellii* Mez. contém apenas citótipos sexuais tetraploides, enquanto *Paspalum malacophyllum* apresenta diploide sexual raro (HOJSSGAARD, 2008), tetraplóide sexual (BENNET e BASHAW, 1966; BASHAW et al., 1970), tetraplóide apomítico (BURSON e HUSSEY, 1998; HOJSSGAARD et al., 2008, 2013) e um caso raro de hexaplóide (GOULD, 1975). Os citótipos diplóides se

reproduzem sexualmente e geralmente, no grupo *Plicatula*, são auto-incompatíveis, mas podem ocorrer apomixia e sexualidade dentro da mesma espécie, enquanto os poliploides se reproduzem por apomixia, ou seja, possuem mais de dois conjuntos de cromossomos homólogos e uma reprodução na qual não ocorre fecundação e sim uma clonagem da semente, originando uma planta idêntica a planta-mãe (BURSON e QUARIN, 1992; NORMANN et al., 1994; HOJSGAARD et al., 2009; RUA et al., 2010; ORTIZ et al., 2013). Nesse sentido, a apomixia desempenha um papel importante tanto na restauração da fertilidade dos alopoliplóides (NOGLER, 1984; DARLINGTON, 1939) e na evolução de complexos agâmicos em autopoliplóides (de WET e HARLAN, 1970; QUARÍN e NORMANN, 1987; NORRMANN et al., 1989; QUARIN, 1992; SIENA et al., 2008; ORTIZ et al., 2013). A semelhança morfológica entre citótipos diplóides e tetraplóides em *Paspalum* e a presença de associações cromossômicas multivalentes na meiose são consistentes com a autopoliploidia, principalmente derivados da fertilização de gametas não reduzidos (FORBES e BURTON, 1961; CAPONIO e QUARÍN, 1987; NORMANN et al., 1989; HONFI et al., 1990; QUARÍN, 1992; QUARÍN et al., 1998; STEIN et al., 2004; HOJSGAARD et al., 2009).

Na natureza, esses complexos agâmicos podem definir uma variedade de populações em relação ao sistema genético de seus membros. Assim, é possível encontrar populações puras compostas exclusivamente de indivíduos com apenas um nível de ploidia, ou populações mistas, onde indivíduos com diferentes níveis de ploidia coexistem (HÖRANDL et al., 2008; SARTOR et al., 2013; HOJSGAARD et al., 2014).

Dentre os vários citótipos sexuais e/ou apomíticos disponíveis para uso em programas de melhoramento de *Paspalum*, algumas espécies tem se destacado principalmente pelo potencial forrageiro já conhecido. Além disso, espécies com citótipos tetraplóides sexuais são importantes para viabilizar cruzamentos neste nível de ploidia, permitindo a liberação da variabilidade existente em genótipos tetraploides apomíticos e gerando híbridos de interesse para o melhoramento. Além disso, permitem avaliar a viabilidade de grãos de pólen criopreservados, nesse contexto, as seguintes espécies foram selecionadas para esse estudo: *P. urvillei*, *P. regnellii* e *P. malacophyllum*.

P. urvillei apresenta, dentre outras características, crescimento vigoroso e cespitoso, formando touceiras densas com caule ereto, forrageira robusta, perene, colmos de 1 a 2m de comprimento, glabro, grosso na base; bainhas ascendentes, pilosas, verdes azuladas e com 8 a 27 cm de comprimento; folhas lineares pontiagudas com 12 a 55 cm de comprimento e 4 a 15 mm de largura, planas, com pilosidade na base; pendão floral possui de 0,6 a 2 m de comprimento, inflorescência com 10 a 40 cm de comprimento, com 6 a 25 racemos agrupados,

erectos, com 5 a 13 cm de comprimento; espiguetas pareadas, num total de 25, com cerca de 0,8 mm de largura, elíptica-ovalada, sub-aguda, com 2 a 3 mm de comprimento; lema fértil com 1,6 mm de comprimento (FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

Com longo período de florescimento (novembro a abril) e tetraplóide sexual com 40 cromossomos que paream como 20 bivalentes durante a meiose, considerado uma planta invasora, com grande capacidade de tolerar desfolhamento e solos pouco drenados e arenosos, podendo tolerar secas severas, não vegetando bem em áreas sombreadas. Forma densas populações ao longo de estradas florestais, trilhas e margens de canais, rodovias e áreas cultivadas, de baixa a média declividade, onde está dispersa no meio da vegetação nativa (MOTOOKA et al., 2003; FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

Não suporta bem o pastejo e tem pouca aceitação pelos animais principalmente devido à característica grosseira e áspera de suas folhas principalmente quando a planta se torna mais madura, comparada a outras espécies de *Paspalum*. Apesar disso, apresenta excelentes características forrageiras e vegeta em campos extremamente variados. Contudo é uma espécie promissora para forragicultura, pois estudos prévios demonstraram sua elevada produção de matéria seca, boa qualidade nutricional, fácil estabelecimento e tolerância a frio (KÖPP et al., 2015) quando jovem, potencial para fenação, boa capacidade de rebrota após a queima e resistência a ferrugem da folhas (*Claviceps paspali*), não apresentando problemas de doenças (FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

Nativa da América do Sul, e introduzida em muitas regiões quentes do mundo, está intimamente relacionado ao *dallisgrass* (*Paspalum dilatatum*) e, taxonomicamente, ambos são membros do grupo informal Dilatata, é caracterizada por anteras amarelas, espiguetas maiores que qualquer outra forma do mesmo grupo, numerosos nervos na gluma e lema estéril (CAPONIO e QUARIN, 1990; BURSON, 1992; EVERS e BURSON, 2004). Vários estudos já foram feitos utilizando *P. urvillei*, por ser, principalmente, uma boa doadora e receptora de grãos de pólen (CAPONIO e QUARIN, 1990; BURSON, 1992).

P. malacophyllum é uma gramínea de estação quente nativa da América do Sul; sua área de distribuição se estende da Argentina ao México, geralmente em savanas de montanha, encostas rochosas, falésias de até 1400 m, margens de floresta, estradas sendo encontrada do nível do mar a 3000 m de altitude (CHASE, 1929). A grama foi introduzida pela primeira vez nos Estados Unidos em 1921. Recebeu o nome comum de “*Paspalum* com nervuras” devido a saliências longitudinais proeminentes nos lemas estéreis de cada florete que dão à semente uma aparência com nervuras. Foi avaliado como gramínea forrageira em vários locais no sul dos Estados Unidos, e resultados preliminares indicaram que as espécies tinham potencial como

grama para feno e pastagem e que produziam uma abundância de sementes (STEPHENS, 1941). Testes adicionais revelaram que o capim não persistia sob desfolhamento próximo e que seria necessário um bom manejo de pastoreio para que o capim persistisse em um pasto. Foram relatados até 10 quadrivalentes em um acesso de 40 cromossomos, indicando autotetraploidia (BASHAW et al. 1970), porém acessos diplóides já foram descritos por Pozzobon et al (2008). *P. malacophyllum* tem resistência ao ergot (*Claviceps paspali* Stevens e Hall) sendo considerado uma fonte potencial de resistência a essa doença, e uma das formas para transferir os genes de resistência ao ergot a outras espécies de *Paspalum* envolve um amplo programa de hibridações (BURTON, 1943; BENNETT e BASHAW, 1966). Há relatos na literatura sobre entendimento da composição genômica de *P. malacophyllum* e sua relação com outras espécies de *Paspalum*. Há alguns trabalhos que envolvem a hibridação de acessos do biótipo tetraplóide *P. dilatatum* (IIJJ) e o diplóide *P. juergensii* Hackel. (JJ) (BURSON, 1983; BURSON e HUSSEY, 1998), e de *P. urvillei* (IIJJ) com *P. malacophyllum* (MMMM) (BENNETT e BASHAW, 1966) e *P. dilatatum* x *P. malacophyllum* (BURSON e HUSSEY, 1998). Devido a divergências morfológicas significativas, propôs-se que os diplóides, juntamente com um biótipo tetraplóide com lâminas de folhas excepcionalmente largas (V5095 – BGP 6), fossem segregados como uma nova espécie (ZILLI et al., 2014)

P. regnellii pertence ao grupo informal Virgata, apresenta dentre outras características forma quadrangular a piramidal de sua inflorescência e antécio fértil de cor castanho-clara (RIGHI GOMES, 1995). É uma gramínea nativa, perene, cespitosa, de rizomas curtos e altura até 100 cm ou um pouco mais; talos eretos, glabros com 3-5 nós pubescentes; inflorescências em panícula com 6-20 racemos de 6-10 cm. É encontrada em baixadas e banhados (ARAUJO, 1971), é uma espécie forrageira de verão com boa produção de sementes nessa estação, ideal para solos encharcados e com sombreamento, suas sementes não apresentam dormência, floresce de novembro a março, dependendo da região em que se encontra, e apresenta citótipo sexual tetraplóide (VARELLA et al., 2009, BARRO, 2011).

O melhoramento genético de plantas nativas pode contribuir para a alimentação de gado bovino, reduzindo o cultivo de espécies exóticas (PILLAR et al., 2009), contribuindo para a diversificação de cultivares e alcançar nichos que as espécies mais cultivadas atualmente não atingem.

De acordo com Valle et al. (2009), um programa de melhoramento de gramíneas forrageiras tropicais apomíticas compreende três atividades básicas: 1) a formação de populações segregantes, com combinações genéticas novas, 2) a avaliação da variabilidade gerada e seleção dos melhores indivíduos e famílias para novas combinações e 3) a

multiplicação, distribuição e utilização dos produtos do melhoramento com a finalidade de concretizar ganhos, sejam em produtividade ou eficiência.

O principal método de melhoramento genético utilizado para gramíneas tropicais forrageiras no Brasil até meados dos anos 2000 era a seleção a partir da variabilidade natural em coleções de germoplasma, introduzidas de seu ambiente de origem (VALLE et al., 2009). De acordo com Savidan et al. (1989), o melhoramento de espécies apomíticas necessita de plantas totalmente ou altamente sexuais para que se possam fazer cruzamentos e desta forma liberar a variabilidade genética sobre a qual o melhorista vai atuar. Uma vez que elas estão disponíveis, as espécies apomíticas são consideradas as ideais sob o ponto de vista do melhoramento, pois sua hibridação com plantas sexuais oferece a oportunidade de produzir novas combinações gênicas e permanentemente fixar uma progênie heterozigota para imediata avaliação como variedades F_1 potenciais que apresentam a conveniência da propagação por semente (ACUÑA et al., 2011). No caso de espécies apomíticas obrigatórias que não possuem fontes próximas conhecidas de sexualidade, o método de melhoramento permanece sendo a seleção entre os ecótipos variáveis ocorrentes na espécie (ASKER e JERLING, 1992). No caso de espécies tetraploides sexuais, essas podem ser usadas como genitores nos programas de melhoramento caso sejam autógamas (BORÉM e MIRANDA, 2017).

A distância genética entre os genitores parece afetar a eficiência da hibridação e a taxa de formação de híbridos na maioria das espécies de plantas. No entanto, esterilidade e baixo desempenho híbrido são comuns em cruzamentos envolvendo diferentes espécies. Supõe-se que a distância genética entre duas espécies deva ter um ponto crítico além do qual se torna uma restrição à cruzabilidade ou à fertilidade dos híbridos, caso sejam obtidos (NOVO et al, 2018).

Para identificar se uma hibridação ocorreu de forma satisfatória, pode-se usar métodos de avaliação fenotípica por meio de descritores morfológicos propostos para a espécie em estudo e/ou uso de marcadores moleculares.

O uso de seleção fenotípica de espécies ocorre há muito tempo, desde a existência dos grupos nômades, com a fixação das primeiras comunidades e o surgimento das revoluções verdes e a busca incessante por alimentos, o melhoramento de plantas com base na seleção de fenótipos passou a contribuir para a seleção de cultivares e híbridos mais ajustados tanto aos fatores biótico quanto abióticos. No entanto, é inevitável o uso de técnicas elaboradas de experimentação nas avaliações fenotípicas, fundamentalmente para caracteres de baixa herdabilidade (TOPPA e JADOSKI, 2013).

De acordo com dados relatados por Borém (1997), os marcadores morfológicos foram os pioneiros para favorecer a genética bem como o melhorando genético das plantas (SAX, 1923). No passado, utilizavam-se marcadores baseados em genes associados a caracteres morfológicos de fácil visualização, como nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala ou morfologia foliar (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Apesar dessa técnica ser de fácil monitoramento, existem espécies com grande variações, sendo difícil observar tais características, uma vez que a maioria dos caracteres morfológicos depende do desenvolvimento da planta e a interação genótipo – ambiente, onde a expressão gênica além de ser influenciada por fatores ambientais, ainda pode estar relacionada com fatores genéticos como dominância, pleiotropia e epistasia (SMITH & SMITH, 1992; PECCHIONI et al., 1996).

Diante essa dificuldade encontrada em selecionar indivíduos baseado principalmente nas características fenotípicas, foram desenvolvidas técnicas com o uso de marcadores de DNA, que possuem a capacidade de detectar a variação genética, e de analisar o genótipo de um indivíduo sem a necessidade da expressão fenotípica, excluindo assim a influência do ambiente (TOPPA e JADOSKI, 2013). Essa ferramenta tem sido muito usada no melhoramento genético de plantas, pois esta técnica baseada no nível de DNA, pode ser utilizada para estudos de diversidade genética, para fingerprinting de genótipos, mapeamento, identificação de híbridos e análise de genes (MILACH, 1998).

Dentre eles, os marcadores microssatélites, também chamados de SSR (*simple sequence repeats*), são regiões de DNA repetidas não codificantes compostas por pequenos motivos de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, que ocorrem como elementos repetitivos intercalados em todos os genomas de eucariotos (Tautz e Renz, 1984). Os SSR se destacam pela grande variação no número de repetições, que são resultados de eventos mutagênicos dinâmicos e complexos, por exemplo: crossing over desigual, retrotransposição e deslizamento de DNA polimerase (*slippage*) (Borém e Fritsche-Neto, 2013). Cidade e colaboradores (2009, 2010, 2013) desenvolveram marcadores do tipo microssatélites específicos para algumas espécies de *Paspalum*, e muitos já foram utilizados em estudos sobre relações genéticas e diversidade em *Paspalum* (Cidade et al., 2013).

Os marcadores moleculares proporcionam a caracterização genética de um alto número de genótipos através de procedimentos relativamente rápidos e simples. Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998). Dentre esses marcadores descritos estão os marcadores baseados em PCR. (*Polimerase Chain Reaction*) e consiste em uma técnica que amplifica fragmentos de DNA in vitro pela ação de uma enzima

de replicação. Os marcadores ISSR (*inter simple sequence repeat*) são outro tipo de marcador baseado em PCR que também tem sido bastante utilizado, por ser um marcador multialélico codominante e da fácil reprodutibilidade. Essa técnica consiste na amplificação de segmentos de DNA localizados entre duas regiões microssatélites e utiliza as sequências de microssatélite como *primer* único nas reações de PCR, possibilitando a amplificação de diferentes regiões entre dois SSR, ao mesmo tempo (ZIETKIEWICZ et al. 1994). Além disso, os ISSR usam *primers* universais, isto é, primers aleatórios na qual a sequência não depende da espécie estudada, esse fato torna a técnica mais acessível quando o trabalho envolve várias espécies.

O objetivo desse trabalho foi a realização de cruzamentos entre espécies com florescimento assíncrono e/ou com características de interesse para o melhoramento genético com uso de pólen criopreservado, confirmando assim sua viabilidade *in vivo* por meio do uso de análise fenotípica por meio de descritores morfológicos e marcadores moleculares do tipo microssatélite e intermicrossatélite.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Material Vegetal

Foram selecionados para este estudo dois genótipos de *P. malacophyllum* (2 e 3) e um de *P. regnellii* (4), descritos na tabela 7, para a criopreservação de pólen e sua utilização em cruzamentos como genitores masculinos graças as suas características de boa qualidade nutricional e boa produção de forragem respectivamente. Já como genitores femininos descritos da tabela 7, foram utilizados *P. urvillei* (1), *P. regnellii* (8), os híbridos F₁ 366_C33 (9) e 365_C33 (10) oriundos do cruzamento entre *P. regnellii* (BGP 258) e *P. regnellii* (BGP 397) e o híbrido F₁ 399_D27 (11) oriundo do cruzamento entre *P. regnellii* (BGP 215) e *P. malacophyllum* (BGP 293). Os híbridos de *P. regnellii* foram gerados pelo programa de melhoramento genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste.

Sementes dos acessos de *P. malacophyllum* (2 e 3) utilizados como genitores masculinos (doadores de pólen apomíticos) que estavam armazenadas em câmara fria foram cedidas pelo curador do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), localizado na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos – SP.

O plantio dos genitores masculinos foi realizado em sementeiras e 20 plântulas foram posteriormente transplantadas para saquinhos de mudas. Após três meses, essas plantas foram transplantadas para vasos redondos de dois litros (18x15 cm) e mantidas em casa de vegetação.

Após seis meses, as plantas foram transplantadas para vasos de oito litros (23 x 24cm) e mantidos em casa de vegetação. Os grãos de pólen do acesso BGP 215 (*P. regnellii*) foram obtidos diretamente na parcela do BAG (Banco Ativo de Germoplasma), pois o mesmo foi introduzido posteriormente no trabalho.

Tabela 7 - Características dos acessos utilizados como genitores nos cruzamentos intra e interespecíficos

Código	Espécie	Código do Coletor	Local	Grupo Informal Botânico	Modo de reprodução	Genona	Ploidia
BGP 393 (1)	<i>Paspalum urvillei</i> Steud.	Af 34	São Carlos /SP – BR	Dilatata	Sexual	IIJJ	Tetraplóide
BGP 258 (8)	<i>Paspalum regnellii</i> Mez	PM 1	Botucatu /SP – BR	Virgata	Sexual	RRSS	Tetraplóide
BGP 215 (2)	<i>Paspalum regnellii</i> Mez	Lr 2	Itirapina /SP – BR	Virgata	Sexual	RRSS	Tetraplóide
BGP 6 (3)	<i>Paspalum malacophyllum</i> Trin.	V Ss Si 5095	Itumbiara/GO – BR	Malacophyla	Apomítico	MMM M	Autotetraplóide
BGP 293 (4)	<i>Paspalum malacophyllum</i> Trin.	V 14606	Japorã /MS – BR	Malacophyla	Apomítico	MMM M	Autotetraplóide
366_C 33 (BGP 258 x BGP 397) (9)	<i>Paspalum regnellii</i> Mez	δ	-----	Virgata	Sexual	-----	-----
365_C 33 (BGP 258 x BGP 397) (10)	<i>Paspalum regnellii</i> Mez	δ	-----	Virgata	Sexual	-----	-----
399_D 27 (BGP 215 x BGP 293) (11)	<i>Paspalum regnellii</i> Mez x <i>Paspalum malacophyllum</i> Trin.	δ	-----	-----	Sexual	-----	-----

Código do coletor: Af (Alessandra Fávero); V (Valls); Lr (Af= Alessandra Pereira Fávero; V= José Francisco Montenegro Valls; Lr= Luis Alberto Rocha Batista; S= Charles S. Simpson.

δ material proveniente do programa de melhoramento genético de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste

O acesso de *P. urvillei* utilizado foi obtido de uma coleta na beira da Estrada Municipal Guilherme Scatena, próximo ao Parque Ecológico em São Carlos, SP. As mudas foram transplantadas para 20 saquinhos com terra adubada e colocadas em telado. Após seis meses, as plantas foram transplantadas para vasos de oito litros, com dimensões (cm): 23 x 24, e mantidos em casa de vegetação até o momento dos cruzamentos. Após três meses do plantio dos genitores femininos em vasos grandes, essas foram transplantadas em vasos menores para facilitar o transporte para dentro da câmara umidificadora (Figura 8) no momento das hibridações. Foram preparados 22 vasos com *P. urvillei* (1). As plantas dos híbridos de *P. regnellii* usadas como genitor feminino foram obtidas a partir de vasos do programa de melhoramento genético da Embrapa Pecuária Sudeste, foram usadas cada vaso que representava a planta híbrida, no caso do BGP 258, foi utilizado clones de plantas que foram anteriormente plantas com sementes provenientes do BAG.



Figura 8. Câmara com o umidificador instalado, na qual foram realizados os cruzamentos de *Paspalum*.

3.1.2 Cruzamentos intra e interespecíficos

A amostras de grãos de pólen que foram dessecados com solução salina saturada de Cloreto de lítio por 30 minutos e por sílica gel 120 minutos e criopreservadas por aproximadamente 12 meses, conforme protocolo descrito no Capítulo 2, foram retiradas do criotank e utilizadas em cruzamentos com genótipos sexuais de *Paspalum*. Foram realizados os seguintes cruzamentos entre janeiro e abril de 2018: (A) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. malacophyllum* (BGP 6; BGP 293); (B) *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215); (C) 366_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii*/BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (D) 399_D 27 (*P. regnellii*/BGP 215 x *P. malacophyllum*/BGP 293) x *P. malacophyllum* (BGP 293), (E) 365_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii*/BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215); (F) *P. regnellii* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215).

A técnica de cruzamentos consistiu em preparar os genitores femininos para cruzamento na tarde anterior, retirando as espiguetas do meio do racemo, deixando apenas as duas fileiras de espiguetas mais externas para facilitar a polinização. Em seguida, colocaram-se as plantas dentro da câmara úmida (Figura 8). Às quatro e meia da manhã, o umidificador de ar foi ligado automaticamente, permanecendo desta forma até às 9h. Aproximadamente entre 5:30 as 8:30h, as anteras dos acessos BGP 393; BGP 258 e híbridos 366_C33; 365_C33; 39_D27 já estavam expostas e foram retiradas com o auxílio de uma pinça. Logo em seguida, as plantas emasculadas foram retiradas da câmara e sob o estigma exposto foram pincelados grãos de pólen do genitor masculino criopreservados e descongelados adequadamente,

conforme descrito no item 2.1.3 do Capítulo 2. As inflorescências polinizadas foram protegidas com saquinhos de papel manteiga para evitar contaminações. A operação foi realizada vários dias seguidos, até que a antese ocorresse em todas as espiguetas da inflorescência e em todas as inflorescências de cada vaso.

3.1.3 Coleta de sementes e germinação

Após 28 dias da polinização, coletaram-se as sementes quando já estavam em queda natural, as quais foram secas ao sol por cinco dias e após foram armazenadas em saquinhos de papel dentro da câmara fria temperatura 10°C e umidade relativa 20%, por 4 meses. As espiguetas com cariopse foram separadas manualmente e contadas.

3.1.4 Identificação de híbridos de *Paspalum* spp. pelo uso de características morfológicas

As sementes dos possíveis híbridos foram colocadas para germinar em sementeiras e posteriormente transplantadas para saquinhos de muda, sempre em casa de vegetação.

Assim que se iniciou a germinação (após cinco dias do plantio), as plantas foram caracterizadas pelo uso de descritores morfológicos, ainda nas bandejas (sementeiras). Foram observados: altura de planta (AP), largura da folha (LF), comprimento da folha (CF), pelos no caule (PC), pelo na face abaxial da folha (Pab), pelo na face adaxial da folha (Pad), formato da borda da folha (BF), número de perfilhos (NP), número de folhas (NF). As análises inicialmente foram feitas a cada 15 dias, e quando a maioria das plantas já havia germinado, após 60 dias do plantio, essas foram transplantadas para saquinhos de muda e continuou-se analisando as características fenotípicas, porém, com um intervalo de 30 dias a cada observação. Após 120 dias do plantio das sementes, as mudas foram transplantadas para vasos e acrescentaram-se cinco descritores relacionados às inflorescências: quantidade de inflorescência (QI), cor da antera (CA), cor do estigma (CE), número de racemos (NR), pelos na espiguetas (PE).

As plantas foram analisadas até completar 150 dias após o plantio e foi feita uma seleção dos possíveis híbridos. Estes foram transplantados para vasos e separados das possíveis plantas autofecundadas. Foi realizada análise de componentes principais a fim de identificar os híbridos nas progênes, no software System Statistical Analysis (SAS INSTITUTE INC., 2004).

3.1.5 Confirmação de hibridação usando marcadores SSR e ISSR

Folhas das plantas das progênies e dos genitores foram coletadas para a realização da caracterização molecular no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Pecuária Sudeste.

A planta do genitor feminino foi coletada de cada vaso específico usado no cruzamento e, para o genitor masculino, foram coletadas amostras de quatro plantas diferentes, uma vez que não foi possível saber qual a planta exata foi a doadora de pólen. Apesar de ser um acesso apomítico, essa estratégia foi utilizada a fim de identificar uma possível variação alélica entre as plantas.

O DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico total foi isolado de folhas jovens usando o protocolo baseado em CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Doyle e Doyle (1987), com pequenas alterações. Aproximadamente 200 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana e transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionou-se 500 µL de tampão de extração (NaCl 700 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 2,0%, Beta-mercaptoetanol 2%) e incubou em banho-maria a 65°C por 40 minutos, invertendo os tubos suavemente a cada 10 minutos. Após a incubação, adicionaram-se às amostras 250 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) para a desproteinização. Os tubos foram invertidos, cuidadosamente, por 10 minutos e depois centrifugados a 6.000 rpm para separação das fases por 15 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 400 µL) de cada amostra foi transferido para novo tubo de 1,5 mL e para a precipitação do DNA, adicionou-se o mesmo volume de isopropanol gelado (mantido a -20 °C), aproximadamente 400 µL. Os tubos foram mantidos a -20 °C por pelo menos 30 minutos e em seguida centrifugados a 6.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugados por 15 minutos a 6000 rpm e o sobrenadante foi descartado após a centrifugação, e seco em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente foi feita a ressuspensão do DNA em 100 µL de água deionizada e então as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos com 1 µL de RNase (R6513 – 10mg - Sigma) para digestão do RNA contaminante. O DNA isolado foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

A concentração do DNA obtido foi determinada pelo uso de espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e sua qualidade verificada por eletroforese (100 V) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 10% e visualizado em seguida, expostos à luz ultravioleta e fotografados no fotodocumentador Bio-Rad Gel DocTM XR⁺. Para amplificação, as amostras tiveram suas concentrações padronizadas em 10 ng/µL, através de diluições em água milliQ.

Marcadores microssatélites específicos para espécies do grupo *Plicatula* (CIDADE et al., 2010, 2013; OLIVEIRA et. al., 2016), do grupo *Virgata* (Cidade et al., 2009) e do grupo *Dilatata* (SPERANZA e MALOSETTI, 2007) foram avaliados nos oito genitores dos cruzamentos para seleção de marcadores polimórficos para cada combinação de genitores (Tabela 9). As reações de PCR dos marcadores SSR foram conduzidas em placas de 96 poços e configurada em um volume final de 25 μ L com 12,5 μ L de Master Mix Red 2X (Ampliqon, Dinamarca) que continha 75 mM Tris-HCl pH 8,5, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,1% Tween® 20, 0,2 mM dNTPs, 1,2 U de DNA polimerase Ampliqon Taq, (0,8 μ M) de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 50 ng de DNA molde e água Milli-Q autoclavada q.s.p. A amplificação por PCR foi realizado por 3 minutos a 95° C, 35 ciclos de 30 segundos à 94° C, 30 segundos na temperatura específica do primer, 1 min a 72°C, mais 5 minutos a 72°C, exceto para os marcadores Pdf1 8 e Pdf1 18 (SPERANZA e MALOSETTI, 2007), que foi usado protocolo de PCR igual aos demais marcadores do capítulo 3 e a amplificação por PCR foi realizado por 5 minutos a 94° C, 40 ciclos de 15 segundos à 94° C, 3 minutos na temperatura específica do primer, 1 min a 72°C, mais 5 minutos a 72°C.

Os produtos das amplificações foram resolvidos inicialmente em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo para confirmação da amplificação e posteriormente em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001) para genotipagem dos alelos.

Os marcadores ISSR foram escolhidos a partir de trabalhos da literatura que utilizaram esse tipo de marcador em *Paspalum* ou outras gramíneas (CIDADE et al., 2008; BRUGNOLI et al., 2013; USANDIZAGA et al., 2015) (Tabela 9). As reações de PCR dos marcadores ISSR foram conduzidas em placas de 96 poços e configurada em um volume final de 24,5 μ L com Master Mix Red 2X (Ampliqon, Dinamarca) que continha 75 mM Tris-HCl pH 8,5, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,1% Tween® 20, 0,2 mM dNTPs, 1,2 U de DNA polimerase Ampliqon Taq, 0,8 μ M de cada primer, 30ng DNA molde e água Milli-Q autoclavada q.s.p.. A amplificação por PCR foi realizado por 5 minutos a 94° C, 40 ciclos de 1 minuto à 94° C, 45 segundos na temperatura específica do primer, 2 minutos a 72°C mais 5 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação dos marcadores ISSR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo 2%, a 100 Volts por aproximadamente quatro horas, em seguida, expostos à luz ultravioleta e fotografados no fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc™ XR⁺.

As distâncias genéticas entre os genitores usados nos diferentes cruzamentos foram determinadas usando marcadores microssatélite e intermicrossatélite. Os marcadores foram

considerados como dominantes considerando a presença e a ausência de bandas (1 e 0), que gerou uma matriz binária. Foi estimado o coeficiente de similaridade de Jaccard (S) (CRUZ et al., 2011) utilizando o software NTSYSpc versão 2.1 (ROHLF, 2000).

Os marcadores polimórficos para cada cruzamento foram, então, genotipados nas respectivas famílias, tendo sido avaliados de quatro a oito locos polimórficos para cada família. A genotipagem para ambos os tipos de marcadores foi realizada de acordo com a presença ou ausência de bandas nos indivíduos, dada a poliploidia das amostras. Foram considerados híbridos aqueles indivíduos das progênes que apresentaram uma banda oriunda do genitor masculino que não estava presente no genitor feminino, nos locos polimórficos avaliados.

A taxa de formação de híbridos foi calculada, considerando o número de confirmação de híbridos molecularmente pelo número de polinizações efetivadas.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram polinizadas 1677 espiguetas que resultaram em 644 cariopses, gerando uma taxa de cariopses formadas de 38,4%. A cruzabilidade de duas espécies é calculada como a porcentagem de floretes emasculados e polinizados manualmente, produzindo uma cariopse viável (Bennet e Bashaw, 1966). Houve maior porcentagem de cariopses nos seguintes cruzamentos: BGP 393 x BGP 6 (43,19%); BGP 393 x BGP 293 (43,32%); BGP 393 x BGP 215 (43,40%) (Tabela 8).

Alguns autores não consideram a taxa de cruzabilidade como proposto por Bennet e Bashaw (1966), e sim sendo a taxa de formação de híbridos pelo número de polinizações, considerando a taxa de cariopses obtidas como porcentagem de sucesso, os dados obtidos nesse trabalho corroboram com os de Burson e Bennett (1976) que obtiveram taxa de sucesso de 57% para cruzamento entre *P. dilatatum* x *P. conspersum* e 30,16% no cruzamento entre *P. conspersum* x *P. malacophyllum*. É importante ressaltar que *P. conspersum* também é uma espécie do Grupo Virgata e com morfologia parecida com *P. regnellii*, sendo que, muitas vezes, a identificação taxonômica destas espécies é confundida. Entre combinações das espécies *P. pubiflorum* x *P. dilatatum*, *P. dilatatum* x *P. platyphyllum*, *P. urvillei* x *P. dilatatum*, *P. urvillei* x *P. malacophyllum*, Bennet e Bashaw (1966) obtiveram uma taxa de cruzabilidade de 0.05 a 0.2%.

Se formos considerar a taxa de formação de híbridos, os resultados indicaram que no cruzamento entre *P. urvillei* x *P. malacophyllum* (BGP 6), a taxa de cruzabilidade foi de 1,95% para grãos de pólen tratados com Sílica gel e 3,28% com grãos de pólen desidratados com

Cloreto de Lítio, no cruzamento entre *P. urvillei* x *P. malacophyllum* (BGP 293), a taxa de cruzabilidade foi de 5,07% para tratamento com Silica gel e 2,85% para grãos de pólen tratados com Cloreto de Lítio, no cruzamento entre *P. urvillei* x *P. regnellii* (BGP 215), a taxa foi de 5,66% para Silica gel e 6,80% para Cloreto de Lítio. No cruzamento entre o híbrido 366_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293), a taxa foi de 0,82% (Tabela 8).

Esses resultados corroboram com os observados por outros autores envolvendo espécies de *Paspalum*. Caponio e Quarin (1990) observaram uma taxa de cruzabilidade de 1,2% no cruzamento entre *P. dilatatum* x *P. urvillei*. Já Burson (1992), utilizando dois biotipos diferentes de *Paspalum dilatatum* com *Paspalum urvillei*, obteve porcentagem de cruzabilidade de 13,70% e 10,15% para biotipo Uruguaiano e Uruguaiano, respectivamente.

Para se ter sucesso em programas de melhoramento genético de plantas, é necessário dentre outras informações, conhecer a diversidade genética das espécies, bem como o número de cromossomos, a incompatibilidade interespecífica e o comportamento cromossômico, que podem ser verificados através de técnicas moleculares, e evidências citogenéticas como a análise do cariótipo, taxa de cruzabilidade, viabilidade do híbrido e pareamento meiótico (SINGH, 1993).

Tabela 8 - Porcentagem de cruzabilidade entre as combinações descritas no capítulo, utilizando grãos de pólen desidratados com Sílica gel por 120 minutos e Cloreto de Lítio por 30 minutos e armazenados no nitrogênio líquido por até 10 meses, número de híbridos identificados morfológicamente, número de híbridos confirmados molecularmente por cruzamento e taxa de formação de híbridos para cada combinação.

Combinações de Cruzamentos	Tratamento de criopreservação de pólen	Nº polinizações	Nº cariopses	% de cariopses obtidas	Nº Plantas germinadas	% Germinação	Híbridos identificados por morfologia	Híbridos confirmados molecularmente	Taxa de formação de híbridos
<i>P. urvillei</i> (1) × <i>P. malacophyllum</i> (3)	Sílica 120'	217	94	43,32	79	84,04	17	11	5,07%
	LiCl 30'	315	121	38,41	97	80,17	23	9	2,85%
<i>P. urvillei</i> (1) × <i>P. malacophyllum</i> (2)	Sílica 120'	154	59	38,31	54	91,53	23	3	1,95%
	LiCl 30'	213	92	43,19	80	86,96	34	7	3,28%
<i>P. urvillei</i> (1) × <i>P. regnellii</i> (4)	Sílica 120'	212	92	43,40	55	59,78	24	12	5,66%
	LiCl 30'	294	96	32,65	48	50,00	28	20	6,80%
366 - C33 (9) × <i>P. malacophyllum</i> (3)	Sílica 120'	121	13	10,74	3	23,08	3	1	0,82%
	LiCl 30'	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
399 - D27 (11) × <i>P. malacophyllum</i> (3)	Sílica 120'	12	9	75,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00%
	LiCl 30'	64	32	50,00	0	0,00	0,00	0,00	0,00%
365 - C33 (10) × <i>P. regenellii</i> ()	Sílica 120'	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	LiCl 30'	31	8	25,81	3	37,50	3	2	6,45%
<i>P. regenellii</i> (8) × <i>P. regenellii</i> (4)	Sílica 120'	44	28	63,64	6	21,43	6	3	6,81%
	LiCl 30'	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Total		1677	644	38,40%	425	66%	161	68	

Um total de 50 marcadores SSR e sete marcadores ISSR foram pré-selecionados e avaliados nos oito genitores (Tabela 9) para escolha dos polimórficos para cada combinação de genitor. Dos quais quatro ISSR conseguiram diferenciar os genitores de alguns cruzamentos: ISSR 1 (CT)8-G, ISSR 2 (AC)8-T, ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C (CIDADE et al., 2008; BRUGNOLI et al., 2013; USANDIZAGA et al., 2015) e 16 marcadores SSR (PA02C3, PA02F8, PA02A5, PA01F10, Pp-UNICAMP6, Pp-UNICAMP8, Pp-UNICAMP11, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP18, Pp-UNICAMP19, Pp-UNICAMP 21, Pp-UNICAMP 24, Pdf1-8, Pdf1-18, PR-25 e PR -15 foram capazes de diferenciar os indivíduos na progênie, esses marcadores estão identificados com asterisco na Tabela 9, eles então foram avaliados nas progênies das combinações de cruzamentos realizadas para identificar se havia polimorfismo e para a identificação dos indivíduos híbridos (Tabela 10). Todos eles apresentavam pelo menos uma banda exclusiva do genitor masculino que não estava presente no genitor feminino. Ao todo 68 indivíduos híbridos foram identificados usando marcadores SSR e ISSR (Tabela 10).

Os resultados de polimorfismo e os híbridos identificados, encontram-se na Tabela 10, onde é possível observar que no cruzamento entre BGP 393 (*P. urvillei*) x BGP 293 (*P. malacophyllum*) foram identificados 20 híbridos que tiveram bandas exclusivas do genitor masculino nos marcadores ISSR 1 (CT)8-G, ISSR 2 (AC)8-T (Figura 14), ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C e SSR Pp-UNICAMP 15, Pp-UNICAMP19, Pdf1-18 e PA02F8, dos quais, oito indivíduos foram confirmados como híbridos por mais de um marcador.

Já no cruzamento entre BGP 393 (*P. urvillei*) x BGP 6 (*P. malacophyllum*) foram identificados dez híbridos pelos marcadores ISSR 9 (ATG)5-GA, PA02F8 e PR-25.

No cruzamento entre BGP 393 (*P. urvillei*) x BGP 215 (*P. regnellii*) foram identificados 32 híbridos com os marcadores ISSR 2 (AC)8-T, ISSR 9 (ATG)5-GA, Pp-UNICAMP 8, Pp-UNICAMP 18, Pp-UNICAMP 21 (Figura 13), Pdf1-8, Pdf1-18, PR-15 e PR-25.

No cruzamento entre o híbrido C33- 365 (*P. regnellii*/ BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x BGP 215 (*P. regnellii*) foram identificados dois híbridos com os marcadores Pp-UNICAMP 15, PR-15 e PR-25.

No cruzamento entre BGP 258 (*P. regnellii*) x BGP 215 (*P. regnellii*) foram identificados três híbridos com os marcadores PA02A5 e PR-25.

No cruzamento entre C33- 366 (*P. regnellii*/ BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x BGP 293 (*P. malacophyllum*) foi identificado um híbrido com o marcador ISSR 2 (AC)8-T.

Tabela 9 - Marcadores moleculares microssatélites (SSR) e intermicrossatélites (ISSR) avaliados nos genitores *P. urvillei* (1), *P. malacophyllum* (2 e 3), *P. regnellii* (4 e 8), Híbridos: 366_C33 (9), 365_C33 (10), 399_D27 (11) usados nas diferentes combinações de cruzamentos.

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	Nº de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (nº de genitores que amplificam/nº de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. regnellii</i>	<i>P. urvillei</i>
PA01E10	<i>P. atratum</i>	Cidade et al. (2013)	54	186 - 210	1 a 2	N	-	N			0/2	4/4	0/1
PA01B7			60	239-279	1 a 2	S	(9) x (3)	N			2/2	4/4	1/1
PA01C1			58	231	0*	-	-	-			-	-	-
PA01F10*			50	194-240	1 a 4	S	(1) x (2 e 3) / (1) x (4)	S	1 a 4	7	2/2	4/4	1/1
PA02A5*			56	122-132	2 a 5	N	(8) x (4)	S	0 a 9	15	0/2	4/4	0/1
PA02B1			60	130-170	2 a 4	N	-	N			2/2	2/4	1/1
PA02B6			60	169	1 a 5	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PA02C3*	<i>P. atratum</i>	Cidade et al. (2010)	60	240-250	1 a 4	S	(1) x (4) / (9) x (3)	S	1 a 4	11	2/2	4/4	1/1
PA02F8*			*TD	166-200	1 a 3	N	(1) x (2 e 3)	S	0 a 2	6	2/2	4/4	1/1
PA02G11			*TD	144-176	1	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PA02H4			*TD	218	0*	-	-	-			-	-	-
PA02H9			*TD	270-330	2	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PP01A5			60	257	3	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PP01B3			50	217	1	N	-	-			2/2	4/4	1/1
PP01D11			60	245	2	S	-	-			2/2	4/4	1/1

*TD = touchdown (60-55°C). Negrito: Genitores indicados na tabela 7. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

... continuação da Tabela 9

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	Nº de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (nº de genitores que amplificam/nº de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. regnellii</i>	<i>P. urvillei</i>
PP01F3			60	180	2	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PP02D2			*TD	249	1	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PP02D6			*TD	223	1	S	-	-			2/2	4/4	1/1
PP02F2			54	164	1 a 6	S	-	N			2/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP01			60	173-181	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP02			51	187-203	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP03			60	127-167	2 a 6	S	-	N			2/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP04			60	133-151	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP05			60	157-173	2 a 4	N	-	N			0/2	3/4	0/1
Pp-UNICAMP06*			51	155-169	1 a 4	S	-	-	0 a 4	9	2/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP07			65	222-258	1	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP08*			51	144-170	1 a 2	N	(1) x (4)	S	0 a 4	11	2/2	1/4	1/1
Pp-UNICAMP09	<i>P. plicatulum</i>	Oliveira et al. (2016)	56	228-260	1 a 5	N	-	N			2/2	2/4	1/1
Pp-UNICAMP10			60	230-256	1 a 4	N	-	N			0/2	3/4	0/1
Pp-UNICAMP11*			60	232-266	1 a 6	N	-	-	0 a 9	16	0/2	0/4	1/1
Pp-UNICAMP12			65	213-277	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP13			55	116-142	2	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP14			63	223-243	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP15*			55	152-166	3 a 7	N	(1) x (4) / (9) x (3)	S	0 a 15	22	2/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP16			55	258-300	1	S	-	-			-	-	-

*TD = touchdown (60-55°C). Negrito: Genitores indicados na tabela 7. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

... continuação da Tabela 9

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	N° de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (n° de genitores que amplificam/n° de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. regnellii</i>	<i>P. urvillei</i>
Pp-UNICAMP17			57	147-191	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP18*			65	119-153	2 a 4	N	(1) x (4)	S	0 a 10	18	1/2	3/4	1/1
Pp-UNICAMP19*			57	203-241	2 a 7	S	(1) x (2 e 3)/ (1) x (4)	S	2 a 9	20	2/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP20			65	156-162	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP21*			55	145-205	2 a 4	N	(1) x (4)	S	0 a 5	14	0/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP22			65	133-137	2	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP23			55	230-254	1 a 2	N	-	-			2/2	4/4	1/1
Pp-UNICAMP24*			63	179-215	1 a 3	N	-	-	0 a 3	5	0/2	3/4	0/1
Pp-UNICAMP25			63	218-316	1 a 3	N	-	-			0/2	4/4	0/1
PR - 15*			60	188-255	1 a 2	S	(1) x (4) / (9) x (3) / (10) x (4)	S	1 a 4	8	2/2	4/4	1/1
PR - 31			60	276-274	1 a 2	N	-	-	0 a 5	9	0/2	4/4	0/1
PR - 25*	<i>P. regnellii</i>	Cidade et al. (2009)	60	137-146	1 a 2	N	(1) x (2 e 3) / (1) x (4) / (9) x (3) / (10) x (4) / (8) x (4)	S	0 a 3	8	2/2	4/4	1/1
PR - 44			60	130-157	2 a 4	N	-	-	0 a 4	7	0/2	4/4	1/1

Negrito: Genitores indicados na tabela 7. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

... continuação da Tabela 9

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	Nº de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (nº de genitores que amplificam/nº de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. regnellii</i>	<i>P. urvillei</i>
Pdfl – 8*	<i>P. urvillei</i>	Malosetti e Speranza (2007)	53	198-238	1 a 5	S	(1) x (4)	S	0 a 4	10	2/2	4/4	1/1
Pdfl - 18			53	251-306	2 a 6	N	(1) x (2 e 3)/ (1) x (4) / (9) x (3)	S	2 a 5	14	2/2	4/4	1/1
ISSR 1* (CT) ₈ -G	<i>P. notatum</i> , <i>P. simplex</i>	Cidade et al. (2008), Brugnoli et al. (2013)	49	~2000 a 400	1 a 4	S	(1) x (2 e 3) (9) x (3) (10) x (4) (8) x (4)	S	2 a 7	15	2/2	4/4	1/1
ISSR 2* (AC) ₈ -T			49	~2000 a 450	1 a 4	S	(1) x (2 e 3)/ (9) x (3)	S	3 a 10	18	2/2	4/4	1/1
ISSR 6 (GT) ₈ -C	<i>P. simplex</i> , <i>Acroceras macrum</i>	Brugnoli et al. (2013), Usandizaga et al. (2015)	48	~1650 a 650	1 a 3	N	-	S	0 a 2	5	2/2	0/4	0/1
ISSR 8 (CA) ₈ -G			48	~1650 a 650	2 a 6	S	-	-	1 a 7	14	2/2	4/4	1/1
ISSR 7 (AG) ₈ -C	<i>P. simplex</i>	Brugnoli et al. (2013)	49	~2500 a 350	6 a 9	S	-	S	3 a 8	13	2/2	4/4	1/1
ISSR 9* (ATG) ₅ -GA	<i>Acroceras macrum</i>	Usandizaga et al. (2015)	42	~2500 a 650	2 a 8	S	(1) x (2 e 3)/ (1) x (4) / (9) x (3)	S	2 a 10	23	2/2	4/4	1/1
ISSR 10* (GA) ₈ -C			48	~1500 a 650	4 a 5	S	(1) x (2 e 3)/ (1) x (4) / (9) x (3)	S	3 a 9	20	2/2	4/4	1/1

Negrito: Genitores indicados na tabela 7. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

De acordo com resultados da Tabela 10 é possível observar que dos 16 marcadores SSR utilizados para identificar aos híbridos na progênie, seis (PA01F10, PA02F8, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP19, PR-25 e Pdf1-18) diferenciou os indivíduos nos cruzamentos *P. urvillei* (1) x *P. malacophyllum* (2;3), e os quatro ISSR polimórficos ditos anteriormente foram capazes de diferenciar a progênie nessa combinação. Nos cruzamentos *P. urvillei* (1) x *P. regnellii* (4), 9 marcadores SSR (PA02C3, Pp-UNICAMP8, Pp-UNICAMP18, Pp-UNICAMP19, Pp-UNICAMP21, PR-15, PR-25, Pdf1-8 e Pdf1-18) e 3 ISSR (ISSR 1 (CT)8-G, ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C) diferenciaram a progênie.

Já no cruzamento entre C33- 366 (*P. regnellii*/ BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x BGP 293 (*P. malacophyllum*) sete marcadores SSR (PA01B7, PA02C3, Pp-UNICAMP15, PR-15, PR-25, Pdf1-8, Pdf1-18) e os quatro ISSR já mencionados foram capazes de diferenciar a progênie.

Observando os cruzamentos intraespecíficos envolvendo *P. regnellii* nota-se que três marcadores SSR (Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP21 e Pp-UNICAMP25) diferenciaram as progênies das duas combinações entre o híbrido C33- 365 (*P. regnellii*/ BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x BGP 215 (*P. regnellii*) e entre BGP 258 (*P. regnellii*) x BGP 215 (*P. regnellii*), sendo que nessa última, o marcador SSR PA02A5 foi adequada para separar os indivíduos na progênie e quanto ao marcador ISSR, foi possível separar os indivíduos de ambos cruzamentos apenas com o ISSR 1 (CT)8-G.

Sendo assim, constatou-se que para todas as combinações de cruzamentos interspecíficos desse capítulo, os marcadores SSR (Pdf1-8 e PR-25) e ISSR 2 (AC)8-T, ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C foram suficientes e eficazes para separar a progênie. Já se referindo aos cruzamentos intraespecíficos, os marcadores SSR (Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP21 e Pp-UNICAMP25) e ISSR 1 (CT)8-G mostraram-se eficiente para separar os indivíduos. Sendo que apenas o marcador PR-25 foi capaz de diferenciar qualquer combinação relacionada aos cruzamentos aqui expostos, então pode-se dizer que para essas combinações esse marcador é promissor.

Se formos analisar as combinações que tem como genitor feminino *P. urvillei*, é possível afirmar que o conjunto de marcadores SSR (Pp-UNICAMP19, PR-25 e Pdf1-18) e ISSR 2 (AC)8-T, ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C são eficientes para separar os indivíduos de acordo com os cruzamentos realizados nesse trabalho.

Tabela 10 - Polimorfismo entre os genitores de cada cruzamento realizado e identificação e quantidade de híbridos identificados de acordo com cada marcador molecular avaliado

Marcador/cruzamento		<i>P. urvillei</i> (BGP 393) x <i>P. malacophyllum</i> (BGP 6)	<i>P. urvillei</i> (BGP 393) x <i>P. malacophyllum</i> (BGP 293)	<i>P. urvillei</i> (BGP 393) x <i>P. regnellii</i> (BGP 215)	C33 - 366 x <i>P.</i> <i>malacophyllum</i> (BGP 293)	C33 - 365 x <i>P.</i> <i>regnellii</i> (BGP 215)	<i>P. regnellii</i> (BGP 258) x <i>P. regnellii</i> (BGP 215)
ISSR 1 (CT) ₈ -G	polimórfico	x	x		x	x	x
	n° híbridos	0	13		0	0	0
ISSR 2 (AC) ₈ -T	polimórfico	x	x	x	x		
	n° híbridos	0	9	3	1		
ISSR 9 (ATG) ₅ -GA	polimórfico	x	x	x	x		
	n° híbridos	6	8	0	0		
ISSR 10 (GA) ₈ -C	polimórfico	x	x	x	x		
	n° híbridos	0	8	4	0		
PA01B7	polimórfico				x		
	n° híbridos				0		
PA01F10	polimórfico	x	x				
	n° híbridos	0	0				
PA02A5	polimórfico						x
	n° híbridos						2
PA02C3	polimórfico			x	x		
	n° híbridos			0	0		
PA02F8	polimórfico	x	x				
	n° híbridos	3	9				
Pp-UNICAMP08	polimórfico			x			
	n° híbridos			3			
Pp-UNICAMP15	polimórfico	x	x		x	x	x
	n° híbridos	0	7		0	2	0
Pp-UNICAMP18	polimórfico			x			
	n° híbridos			5			
Pp-UNICAMP19	polimórfico	x	x	x			
	n° híbridos	0	4	0			

... Continuação da Tabela 10

Marcador/cruzamento	<i>P. urvillei</i> (BGP 393) x <i>P. malacophyllum</i> (BGP 6)	<i>P. urvillei</i> (BGP 393) x <i>P. malacophyllum</i> (BGP 293)	<i>P. urvillei</i> (BGP 393) x <i>P. regnellii</i> (BGP 215)	C33 - 366 x <i>P.</i> <i>malacophyllum</i> (BGP 293)	C33 - 365 x <i>P.</i> <i>regnellii</i> (BGP 215)	<i>P. regnellii</i> (BGP 258) x <i>P.</i> <i>regnellii</i> (BGP 215)
Pp-UNICAMP21	polimórfico n° híbridos		x 2			
Pp-UNICAMP24	polimórfico n° híbridos				x 0	x 0
Pp-UNICAMP25	polimórfico n° híbridos				x 0	x 0
Pdfl- 8	polimórfico n° híbridos	x 0	x 0	x 9	x 0	
Pdfl- 18	polimórfico n° híbridos	x 0	x 9	x 16	x 0	
PR - 15	polimórfico n° híbridos			x 1	x 0	x 1
PR - 25	polimórfico n° híbridos	x 1		x 1	x 0	x 1
Total de híbridos distintos por cruzamento		10	20	32	1	2
					2	3

Para calcular a similaridade genética entre os genitores, foram utilizados os padrões polimórficos de 18 marcadores SSR (PA02C3, PA02A5, PA02F8, PA01F10, Pp-UNICAMP6, Pp-UNICAMP-8, Pp-UNICAMP 11, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP18, Pp-UNICAMP19, Pp-UNICAMP21, Pp-UNICAMP 24, Pdf1-8, Pdf1-18, PR-25, PR-15, PR-31, PR-44) e sete ISSR [(CT)8-G, 2 (AC)8-T, 6 (GT)8-C, 8 (CA)8-G, (AG)8-C, (ATG)5-GA, (GA)8-C].

Observou-se que alguns marcadores não amplificaram em alguns genitores (Tabela 9), por exemplo, para os genitores *P. urvillei* (1) três marcadores não foram eficientes pois não houve amplificação e, ainda, para *P. malacophyllum* (2;3), os dois genótipos, considerando todos marcadores SSR avaliados, apenas 9 amplificaram.

As similaridades genéticas entre os genitores dos cruzamentos variaram de 14,61% e 13,68% entre os genitores *P. urvillei* (BGP 393) e *P. malacophyllum* (BGP 6 e BGP 293), 12,61% entre os genitores *P. urvillei* (BGP 393) e *P. regnellii* (BGP 215) e de 17,17% entre 366_C 33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii*/BGP 397) x *P. malacophyllum* (BGP 293). Nos cruzamentos intraespecíficos de *P. regnellii*, a similaridade foi de 55,30% entre 365_C33 (*P. regnellii*/BGP 258 x *P. regnellii*/BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215) e 58,82% entre *P. regnellii* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215) (Figura 9).

Como esperado, a similaridade genética entre os genótipos de *P. regnellii* é maior do que entre *P. regnellii* e as outras espécies. As similaridades genéticas entre *P. urvillei* e *P. malacophyllum* e *P. urvillei* e *P. regnellii* são próximas, no entanto, *P. malacophyllum* pertence a outro subgênero enquanto *P. regnellii* é uma espécie mais próxima evolutivamente. Os genomas descritos para *P. urvillei* (IIJJ) são encontrados também nos grupos Paniculata, Quadrifaria e Virgata. Parece que esses dois genomas estão amplamente distribuídos no gênero e tiveram um papel importante na especiação de *Paspalum* (BURSON e QUARÍN, 1982). O grupo informal a que *P. regnellii* pertence varia de acordo com o autor que classifica, sendo classificado como grupo Virgata ou Macrophylla (GIUSSANI et al., 2009), mas segundo informações obtidas por Gomes (1995) *P. regnellii* seria taxonomicamente próximo de Virgata.

De acordo com Burson e Quarín (1982), *Paspalum virgatum* possui constituição genômica III₂J₂, muito semelhante aos genomas de *Paspalum urvillei* e *Paspalum dilatatum* (IIJJ) (BURSON et al., 1973; BURSON E BENNETT, 1972; BURSON, 1979). Taxonomicamente, *P. virgatum* está intimamente relacionado a *P. conspersum* (CHASE, 1929) que também tem semelhança com *P. regnellii* (RIGHI GOMES, 1995), todas espécies do grupo botânico informal Virgata (CHASE, 1929). Ambos os genomas estão representados em *P. dilatatum* e *P. urvillei*, os únicos membros do grupo Dilatata, e estão presentes em todas as espécies examinadas nos grupos Paniculata, Quadrifaria e Virgata. Parece que esses dois

genomas estão amplamente distribuídos no gênero e tiveram um papel importante na especiação de *Paspalum*.

Devido à sua proximidade taxonômica, seria de esperar que essas duas espécies (*P. conspersum* e *P. virgatum*) tivessem genomas semelhantes; no entanto, *P. conspersum* tem a fórmula genômica I_2I_2JJ (BURSON, 1978). Devido às semelhanças morfológicas e ecológicas dessas duas espécies, pode-se especular que elas provavelmente já tiveram genomas semelhantes, mas os rearranjos estruturais alteraram seus cromossomos. O isolamento devido à autopolinização sem dúvida permitiu essas mudanças que evoluíram de forma independente e em direções divergentes (BURSON e QUARÍN, 1982).

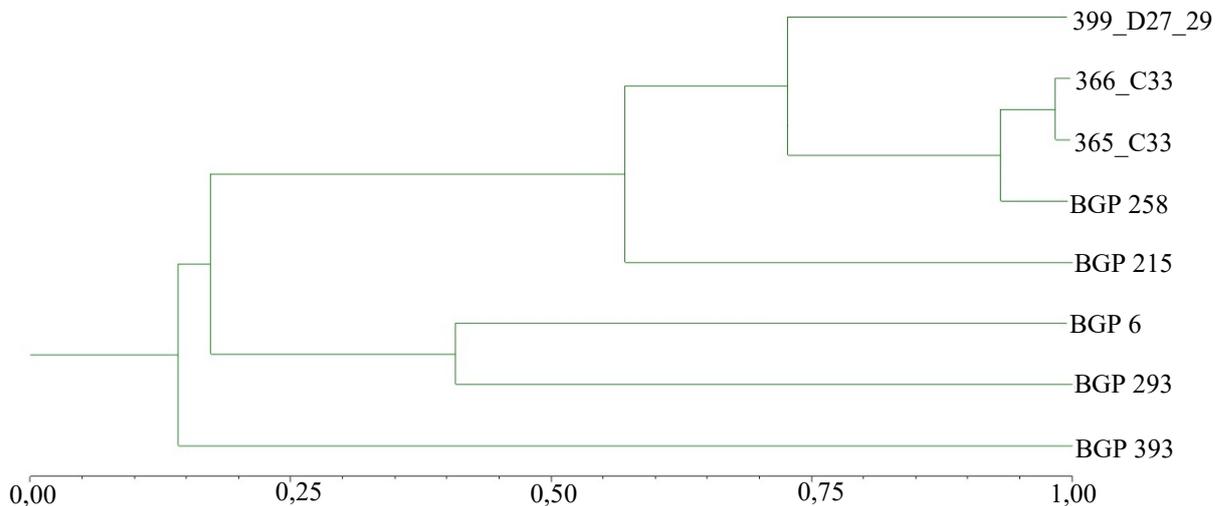


Figura 9. Dendrograma de análise de agrupamento (UPGMA), utilizando o índice coeficiente de similaridade de Jaccard, para os genitores utilizados nas diferentes combinações de cruzamentos do capítulo: híbrido F₁ 399_D27 oriundo do cruzamento entre *P. regnellii* (BGP 215) e *P. malacophyllum* (BGP 293); híbridos F₁ 366_C33 e 365_C33 oriundos do cruzamento entre *P. regnellii* (BGP 258) e *P. regnellii* (BGP 397), *Paspalum regnellii* (BGP 258), *Paspalum regnellii* (BGP 215), *Paspalum malacophyllum* (BGP 6 e BGP 293) e *Paspalum urvillei* (BGP 393).

O sucesso das hibridações interespecíficas, muitas vezes, é limitado por barreiras reprodutivas de pré e pós-fertilização, que podem resultar na falta ou falha da germinação dos grãos de pólen e na inibição ou retardamento da elongação do tubo polínico, se a fertilização ocorrer, outras barreiras podem existir na pós-fertilização, como a morte do embrião, devido à degeneração do endosperma e a esterilidade total ou parcial da progênie híbrida (PRESTES e GOULART, 1995).

Nos cruzamentos *P. juergensii* x *P. malacophyllum* e *P. dilatatum* x *P. malacophyllum*, Burson e Hussey (1998) obtiveram taxa de sucesso de 0,8% e 0,72%, respectivamente. Os autores enfatizaram que o comportamento de pareamento cromossômico nos híbridos *P. dilatatum* x *P. malacophyllum* era incomum porque o número de bivalentes frequentemente excedia 10, indicando que alguns cromossomos de *P. dilatatum* estão pareados entre si. Os genomas I e J são diferentes (BURSON, 1981) e normalmente não se emparelham. No entanto, comportamento semelhante de emparelhamento foi relatado em híbridos entre *P. dilatatum* e duas outras espécies autotetraplóides, *P. alnum* Chase e *P. simplex* Morong, nenhuma das quais possui o genoma I ou J (PITMAN et al. 1987; CAPONIO e QUARIN, 1987). A análise citológica do pareamento cromossômico nos híbridos *P. dilatatum* x *P. malacophyllum* e *P. juergensii* x *P. malacophyllum* revelou que *P. malacophyllum* não possui o genoma I ou J e sim genoma MMMM.

Pagliari et al. (2001) estudaram o comportamento meiótico do mesmo acesso utilizado nesse trabalho (BGP 6) e encontraram uma média de 0,86 cromossomos univalentes, 10,34 bivalentes, 0,48 trivalentes e 4,05 quadrivalentes por célula. Esse acesso é uma planta atípica, com lâminas curtas e extremamente largas (geralmente com mais de 4 cm de largura). Ao contrário de outros acessos da mesma espécie que representa o tipo morfológico da espécie, a planta BGP 6 representa um grau extremo de variação em relação à forma e tamanho das lâminas das folhas, mesmo em uma única planta. Alguns autores sugerem que poderia ser considerado um táxon diferente devido a essas diferenças morfológicas e ao seu hábito decumbente de crescimento (HOJSGAARD, 2008; ZILLI et al., 2014).

Além dessas questões, o pareamento cromossômico está diretamente relacionado ao processo de hibridações com sucesso. Singh (1993) delimitou três tipos de pareamento, 1) pareamento intragenômico, que envolve espécies parentais com genoma semelhante, assim, o híbrido apresentará pareamento completo ou quase completo na maioria dos casos, 2) pareamento intergenômico, relacionado ao grau de afinidade genômica entre as espécies parentais, se elas forem geneticamente distantes, é comum a formação de univalentes e os híbridos gerados desse tipo de pareamento, em geral, são estéreis, frágeis e com pouco

crescimento vegetativo e reprodutivo, 3) pareamento mínimo e variável (homeólogo e/ou semihomólogo), comum nos dois tipos de híbridos citados acima (intergenômico e intragenômico), nesse caso, forma-se bivalentes normais, mas parcialmente pareados, sugerindo que há pouca afinidade cromossômica, além disso, observa-se que quanto maior o número de univalentes, menor a afinidade genômica entre as espécies.

Nos cruzamentos entre *P. urvillei* x *P. malacophyllum* (BGP 6) não foi possível identificar híbridos pelas características morfológicas. Apesar do acesso BGP 6 ter uma característica bem peculiar no tamanho das lâminas foliares, essa característica não foi transmitida aos descendentes, pois nenhum indivíduo da progênie possuía essa característica tão evidente. Porém, uma característica morfológica visual que foi possível identificar para separar os possíveis híbridos foi a presença de borda ondulada e perfilho sem pelos, características exclusivas do genitor masculino.

P. malacophyllum (BGP 293), apesar de ser a mesma espécie do acesso BGP 6, não apresenta folhas largas, porém foi possível identificar visualmente os híbridos do cruzamento desse acesso com o *P. urvillei* (BGP 393) pelo descritor morfológico de presença de pelos abaxial da folha, característica do genitor masculino, quando a planta ainda era jovem. Durante o desenvolvimento das inflorescências foi possível perceber que algumas progênies desse cruzamento apresentavam inflorescências típicas de *P. malacophyllum* (BGP 293), espiguetas com nervuras, glabra, estigma roxo e anteras roxas. Já outros indivíduos de outra família do mesmo cruzamento, apresentaram anteras amarelas, característica do genitor feminino (*P. urvillei*), com as demais características iguais ao genitor masculino (*P. malacophyllum*), porém observou-se também que outras progênies não apresentavam essas características nas inflorescências, mas foram identificadas como híbridas na caracterização molecular.

Apesar de terem sido observadas algumas diferenças visuais na caracterização morfológica, a análise multivariada de componentes principais não diferenciou os possíveis híbridos de plantas autofecundadas, pois o número de características que diferenciaram a progênie foi no mínimo uma (borda da folha) e no máximo duas (borda da folha, pelo no caule) para a maioria dos cruzamentos e progênies avaliadas (Figuras 10 a 12).

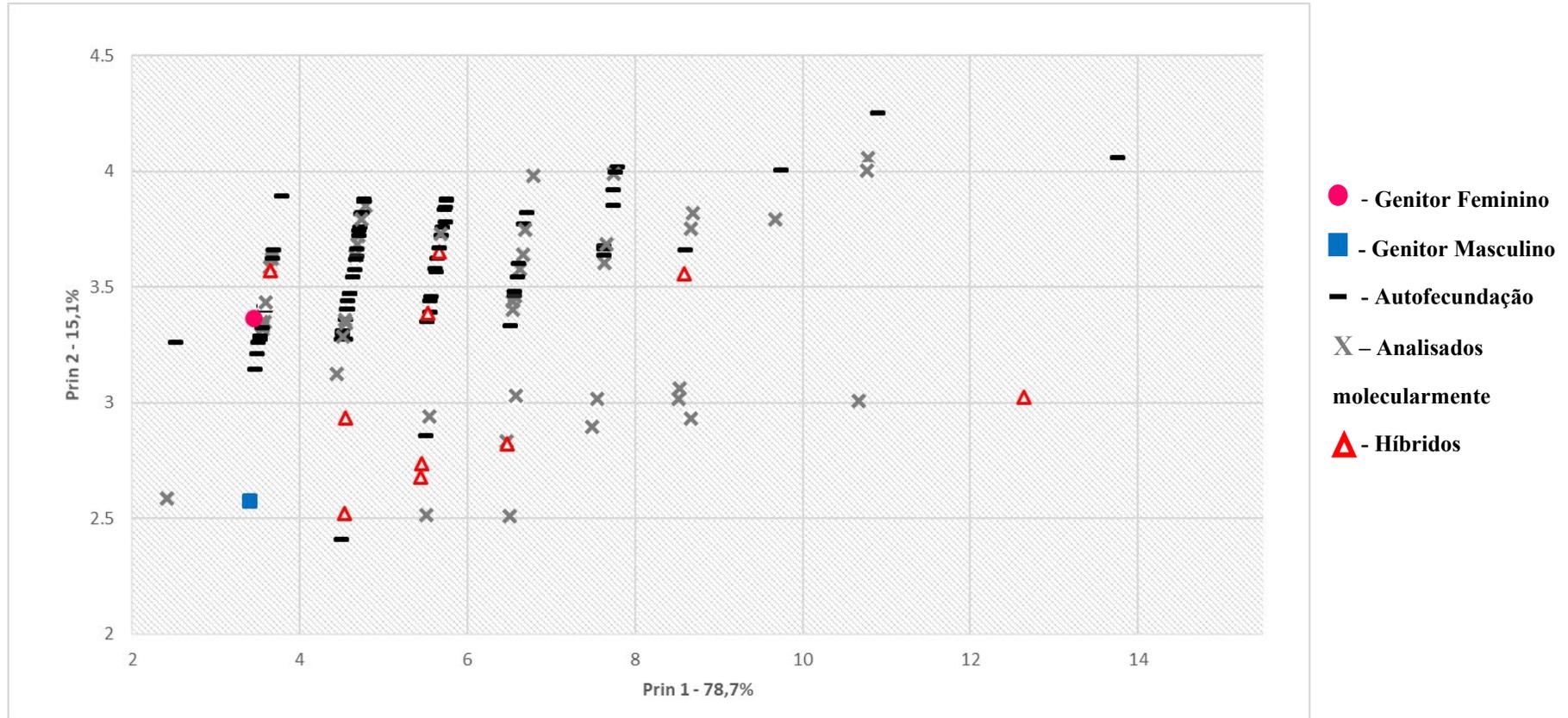


Figura 10. Análise de componentes principais com os descritores morfológicos para o cruzamento entre *P. urvillei* (1) x *P. malacophyllum* (2).

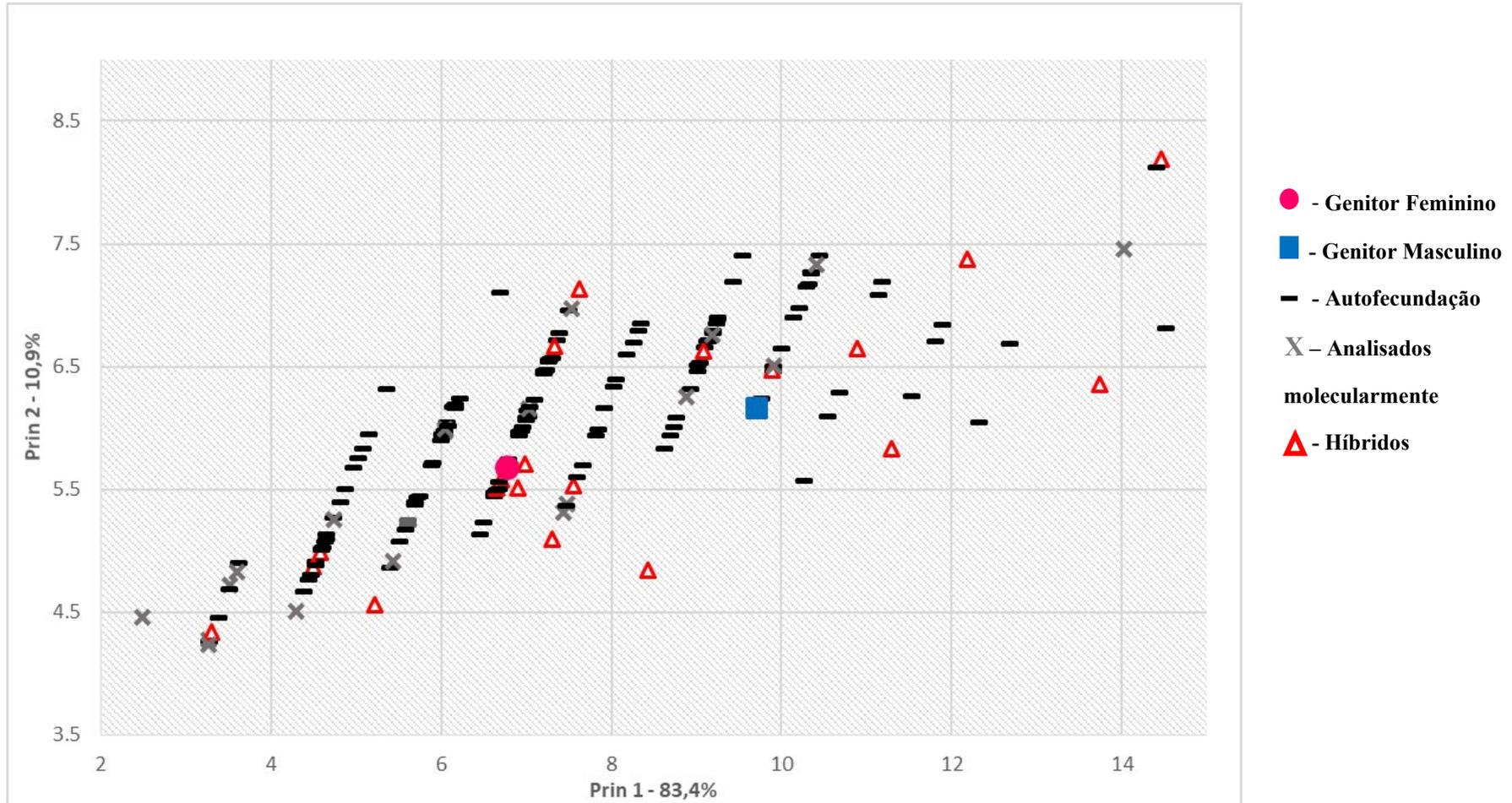


Figura 11. Análise de componentes principais com os descritores morfológicos para o cruzamento entre *P. urvillei* (1) x *P. malacophyllum* (3).

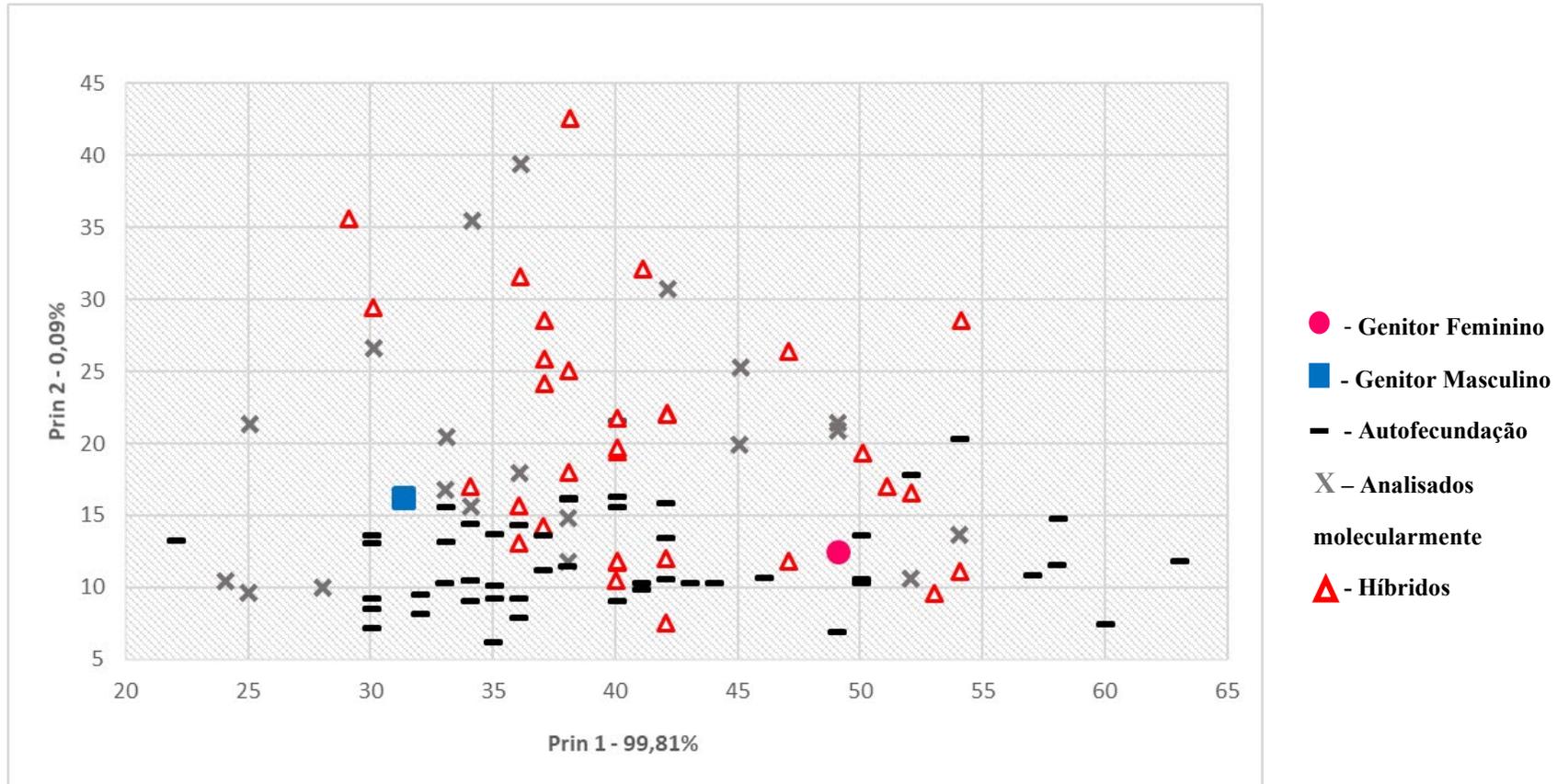


Figura 12. Análise de componentes principais com os descritores morfológicos para o cruzamento entre *P. urvillei* (1) x *P. regnellii* (4).

A confirmação do sucesso do cruzamento é de extrema importância para comprovarmos que os grãos de pólen criopreservados ainda se mantêm viáveis. Para isso, o uso de marcadores moleculares é útil na obtenção de resultados rápidos e de fácil interpretação. Os marcadores SSR e ISSR mostraram-se, nesse trabalho, ferramentas excelentes para confirmar a ocorrência ou não das fecundações cruzadas.

Observou-se que a taxa de formação de híbridos nos cruzamentos intraespecíficos de *P. regnellii* variou de 6,45% no cruzamentos entre 365_C 33 (*P. regnellii*/ BGP 258 x *P. regnellii* /BGP 397) x *P. regnellii* (BGP 215) e 6,81% entre *P. regnellii* (BGP 258) x *P. regnellii* (BGP 215) (Tabela 8). Altas taxas de formação de híbridos entre cruzamentos intraespecíficos também foi observado por Weiler et al. (2018) com genótipos de *Paspalum notatum* e por Novo et al. (2017), com cruzamentos entre *Paspalum plicatulum*. Para cruzamentos entre genótipos da mesma espécie, os grãos de pólen criopreservados são úteis, pois alguns genitores podem apresentar diferença de florescimento de poucos dias, e usar grãos de pólen conservados pode viabilizar cruzamentos antes não viáveis pela assíncronia de dias.

Já nos cruzamentos interespecíficos a taxa de formação de híbridos variou de 0,82% a 6,80%, sendo maior taxa observada no cruzamento entre *P. urvillei* (BGP 393) x *P. regnellii* (BGP 215), onde os grãos de pólen criopreservados utilizados foram desidratados previamente com Cloreto de Lítio por 30 minutos. Buitink et al (1998) afirmam que, para todas as temperaturas de armazenamento estudadas por eles, a deterioração foi mais lenta em amostras de pólen armazenados sobre soluções saturadas de LiCl, uma vez que esta solução dá uma umidade relativa em torno de 11 a 15%, dependendo da temperatura utilizada no momento da desidratação.

O sucesso do cruzamento entre *P. urvillei* x *P. regnellii* pode ser explicado, pelo fato de as duas espécies possuírem genoma IIJJ e RRSS, que pode ser que tenha se emparelhado de forma mais regular do que no cruzamento entre *P. urvillei* x *P. malacophyllum* onde os genomas foram IIJJ x MMMM.

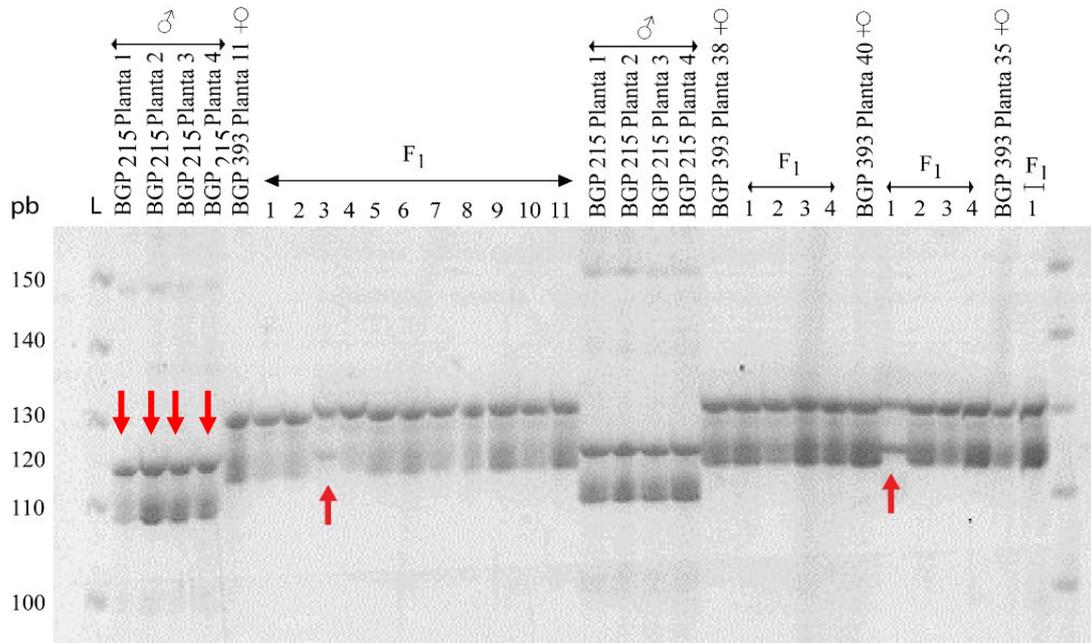


Figura 13. Perfil de amplificação do marcador Pp-UNICAMP 21 em gel de poliácridamida 6% das amostras do cruzamento entre *Paspalum urvillei* (BGP 393) e *Paspalum regnellii* (BGP 215). O alelo exclusivo do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirma a hibridação está indicado pelas setas vermelhas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). L: padrão de peso molecular 10 pb (Invitrogen).

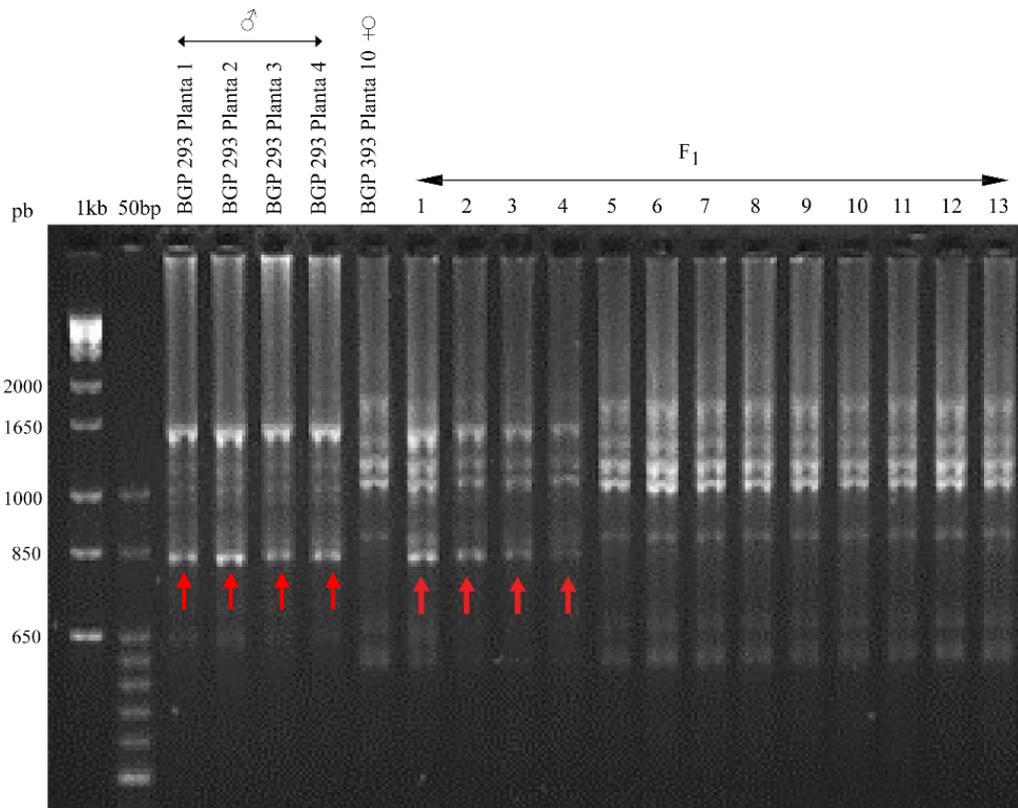


Figura 14. Perfil de amplificação do marcador ISSR 2, em gel de agarose 2%, das amostras do cruzamento entre *Paspalum urvillei* (BGP 393) e *Paspalum malacophyllum* (BGP 293). O alelo exclusivo do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirma a hibridação está indicado pelas setas vermelhas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwig.

3.3 CONCLUSÃO

Foram confirmados híbridos dos cruzamentos utilizando marcadores microssatélites e intermicrossatélites, portanto, grãos de pólen criopreservados, desidratados com Cloreto de Lítio e Sílica gel, podem ser utilizados com sucesso em hibridações em programas de melhoramento genético.

Os marcadores microssatélites e inter-microssatélite utilizados nesse trabalho foram eficientes para separar os genótipos de *Paspalum* utilizados nas diferentes combinações apresentados neste estudo.

Os marcadores morfológicos usados no trabalho não foram eficientes na identificação dos híbridos, uma vez que o gênero apresenta muita variação morfológica e as características observadas nos genitores não são tão diferentes.

As progêneses híbridas configuram uma combinação genética inédita e serão incorporadas pelo programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste.

3.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Essa metodologia já está sendo adotada pelo programa de melhoramento de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste e em fase de testes nos programas de melhoramento de braquiária (Gênero *Urochloa*) e *Panicum*, na Embrapa Gado de Corte.

Analisar a viabilidade dos grãos de pólen, a produção de sementes, o modo de reprodução, o comportamento da meiose e potencial forrageiro das plantas a campo dos híbridos obtidos.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, C. A.; BLOUNT, A. R.; QUESENBERRY, K. H.; KENWORTHY, K. E.; ADAMOWSKI, E. D. V.; PAGLIARINI, M. S.; BONATO, A. B. M.; BATISTA, L. A. R.; VALLS, J. F. M. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.

ADAMOWSKI, E. de V., et al. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.

ALISCIONI, S.S. Contribución a la filogenia del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae.) **Annals Of The Missouri Botanical Garden**. v. 89, p. 504-523, 2002.

ALISCIONI, Sandra S. et al. A molecular phylogeny of *Panicum* (Poaceae: Paniceae): tests of monophyly and phylogenetic placement within the Panicoideae. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 5, p. 796-821, 2003.

ALISCIONI, Sandra S.; DENHAM, Silvia S. Rachis of the genus *Paspalum* L.(Poaceae: Panicoideae: Paniceae): anatomy and taxonomic significance of the primary branches of the inflorescences. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 203, n. 1, p. 60-76, 2008.

ARAUJO, Anacreonte Avila de. Principal Gramineae of the Rio Grande do Sul. 1971.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 1992. 298p.

BARRO, Raquel Santiago. Respostas morfofisiológicas e produtivas de genótipos forrageiros nativos em diferentes condições de luminosidade. 2011.

BASHAW, E. C. et al. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: **Proceedings of the XI International Grassland Congress held at Surfers Paradise, Queensland, Australia, 13-23 April 1970**. 1970.

BENNETT, H. W.; BASHAW, E. C. Interspecific Hybridization with *Paspalum* spp. 1. **Crop Science**, v. 6, n. 1, p. 52-54, 1966.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoramento visando resistência a doenças. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: Editora UFV, p. 461-484, 1997.

BORÉM, Aluizio; FRITSCHÉ NETO, Roberto. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. 2013.

BORÉM, Aluizio; MIRANDA, Glauco Vieira; FRITSCHÉ-NETO, Roberto. Melhoramento de plantas. 2017.

BROWN, Walter V. The Kranz syndrome and its subtypes in grass systematics. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, p. 1-97, 1977.

BRUGNOLI, E. A.; URBANI, M. H.; QUARIN, C. L.; MARTINEZ, E. J.; ACUÑA, C. A. Diversity in diploid, tetraploid, and mixed diploid–tetraploid populations of *Paspalum simplex*. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1509-1516, 2013.

BURSON, B. L. Genome relations among four diploid *Paspalum* species. **Botanical Gazette**, v. 142, n. 4, p. 592-596, 1981.

BURSON, B. L. Genome relations between *Paspalum conspersum* and two diploid *Paspalum* species. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 20, n. 3, p. 365-372, 1978.

BURSON, B. L.; LEE, H.; BENNETT, H. W. Genome Relations Between Tetraploid *Paspalum dilatatum* and Four Diploid *Paspalum* Species 1. **Crop Science**, v. 13, n. 6, p. 739-743, 1973.

BURSON, B. L.; YOUNG, B. A. Pollen-pistil interactions and interspecific-incompatibility among *Panicum antidotale*, *P. coloratum*, and *P. deustum*. **Euphytica**, v. 32, n. 2, p. 397-405, 1983.

BURSON, B. L. Cytology and reproductive behavior of hybrids between *Paspalum urvillei* and two hexaploid *P. dilatatum* biotypes. **Genome**, v. 35, n. 6, p. 1002-1006, 1992.

BURSON, B. L.; BENNETT, H. W. Cytogenetics of *Paspalum conspersum* and its genomic relationship with yellow-anthered *P. dilatatum* and *P. malacophyllum*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 18, n. 4, p. 701-708, 1976.

BURSON, B. L.; HUSSEY, M. A. Cytology of *Paspalum malacophyllum* and its relationship to *P. juergensii* and *P. dilatatum*. **International journal of plant sciences**, v. 159, n. 1, p. 153-159, 1998.

BURSON, B. L.; QUARÍN, C. L. Cytological relationship between *Paspalum dilatatum* and diploid cytotypes of *P. brunneum* and *P. rufum*. **Genome**, v. 35, n. 2, p. 332-336, 1992.

BURTON, G. W. Interspecific hybrids in the genus *Paspalum*. **Journal of Heredity**, v. 34, n. 1, p. 15-23, 1943.

CAPONIO, I.; QUARÍN, C. L. El sistema genético de *Paspalum simplex* y de un híbrido interespecífico con *P. dilatatum*. **Kurtziana**, v. 19, p. 35-45, 1987.

CAPONIO, I.; QUARIN, C. L. Intra-and interspecific hybridization between dallisgrass and vaseygrass. **Crop Science**, v. 30, n. 2, p. 362-364, 1990.

CHASE, A. C. L. The North American species of *Paspalum*. **Contr. U.S. Natl. Herb.**, v. 28, p. 1-310, 1929.

CIDADE, F. W. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flügge (Poaceae). **Conservation genetics**, v. 10, n. 6, p. 1977-1980, 2009.

CIDADE, F. W. et al. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. **American journal of botany**, v. 97, n. 11, p. e107-e110, 2010.

CIDADE, F. W.; DALL'AGNOL, M.; BERED, F.; de SOUZA-CHIES, T. T. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flügge (Paniceae: Panicoideae). **Genetic resources and crop evolution**, v. 55, n. 2, p. 235-246, 2008.

CIDADE, Fernanda W. et al. Genetic variation in polyploid forage grass: assessing the molecular genetic variability in the *Paspalum* genus. **BMC genetics**, v. 14, n. 1, p. 50, 2013.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. **Visconde do Rio Branco: Suprema**, 2011, 620 p.

DARLINGTON, S. Synthesis of Reactance 4-Poles Which Produce Prescribed Insertion Loss Characteristics: Including Special Applications to Filter Design. **Journal of Mathematics and Physics**, v. 18, n. 1-4, p. 257-353, 1939.

DE WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. Apomixis, polyploidy, and speciation in *Dichanthium*. **Evolution**, v. 24, n. 2, p. 270-277, 1970.

DELFINI, C.; SOUZA, V. C.; ZULOAGA, F. O. Taxonomic revision and nomenclatural update of *Paspalum* sect. Pectinata (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae). **Phytotaxa**, v. 323, n. 1, p. 1-26, 2017.

ESTEP, M. C., et al. Allopolyploidy, diversification, and the Miocene grassland expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 42, p. 15149-15154, 2014.

EVERS, G. W.; BURSON, B. L. Dallisgrass and other *Paspalum* species. In: MOSER, L.E.; BURSON, B. L.; SOLLENBERGER, L.E. (Ed.). **Warm-season (C4) grasses**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 2004. p. 681-713.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 1998. **Brasília: Embrapa-Cenargen**, p. 220-3.

FONSECA, D. M.; SANTOS, M. ER; MARTUSCELLO, J. A. Importância das forrageiras no sistema de produção. **Plantas forrageiras. Viçosa: UFV**, p. 13-29, 2010.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flügge. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 402-406, 1961.

GIUSSANI, L. M., et al. Phylogenetic relationships in the genus *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): an assessment of the Quadrifaria and Virgata informal groups. **Systematic Botany**, v. 34, n. 1, p. 32-43, 2009.

GOULD, F. W. **The grasses of Texas**. Texas A&M University, Texas Agricultural Experiment Station., 1975.

HANNA, W. W. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 179, n. 2, p. 227-235, 2011.

HATTERSLEY, P. W.; WATSON, L. C4 grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-malic enzyme species and PCK or NAD-malic enzyme species. **Australian Journal of Botany**, v. 24, n. 2, p. 297-308, 1976.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas. **EMBRAPA Algodão. Documentos**, 2006.

HOJSGAARD, D. et al. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). **Genetic resources and crop evolution**, v. 56, n. 4, p. 533-545, 2009.

HOJSGAARD, D. et al. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 203, n. 7, p. 535-547, 2008.

HOJSGAARD, D. et al. Emergence of apospory and bypass of meiosis via apomixis after sexual hybridisation and polyploidisation. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 1000-1012, 2014.

HONFI, A. I.; QUARIN, C.O L.; VALLS, J. F.M. Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. **Darwiniana**, p. 87-94, 1990.

HÖRANDL, E.; COSENDAL, Anne-Caroline; TEMSCH, Eva Maria. Understanding the geographic distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach. **Plant Ecology & Diversity**, v. 1, n. 2, p. 309-320, 2008.

HUSBAND, B. C.; SABARA, H. A. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). **New Phytologist**, v. 161, n. 3, p. 703-713, 2004.

JIAO, Y., et al. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 97-100, 2011.

KOPP, M. M. et al. Ampliação do acervo de germoplasma de *Paspalum urvillei* da Embrapa Pecuária Sul. In: **Embrapa Pecuária Sul-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 10., 2015, Bento Gonçalves. Recursos genéticos no século 21: de Vavilov a Svalbard: **anais...**[SI]: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2015.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in plant science**, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, R. M. S.; JANK, L.; VALLE, C. B. do (Org.). **Melhoramento de Forrageiras Tropicais**. 1. ed. Campo Grande: Embrapa, 2008, v. 1, p. 13-53.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, n. 5, p. 14- 17, 1998.

MORRONE, O. et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.

MORRONE, O.; DENHAM, S. S.; ZULOAGA, F. O. Revisión taxonómica del género *Paspalum* grupo *Eriantha* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 225-246, 2004.

MORRONE, O.; ESCOBAR, A.; ZULOAGA, F. O. Chromosome studies in American Panicoideae (Poaceae) 1. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 93, n. 4, p. 647-657, 2006.

MOTOOKA, P. et al. Weeds of Hawaii's Pastures and Natural Areas: An Identification and Management Guide College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawai 'i at Manoa. **Manoa**, p. 316, 2003.

MURAT, F., et al. Reconstructing the genome of the most recent common ancestor of flowering plants. **Nature genetics**, v. 49, n. 4, p. 490-496, 2017.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B. M. **Embryology of Angiosperms**, ed., Berlin: Springer-Verlag. p. 475-518, 1984.

NORRMANN, G. A.; QUARIN, C. L.; BURSON, B. L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. **Journal of Heredity**, v. 80, n. 1, p. 24-28, 1989.

NORRMANN, G. A.; QUARIN, C. L.; KILLEEN, T. J. Chromosome numbers in Bolivian grasses (Gramineae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 768-774, 1994.

NOVO, P. E. et al. Cytogenetic relationships, polyploid origin and taxonomic issues in *Paspalum* species: inter-and intraspecific hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. **Plant Biology**, v. 21, n. 2, p. 267-277, 2018.

NOVO, Patricia Elda et al. Hybridization and heterosis in the Plicatula group of *Paspalum*. **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 198, 2017.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, F. A., et al. First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the Plicatula group. **BMC research notes**, 9:511, 2016.

ORTIZ, J. P. A. et al. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 767-787, 2013.

PAGLIARINI, M. S. et al. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, v. 135, n. 1, p. 27-34, 2001.

PECCHIONI, N. et al., Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Genetics & Breeding (Italy)**, 1996.

PEÑALOZA, A. P. S. et al. Unusual chromosome numbers in *Paspalum* L. (Poaceae: Paniceae) from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 399-406, 2008.

PILLAR, V. de P. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, 2009.

PITMAN, M. W.; BURSON, B. L.; BASHAW, E. C. Phylogenetic relationships among *Paspalum* species with different base chromosome numbers. **Botanical Gazette**, v. 148, n. 1, p. 130-135, 1987.

- POEHLMAN, J. M.; SLEPER, D. A. Methods in plant breeding. **Breeding Field Crops**, p. 172-174, 1995.
- POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M.; SANTOS, S. Contagens cromossômicas em espécies brasileiras de *Paspalum* L. (Gramineae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 2, p. 151-162, 2000.
- POZZOBON, M. T. et al. Cytogenetic analyses in *Paspalum* L. reveal new diploid species and accessions. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1292-1299, 2008.
- PRESTES, A. M.; GOULART, L. R. Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 315-363, 1995.
- QUARIN, C. L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newsl**, v. 5, p. 8-15, 1992.
- QUARIN, C. L.; NORRMANN, G. A. Relaciones entre el número de cromosomas, su comportamiento en la meiosis y el sistema reproductivo del género *Paspalum*. In: **Anales IV Congreso Latinoamericano de Botánica, Bogotá, Colombia**, p. 25-35, 1987.
- QUARÍN, C. L. Relaciones citotaxonomicas entre «*Paspalum alnum*» Chase y «*P. hexastachyum*» Parodi («Gramineae»). **Bonplandia**, p. 115-127, 1974.
- QUARÍN, C. L.; BURSON, B. L. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. **Cytologia**, v. 56, n. 2, p. 223-228, 1991.
- QUARÍN, C. L.; NORRMANN, G. A.; ESPINOZA, F. Evidence for autopoloidy in apomictic *Paspalum rufum*. **Hereditas**, v. 129, n. 2, p. 119-124, 1998.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. S. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 29, n. 1, p. 467-501, 1998.
- RIGHI GOMES, M. J. I. Estudos taxonomicos no genero *Paspalum* L., grupos "Virgata" e "Quadrifaria" no Brasil. 1995. 141f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 1995.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.1. **Applied Biostatistics**, NY, 2000.
- RUA, G. H. et al. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 3-4, p. 227-243, 2010.
- RUA, G. I. H.; GRÓTTOLA, M. C. Growth form models within the genus *Paspalum* L. (Poaceae, Paniceae). **Flora**, v. 192, n. 1, p. 65-80, 1997.
- SARTOR, M. E.; REBOZZIO, R. N.; QUARÍN, C. L.; ESPINOZA, F. Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. **Plant systematics and evolution**, v. 299, n. 7, p. 1295-1306, 2013.

- SAS Institute Inc. In: SAS/STAT® 9.1 User's Guide. Cary, NC: SAS 82 Institute Inc., 2004.
- SAVIDAN, Y. H. et al. Breeding *Panicum maximum* in Brazil. 1. Genetic resources, modes of reproduction and breeding procedures. **Euphytica**, v. 41, n. 1-2, p. 107-112, 1989.
- SAX, K. The relation between chromosome number, morphological characters and rust resistance in segregates of partially sterile wheat hybrids. **Genetics**, v. 8 n. 4, 1923.
- SCATAGLINI, M. A. et al. Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) based on plastid and nuclear markers. **Plant systematics and evolution**, v. 300, n. 5, p. 1051-1070, 2014.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 10, n. 2, 2004.
- SIENA, L. A. et al. Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. **Sexual Plant Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 205-215, 2008.
- SINGH, R, J. **Plant Cytogenetics**. CRC Press, Inc. Boca Raton, p. 111-254, 1993.
- SMITH, J. S. C.; SMITH, O. S. Fingerprinting crop varieties. In: *Advances in agronomy*. Academic Press, p. 85-140, 1992.
- SOUZA-CHIES, T. T., et al. A preliminary approach to the phylogeny of the genus *Paspalum* (Poaceae). **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 15-32, 2006.
- SPERANZA, P.; MALOSETTI, M. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). **Plant Genetic Resources**, v. 5, n. 1, p. 14-26, 2007.
- STEIN, J. et al. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 1, p. 186-191, 2004.
- STEPHENS, C. G. et al. **A soil and land use survey of the hundreds of Riddoch, Hindmarsh, Grey, Young, and Nangwarry, County Grey, South Australia**. HE Daw, government printer, 1941.
- SYBENGA, J. Manipulation of genome composition. B. Gene dose: duplication, polyploidy and gametic chromosome number. In: **Cytogenetics in Plant Breeding**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1992. p. 327-371.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic acids research**, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J.. O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

- URBANI, M. H., et al. Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. **Plant Systematics and Evolution**, v. 236, n. 1-2, p. 99-105, 2002.
- USANDIZAGA, S. C. F, et al. Genetic and morphological characterization of *Acroceras macrum* Stapf. **Grass and forage science**, v. 70, n. 4, p. 695-704, 2015.
- VALLE, C. B. do, et al. Estabelecimento de plantas forrageiras em sistemas de integração floresta-pecuária no sul do Brasil. In: FONTANELI, Ren.S.; SANTOS, H.P. dos; FONTANELI, Rob.S. Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sulbrasileira. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p. 283-30, 2009.
- VARELLA, A. C., et al. Screening native and cultivated tropical pastures for silvipastoral systems in Southern Brazil. In: CONGRESO NACIONAL DE SISTEMAS SILVOPASTORILES, 2009, Posadas. **ACTAS...** BUENOS AIRES: INTA, 2009, v.1, p.363-367.
- WEILER, R. L., et al. Intraspecific tetraploid hybrids of *Paspalum notatum*: agronomic evaluation of segregating progeny. **Scientia Agricola**, v. 75 n. 1, p. 36-42, 2018.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.
- ZILLI, A. L. et al. Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris*: Taxonomic and evolutionary implications. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 10, p. 604-612, 2014.
- ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América Del Sur Austral** (Argentina, Bolivia, Sur Del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Missouri: Botanical Garden Press. 2005. 297 p.

Capítulo 4

**USO DE GRÃOS DE PÓLEN CRIOPRESERVADOS EM CRUZAMENTOS DE
ESPÉCIES ASSÍNCRONAS DE *Paspalum***

Naiana Barbosa Dinato; Bianca Baccili Zanotto Vigna; Frederico de Pina Matta; Alessandra Pereira Fávero

Naiana Barbosa Dinato

Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos-SP, 13565-905, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6623-6396>

E-mail: nanadinato@hotmail.com

Bianca Baccili Zanotto Vigna

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0192-9877>

E-mail: bianca.vigna@embrapa.br

Frederico de Pina Matta

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3992-5831>

E-mail: frederico.matta@embrapa.br

Alessandra Pereira Fávero

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, CP 339, Rodovia Washington Luís, Km 234, São Carlos-SP, 13560-970, Brasil.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9461-1539>

E-mail: alessandra.favero@embrapa.br

Autor correspondente: Naiana Barbosa Dinato, nanadinato@hotmail.com, +55 (16) 99462-4334

RESUMO

Dentro do gênero *Paspalum*, o grupo informal Plicatula é um dos mais promissores pela qualidade forrageira das espécies. A maioria dos acessos de *Paspalum* é tetraploide e apomítico e são raros os citotipos sexuais para maioria das espécies. Outro grupo peculiar dentro do gênero, é o grupo informal Malacophylla, do subgênero *Anachyris*, que reúne seis espécies distintas com variações morfológicas entre si, dentre essas, *Paspalum malacophyllum* se destaca como uma espécie com grande capacidade para a utilização como forrageira na pecuária. Para unir características localizadas em acessos distintos é necessário cruzá-los em nível tetraplóide e selecionar aqueles de interesse. Para isso, um dos possíveis desafios é a necessidade da sincronização de florescimento entre os genitores. A criopreservação de pólen pode superar esta situação de espécies com assincronia de florescimento. Este estudo visou realizar cruzamentos entre espécies que florescem entre janeiro a março (genitor feminino) e entre março a abril (doadores de pólen), portanto apresentavam assincronia de florescimento, e características de interesse para o melhoramento, utilizando pólen criopreservado, confirmando assim sua viabilidade *in vivo*. Os grãos de pólen foram coletados em campo e vasos na Embrapa Pecuária Sudeste e foram desidratados utilizando LiCl por 30' e sílica gel por 120' seguido da criopreservação. Os grãos de pólen ficaram armazenados em nitrogênio líquido por cerca de 12 meses, quando foram realizados cruzamentos inter e intraespecíficos entre janeiro e abril de 2018 e janeiro a março de 2019. O híbrido sintético (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) foi cruzado com dois acessos de *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) e um de *P. malacophyllum* (BGP 293). Plantas utilizadas como genitores femininos foram emasculadas pela manhã em casa de vegetação e polinizadas com pólen criopreservado. As inflorescências polinizadas foram protegidas para evitar contaminações e, após um mês, coletaram-se as sementes. Foram polinizadas 4173 espiguetas que resultaram em 186 cariopses cheias (4,45%), as quais foram plantadas em sementeiras. Vinte plântulas germinaram e foram posteriormente transplantadas em saquinhos. Para confirmar o sucesso dos cruzamentos com o pólen criopreservado, todas as plântulas das progênes obtidas foram avaliadas fenotipicamente com o uso de descritores morfológicos e, posteriormente, foi realizada a análise de marcadores microssatélites (SSR) e inter-microssatélites (ISSR). Foram avaliados descritores morfológicos descritos para *Paspalum* na progênie, os mesmos não foram avaliados no genitor feminino, pois as plantas foram obtidas por mudas e estavam adultas quando foram feitas as análises da progênie nas bandejas, assim, não foi possível identificar híbridos com as características morfológicas, e toda a progênie obtida foi analisada com marcadores moleculares. Esses marcadores foram selecionados na literatura com base nas espécies para os quais foram desenvolvidos e/ou avaliados. Inicialmente foram avaliados nos genitores dos cruzamentos a fim de selecionar aqueles que são polimórficos entre os genitores de cada cruzamento. Observou-se que, dos sete marcadores ISSR testados, cinco conseguiram diferenciar os genitores de alguns cruzamentos: (CT)₈-G, (AC)₈-T, (CA)₈-G (ATG)₅-GA e (GA)₈-C. Dos 50 marcadores microssatélites testados, 15 diferenciaram os genitores dos cruzamentos realizados. Foram avaliados, pelo menos, quatro marcadores polimórficos para cada cruzamento. Ao todo, foram identificados cinco híbridos, sendo um indivíduo do cruzamento (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - planta F₁ #10) x *P. atratum* (BGP 98), um do cruzamento (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - planta F₁ #42 x *P. atratum* (BGP 98), dois do cruzamento (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - planta F₁ #10) x *P. atratum* (BGP 308) e um do cruzamento (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv.

Azulão - planta F₁ #10) x *P. malacophyllum* (BGP 293). A criopreservação de grãos de pólen pode ser usada com sucesso para viabilizar cruzamentos entre espécies assíncronas.

Palavras-chave: criopreservação; hibridação; microssatélite, intermicrossatélite, grupo plicatula, *Paspalum malacophyllum*

ABSTRACT

Within the *Paspalum* genus, the informal group Plicatula is one of the most promising for the forage quality of the species. The majority of *Paspalum* accessions are tetraploid and apomitic and cytotypes are rare for most species. Another peculiar group within the genus is the informal group Malacophylla, of the subgenus *Anachyris*, which brings together six distinct species with morphological variations, among them, *Paspalum malacophyllum* stands out as a species with great capacity for use as forage in livestock. To join features located in different accessions, it is necessary to cross them at the tetraploid level and select those of interest. For this, one of the possible challenges is the need for flowering synchronization between parents. Pollen cryopreservation can overcome this situation of species with flowering asynchrony. This study aimed to carry out crosses between species that flower from January to March (female parent) and from March to April (pollen donors), therefore they had flowering asynchrony, and characteristics of interest for improvement, using cryopreserved pollen, thus confirming their viability *in vivo*. The pollen grains were collected in the field and in pots at Embrapa Pecuária Sudeste and were dehydrated using LiCl for 30' and silica gel for 120' followed by cryopreservation. The pollen grains were stored in liquid nitrogen for about 12 months, when inter and intraspecific crossings were carried out between January and April 2018 and January to March 2019. The synthetic hybrid (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plants F1 # 10, F1 # 4, F1 # 37 and F1 # 42) were crossed with two accessions of *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) and one of *P. malacophyllum* (BGP 293). Plants used as female parents were emasculated in the morning in a greenhouse and pollinated with cryopreserved pollen. The pollinated inflorescences were protected to avoid contamination and, after one month, the seeds were collected. 4173 spikelets were pollinated, resulting in 186 caryopses (4.45%), which were planted in seedbed. Twenty seedlings were germinated and were later transplanted into seedling bags. To confirm the success of the crosses with the cryopreserved pollen, all the seedlings of the progenies obtained were evaluated phenotypically using morphological descriptors and, subsequently, the analysis of microsatellite markers (SSR) and inter-microsatellites (ISSR) was performed. Morphological descriptors described for *Paspalum* were evaluated in the progeny. They were not evaluated in the female parent, as the plants were obtained by seedlings and were adult when the progeny analyzes were made in the trays, thus, it was not possible to identify hybrids with the morphological characteristics, and the entire progeny obtained was analyzed with molecular markers. Molecular markers were selected in the literature based on the species for which they were developed and / or evaluated. These markers were evaluated in the crossing parents in order to select those that are polymorphic among the parents of each crossing. It was observed that, of the seven ISSR markers tested, five managed to differentiate the parents of some crosses: (CT)₈-G, (AC)₈-T, (CA)₈-G (ATG)₅-GA and (GA)₈-C. Of the 50 microsatellite markers tested, 15 differentiated the parents from the performed crosses, at least four polymorphic markers were evaluated for each crossing. In total, five hybrids were identified, one individual from the crosses *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plant F1 # 10 x *P. atratum* (BGP 98), one of the cross (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plant F1 # 42) x *P. atratum* (BGP 98), two from the cross (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plant F1 # 10) x *P. atratum* (BGP 308) and one from the crossing (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plant F1 # 10) x *P. malacophyllum* (BGP 293). The cryopreservation of pollen grains can be successfully used to make crosses between asynchronous species viable.

Keywords: cryopreservation; hybridization; microsatellite, intermicrosatellite, plicatula group, *Paspalum malacophyllum*

4.0 INTRODUÇÃO

Paspalum tem sido considerado um dos gêneros mais importantes da família Poaceae por englobar o maior número de espécies nativas e com grande valor forrageiro utilizadas nas pastagens da América do Sul (NOVO et al., 2016). Com mais de 300 espécies, nativos da América, distribuí-se em regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes do Novo Mundo e alguns ocorrem no Velho Mundo (CLAYTON e RENVOIZE, 1986), especialmente encontrado no Brasil Central e sul, no sul da Bolívia, leste do Paraguai, no norte da Argentina e no Uruguai, México e Andes (ZULOAGA e MORRONE, 2005; MORRONE et al, 2012; CHASE, 1929).

Um dos grupos botânicos informais com maior número de representantes do gênero é o grupo Plicatula, agrupando mais de 30 espécies anuais e perenes (ORTIZ et al., 2013), algumas endêmicas a determinadas regiões e outras de ampla distribuição pelo continente americano (OLIVEIRA, 2004). *Paspalum scrobiculatum* L. e espécies relacionadas são uma exceção, pois sua ocorrência é observada na Ásia, África e Oceania (OLIVEIRA e VALLS, 2008). O grupo Plicatula impressiona pela heterogeneidade morfológica de suas espécies (KILLEEN, 1990), muitas das quais com apenas citotipos tetraplóides predominantemente apomíticas e com meiose irregular (VALLS e POZZOBON, 1987).

Algumas dessas espécies, como *Paspalum plicatulum* Michx., *P. guenoarum* Arechav. e *P. atratum* Sw., foram introduzidas no cultivo e usadas para forragem, não apenas nas Américas, mas também em outras regiões quentes do mundo (EVERS e BURSON, 2004; ACUÑA et al., 2019). Dentro do grupo, encontram-se espécies tetraplóides ($2n = 4x = 40$), diplóides ($2x$), triplóides ($3x$) e hexaplóides ($6x$) raros e também pode ser encontrado multiplóides, que possuem citotipos diplóides e poliplóides, geralmente os diplóides, reproduzem sexualmente e os poliplóides, por apomixia (NOVO et al., 2018).

Paspalum plicatulum é uma espécie perene de gramíneas distribuída pela América do Norte, América Central e América do Sul (TROPICAL FORAGES, 2020), os citotipos tetraplóides se reproduzem por apomixia e pseudogamia e são auto-compatíveis (BURSON e BENNETT, 1971). Os diplóides se reproduzem sexualmente e são alógamos devido à auto-incompatibilidade (ESPINOZA e QUARIN, 1997).

Uma espécie promissora tetraploide apomítica com características importantes para o programa de melhoramento do mesmo grupo (Plicatula) é *Paspalum atratum*, espécie que habita área úmida ou alagada, nativo da América do Sul, no Brasil é encontrado região central do Cerrado (Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais), e na Bolívia em Santa Cruz, porém foi

naturalizado como forragem e áreas que se estendem desde o equador (sudeste da Ásia) até os subtrópicos da Austrália, EUA e América do Sul (TROPICAL FORAGES, 2020). Em condições naturais, vegeta bem em solos úmidos e sujeitos ao alagamento temporário durante o verão, não tolerando áreas permanentemente inundadas e é menos tolerante a seca do que outras espécies (DA SILVEIRA e PEREZ, 2014). Possui excelente produção de forragem, curto período de estabelecimento e de rebrotação após a queima, apresenta boa aceitabilidade por bovinos, bubalinos e por equídeos, não havendo registro na literatura de fatores anti nutricionais, tolera pastejo intenso e cortes regulares, entretanto, é resistente a cigarrinha-das-pastagens (*Deois flavopicta* Stal), mas, é suscetível à doença da mancha foliar causada por *Bipolaris maydis* (FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

Uma outra espécie de grande importância é *Paspalum guenoarum*, é nativa da América do Sul, sendo encontrada na Argentina e Bolívia (TROPICAL FORAGES, 2020) e nos seguintes estados do Brasil: Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e no Distrito Federal (FLORA DO BRASIL 2020, 2020). É uma gramínea perene, apomítica, alotetraplóide ($2n = 4x = 40$) com alguns citótipos sexuais diplóides ($2n = 2x = 20$), desenvolve-se em touceiras com rizomas curtos e colmos férteis, as folhas são glabras com bordas serrilhadas, a inflorescência é uma panícula simples constituída de 3 a 10 racemos com 6 a 15 cm de comprimento. Nota-se que ela diferencia claramente de *Paspalum atratum* devido principalmente ao seu aspecto verde acinzentado na parte dorsal da folha. É uma boa gramínea para uso em pastagens, habitualmente de solos úmidos, com baixa drenagem, férteis e arenosos e também tolera sombra como outras plantas do grupo Plicatula (*P. nicorae* e *P. atratum*), tem boa aceitabilidade pelos animais e produz forragem de bom valor nutritivo (RAMÍREZ, 1954; FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

O fato de a maioria das plantas do grupo serem apomíticas e ter poucos diplóides sexuais e quase nenhum tetraplóide sexual, pode ser superado dobrando o número de cromossomos de plantas diplóides para produzir tetraploides sexuais (FORBES e BURTON, 1961), duas plantas tetraplóides sintéticas sexuais foram criadas dobrando o número cromossômico do citótipo diplóide sexual de *P. plicatulum* por meio de tratamentos com colchicina (SARTOR et al., 2009), esses genótipos denominados 4PT e 7PT, estão sendo muito utilizados em programas de melhoramento genético para fins de forragem, por exemplo, Novo et al. (2017) usaram autotetraploides sintéticos como progenitores do sexo feminino, identificados como 4PT em cruzamentos interespecíficos com várias espécies, dentre elas, *Paspalum guenoarum* cv. Azulão. Os híbridos interespecíficos com *P. plicatulum* sexual tetraploide identificados por Novo et al., (2017) mostraram níveis

satisfatórios de conjunto de sementes, e demonstraram que todas essas espécies compartilhavam genomas com cromossomos com importantes graus de homologia (SARTOR et al., 2009; AGUILERA et al., 2011; NOVO et al., 2013, 2016).

Essas características de homologia entre as espécies permitem o uso da troca de genes entre essas espécies através da hibridação e retrocruzamento, nesse cruzamento em específico (4PT *P. plicatulum* x *P. guenoarum* cv. Azulão) a taxa de sucesso de cruzabilidade foi de 32%, a progênie resultou em indivíduos sexuais e apomíticos, e usando marcadores AFLPs foi identificada a distância genética de 0,41 entre essas espécies, os indivíduos sexuais foram selecionados para entrar em programa de melhoramento genético (NOVO et al., 2017).

Uma outra espécie que tem se destacado em programas de melhoramento é *Paspalum malacophyllum*., conhecido como “Paspalum com nervuras”, por causa de suas sementes com nervuras distintas, essa espécie está inserida no grupo informal Malacophylla proposto por Chase (1929) e no subgênero *Anachyris* (MORRONE et al, 2012) é outra espécie de *Paspalum* que se reproduz principalmente por apomixia (HOJSGAARD et al., 2016).

Esta espécie localiza-se na extensão do México à Argentina e no Brasil, agrupa-se no Nordeste e no Sul do país. Também é encontrada na Bolívia e Paraguai (MORRONE et al., 2000; ZULOAGA e MORRONE, 2005). Possui três níveis de ploidia relatados, tetraplóide ($2n = 4x = 40$) que ocorrem em toda a sua área de distribuição (HONFI et al., 1990; BURSON e HUSSEY, 1998; HOJSGAARD et al. 2008, 2009), diplóide ($2n = 2x = 20$), restritos ao sul do Brasil (HOJSGAARD et al. 2008; POZZOBON et al., 2008), e hexaplóide ($2n = 6x = 60$) que foi relatado uma única vez (GOULD, 1975). Embora *P. malacophyllum* tenha boa palatabilidade como grama forrageira, ele não persiste bem sob pastagem. No entanto, a espécie é potencialmente útil como forrageira porque é uma fonte desejável de resistência a doenças e alta fertilidade das sementes (BURTON, 1940; STEPHENS, 1941).

No melhoramento genético de espécies apomíticas, a alta porcentagem de apomixia encontrada em alguns genótipos dificulta as hibridações, indivíduos sexuais tetraploides podem ser usados como genitores femininos em cruzamentos com plantas naturalmente apomíticas (4x), permitindo estudos genéticos de características agronômicas (incluindo a própria apomixia) (SARTOR et al., 2009).

A procura por novas espécies que assegurem a quantidade e qualidade da forragem produzida tem estimulado a coleta de plantas com potencial forrageiro. A variabilidade genética disponível viabiliza a ampliação da base genética nos programas de melhoramento genético pela busca de cultivares mais produtivas e de melhor valor nutritivo. A grande variabilidade presente no gênero *Paspalum* pode contribuir para a seleção e hibridação com outros grupos

genéticos adaptáveis às várias situações ecológicas tropicais e subtropicais (FONSECA e MARTUSCELLO, 2010).

Um grande problema enfrentado na busca dessas novas cultivares é a assincronia de florescimento entre as espécies de interesse para o programa de melhoramento genético. Por exemplo, as espécies selecionadas para esse estudo florescem em períodos diferentes e naturalmente, nas condições climáticas em que se encontram na cidade de São Carlos/SP, elas não poderiam se cruzar, já que o genitor feminino 4PT (*P. plicatulum* x *P. guenoarum* cv. azulão - plantas F₁#10, F₁#37, F₁#04, F₁#42 florescem entre janeiro e fevereiro enquanto que os doadores de pólen, nesse caso, *P. atratum* floresce entre março e abril e *P. malacophyllum*, entre fim de fevereiro a fim de março. Existem mecanismos capazes de retardar ou adiantar o florescimento, como dito anteriormente no Capítulo 2. Esses métodos que envolvem fotoperíodo e/ou uso de hormônios podem ser dispendiosos, pois dentre outros fatores, é necessário o conhecimento das características relacionadas à fisiologia e ecofisiologia da planta, bem como a fisiologia de florescimento e a dinâmica de perfilhamento (SANTOS, 2002).

Deste modo, o uso de grãos de pólen conservados em nitrogênio líquido é uma alternativa viável e com resultados positivos de viabilidade encontrado na literatura (DINATO et al., 2018).

Este estudo visou realizar cruzamentos entre espécies que florescem entre janeiro a março (genitor feminino) e entre março a abril (doadores de pólen), portanto apresentavam assincronia de florescimento, e características de interesse para o melhoramento, utilizando pólen criopreservado, confirmando assim sua viabilidade *in vivo*.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Material Vegetal

Foram selecionados para a criopreservação de grãos de pólen e posteriores cruzamentos, dois genótipos de *Paspalum atratum* Sw. (BGP 98 e BGP 308) e um de *Paspalum malacophyllum* Trin. (BGP 293), genoma MMMM, devido ao seu potencial forrageiro e por essas plantas apresentarem períodos de florescimentos distintos, o que não ocasionaria uma hibridação natural ou artificial entre as espécies, ou seja, as combinações propostas apresentam assincronia de florescimento, pois nas condições de São Carlos/SP, *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁#10, F₁#37, F₁#04, F₁#42 florescem entre janeiro e fevereiro

enquanto que os doadores de pólen, *P. atratum* floresce entre março e abril e *P. malacophyllum*, entre fim de fevereiro a fim de março. Os genitores femininos utilizados foram quatro plantas F₁ sexuais do cruzamento *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão (Tabela 11), as únicas plantas sexuais tetraploides do Grupo Plicatula disponíveis no programa de melhoramento de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, gentilmente cedidas pela Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Sartor et al (2009) desenvolveram uma planta sexual tetraploidizada artificialmente de *P. plicatulum*, denominada 4PT. Vinte plantas híbridas F₁ sexuais derivadas do cruzamento *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão foram obtidas com sucesso por NOVO et al. (2017), sendo que as plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42 foram utilizadas neste trabalho. Plantas destes híbridos foram adquiridas por meio de mudas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), localizado na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos – SP. As plantas foram transplantadas para vasos de 8 litros com dimensões de 23x24cm. Dez clones de cada planta foram utilizados nos cruzamentos. Após três meses do plantio dos genitores femininos em vasos grandes, essas foram transplantadas em vasos menores para facilitar o transporte para dentro da câmara umidificadora no momento das hibridações. Foram preparados 21 vasos da planta F₁ #10, 17 vasos da planta F₁ #4, 21 vasos da planta F₁ #37 e 19 da planta F₁ #42.

Sementes dos acessos utilizados como genitores masculinos (doadores de pólen apomíticos tetraplóides) BGP 293, BGP 98 e BGP 308 estavam armazenadas em câmara fria e foram cedidas pelo curador do BAG. O plantio dos genitores masculinos foi realizado em sementeiras e 20 plântulas foram posteriormente transplantadas para saquinhos de mudas. Após 3 meses, essas plantas foram transplantadas para vasos redondos de dois litros (18x15 cm) e mantidas em casa de vegetação. Após seis meses, as plantas foram transplantadas para vasos de oito litros (23 x 24cm) e mantidas em casa de vegetação.

Tabela 11 - Características dos materiais utilizados como genitor masculino (3, 5 e 6) e genitor feminino (7) nos cruzamentos interespecíficos de *Paspalum* sp. propostos no capítulo

Código BAG e Híbrido	Espécie	Código Coletor	Local	Grupo Informal Botânico	Modo de reprodução	Ploidia
BGP 293 (3)	<i>Paspalum malacophyllum</i> Trin.	V 14606	Japorã - MS - BR	Malacophylla	Apomítico	Autotetraplóide
BGP 98 (5)	<i>Paspalum atratum</i> Sw.	V S W 9880	Terenos - MS - BR	Plicatula	Apomítico	Alopoliploide segmentar
BGP 308 (6)	<i>Paspalum atratum</i> Sw.	V 14525	Terenos - MS - BR	Plicatula	Apomítico	Alopoliploide segmentar
F ₁ #10, F ₁ #04, F ₁ #37 e F ₁ #42 (7)	(<i>Paspalum plicatulum</i> 4PT) x <i>Paspalum guenoarum</i> cv. Azulão)	----	----	Plicatula	Sexual	Tetraplóide

Código do coletor: V= José Francisco Montenegro Valls; S= Charles S. Simpson; W= Wantuil Werneck
 β material proveniente do programa de melhoramento genético de *Paspalum* da Universidad Nacional del Nordeste, Argentina

4.1.2 Cruzamentos intra e interespecíficos

Após aproximadamente 12 meses, as amostras de grãos de pólen que foram dissecadas com Cloreto de Lítio por 30 minutos e Sílica gel por 120 minutos e posteriormente criopreservados conforme protocolo descrito no Capítulo 2, foram retiradas do criotank e utilizadas em cruzamentos com os genótipos sexuais de *Paspalum*. Entre janeiro e abril de 2018 e janeiro a março de 2019 foram realizados os cruzamentos entre as plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42 de *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão com *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) e *P. malacophyllum* (BGP 293).

A técnica de cruzamentos consiste em preparar os genitores femininos para cruzamento na tarde anterior, retirando as espiguetas do meio do racemo, deixando apenas duas fileiras de espiguetas para facilitar a polinização. Em seguida, colocam-se as plantas dentro da câmara úmida. O umidificador foi ligado às 9h da manhã, permanecendo desta forma até a saída das anteras dos floretes, que para as plantas do 4PT azulão, ocorreu por volta das 11 horas da manhã. Aproximadamente entre 11:30 as 13:30h, as anteras dos acessos já estavam expostas e foram retiradas com o auxílio de uma pinça. Logo em seguida, as plantas emasculadas foram retiradas da câmara e sob o estigma exposto foram pincelados grãos de pólen do genitor masculino criopreservados e descongelados adequadamente, conforme descrito no item 2.3 do capítulo 2. As inflorescências polinizadas foram protegidas com saquinhos de papel manteiga para evitar contaminações. A operação foi realizada vários dias seguidos, até que a antese ocorresse em todas as espiguetas da inflorescência e em todas as inflorescências de cada vaso.

4.1.3 Coleta de sementes e germinação

Após 28 dias da polinização, coletou-se as sementes quando já estavam em queda natural. As sementes foram secas ao sol por cinco dias e armazenadas em saquinhos de papel dentro da câmara fria, a 10°C e sob umidade relativa de 20%.

4.1.4 Germinação das sementes e análise morfológica das plantas

Após a coleta e separação manual de espiguetas cheias dos possíveis híbridos, estas foram colocadas para germinar em sementeiras na casa de vegetação, no fim de setembro, posteriormente transplantadas para saquinhos de muda com terra adubada, para o experimento de 2018. No experimento de 2019, devido à baixa germinação observada nas sementes do cruzamento de 2018 e a presença de fungos, optou-se por tratar as sementes com Thiram 0,5%

antes da germinação, a fim de melhorar as condições de germinação. Após o tratamento com fungicida, as sementes foram colocadas para germinar em placa petri em papel de germinação na estufa incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand). Quando as plântulas começaram a emergir das sementes, essas foram transplantadas em sementeiras e mantidas em BOD até o crescimento da planta atingir uma altura e vigor que sobrevivesse no vaso (em torno de 20 dias). Logo quando atingiu o tamanho esperado, as plantas foram transplantadas para vasos de oito litros e acondicionadas na casa de vegetação.

Todas as plantas que germinaram foram analisadas morfológicamente até completar 150 dias após o plantio, e posteriormente foram transplantados para vasos e mantidos na casa de vegetação.

4.1.5 Confirmação de hibridação com marcadores SSR e ISSR

Folhas das plantas das progênies e dos genitores foram coletadas para a realização da caracterização molecular no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Pecuária Sudeste.

O DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico total foi isolado de folhas jovens usando o protocolo baseado em CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Doyle e Doyle (1987), com pequenas alterações, como descrito no Capítulo 3.

A concentração do DNA obtido foi determinada pelo uso de espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e sua qualidade verificada por eletroforese (100 V) em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10% e visualizado em seguida, expostos à luz ultravioleta e fotografados no fotodocumentador Bio-Rad Gel DocTM XR⁺. Para obter o “DNA uso” as amostras tiveram suas concentrações padronizadas em 10 ng/μL, através de diluições em água milliQ.

Marcadores microssatélites específicos para espécies do grupo *Plicatula* (CIDADE et al., 2010; OLIVEIRA et. al., 2016) e para espécies do grupo *Dilatata* (SPERANZA e MALOSETTI, 2007) foram avaliados (Tabela 13) nos genitores dos cruzamentos. A amplificação dos fragmentos foi realizada de acordo com Cidade et al., (2009). Os produtos das amplificações foram resolvidos inicialmente em géis de agarose 1,5% corados com brometo de etídeo e posteriormente em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata, segundo protocolo descrito por Creste et al. (2001). Para todos os marcadores SSR foi utilizado protocolo de Cidade et al. (2009) para amplificação por PCR, exceto para os marcadores Pdf1 8 e Pdf1 18 (SPERANZA e MALOSETTI, 2007), que foi usado protocolo de PCR igual aos demais marcadores do capítulo 3 e a amplificação por PCR foi realizado por 5 minutos a 94° C, 40

ciclos de 15 segundos à 94° C, 3 minutos na temperatura específica do primer, 1 min a 72°C, mais 5 minutos a 72°C .

Os marcadores ISSR foram escolhidos a partir de trabalhos da literatura que utilizaram esse tipo de marcador em *Paspalum* ou outras gramíneas (CIDADE et al., 2008; BRUGNOLI et al., 2013; USANDIZAGA et al., 2015) (Tabela 13). As reações de PCR dos marcadores ISSR foram conduzidas de acordo com o descrito no Capítulo 3 desta tese.

Todos os marcadores foram avaliados em todos os genitores a fim de identificar os locos polimórficos para cada combinação. As similaridades genéticas entre os genitores usados nos diferentes cruzamentos foram determinadas usando marcador microsatélite e intermicrosatélite. Os marcadores foram considerados como dominantes considerando a presença e a ausência de bandas (1 e 0), que gerou uma matriz binária. Foi estimado o coeficiente de similaridade de Jaccard (S) (CRUZ et al., 2011) utilizando o software NTSYSpc versão 2.1 (ROHLF, 2000).

Todos os marcadores foram avaliados em todos os genitores a fim de identificar os locos polimórficos para cada combinação. Os marcadores polimórficos para cada cruzamento foram, então, genotipados nas respectivas famílias, tendo sido avaliados de quatro a oito locos polimórficos para cada família. A genotipagem para ambos os tipos de marcadores foi realizada de acordo com a presença ou ausência de bandas nos indivíduos. Foram consideradas híbridas aquelas progênes que apresentaram a banda oriunda do genitor masculino que não estava presente no genitor feminino, nos locos polimórficos avaliados.

A taxa de formação de híbridos foi calculada, considerando o número de confirmação de híbridos molecularmente pelo número de polinizações efetivadas.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 4.173 espiguetas dos híbridos tetraplóides sexuais (plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42 de *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) foram polinizadas com grãos de pólen dos genitores masculinos descritos nesse trabalho entre os meses de janeiro a fevereiro de 2018 e janeiro a março de 2019. Destas, apenas 186 formaram cariopses, gerando uma taxa de cariopses de 4,45% (Tabela 12). A cruzabilidade de duas espécies é calculada como a porcentagem de floretes emasculados e polinizados manualmente, produzindo uma cariopse viável (BENNET e BASHAW, 1966).

Nos cruzamentos realizados em 2018, observou-se que o genitor feminino planta F₁#10 apresentou muitas sementes contaminadas supostamente com fungo *Ustilago operta*,

devido às características da semente (FERNANDES et al., 2017). Do total de 148 cariopses, foram obtidas cinco plantas, uma taxa de germinação de 3,37%. Essas foram avaliadas morfológicamente a fim de obter características que as identificasse como híbridas, porém todas apresentavam características morfológicas intermediárias entre os pais, como comprimento e largura das lâminas foliares, entretanto o reconhecimento da origem híbrida da progênie foi possível por análise de marcadores moleculares: bandas exclusivas do genitor masculino foram consideradas indicativas de hibridação quando as bandas foram observadas em qualquer planta individual da progênie.

Dinato et al. (2018) observaram que com *Paspalum notatum* a germinação do tubo polínico no estigma foi mais eficiente quando o grão de pólen foi desidratado com sílica gel azul, obtendo uma média de 82% de germinação, o que não ocorreu quando os grãos foram desidratado com cloreto de lítio, que apresentou 42,80% de germinação do tubo polínico no estigma.

Nos cruzamentos de 2019, a fim de minimizar os efeitos causados pelo fungo, já que a maioria dos cruzamentos realizados foi feita com a planta F1#10, optou-se por tratar as sementes com fungicida antes da germinação das mesmas, a qual foi realizada em BOD. Acredita-se que esse método foi mais eficaz que o anterior, pois de um total de 38 cariopses, quinze germinaram, o que corresponde a 39,47%, bem maior comparado com o cruzamento do ano anterior.

Apesar do problema com fungo, essa planta foi a mais utilizada como genitor feminino, pois dentre os quatro genótipos disponíveis, apenas as plantas F1#10 e F1#37, apresentaram alta taxa de florescimento, nos outros dois genótipos disponíveis o florescimento foi pouco e em alguns vasos não ocorreu formação de inflorescências, embora a planta F1#37 tenha sido utilizada, poucas cariopses germinaram do cruzamento com essa planta, tendo maior porcentagem de germinação as cariopses provenientes dos cruzamentos com a planta F1#10.

Os resultados de cruzabilidade entre as combinações deste trabalho corroboram com os observados por outros autores envolvendo hibridações em espécies de *Paspalum*. Aguilera et al. (2011) observaram uma taxa de cruzabilidade de 35% entre *P. plicatulum* 4PT e *P. guenoarum* cv. Rojas, esses autores obtiveram progênie F1 com um fenótipo intermediário aos pais e segregados para apomixia. Esses primeiros resultados demonstraram que era possível trocar genes entre essas espécies e gerar híbridos férteis interespecíficos no nível tetraplóide. Já Novo et al. (2016), realizando cruzamentos entre *Paspalum plicatulum* 4PT e *Paspalum oteroi*, obtiveram porcentagem de cruzabilidade de 4,8%. A distância genética entre as espécies pode contribuir para a observação da baixa ou alta taxa de cruzabilidade entre os genótipos.

Novo et al. (2017) em cruzamento com *P. plicatum* 4PT e 22 genótipos sexuais e apomíticos tetraplóides obtiveram conjunto de sementes (proporção de espiguetas polinizadas que formaram cariopses) que variou de 1 a 51,5% , a maior taxa de cruzabilidade foi observada nos cruzamentos onde *P. plicatum* Hojs388 e três acessos de *P. guenoarum* (Azulão , Baio e GR19) foram usados como genitores masculinos. Um total de 427 plantas germinou de 922 sementes; no entanto, a germinação variou entre 10,2 e 100%. O sucesso das hibridações entre *P. plicatum* 4PT e *P. guenoarum* estão relacionadas a estreita relação citogenética observada anteriormente entre essas duas espécies. Aguilera et al. (2011) mostraram que híbridos tetraplóides de *P. plicatum* x *P. guenoarum* tinham associações cromossômicas bivalentes e quadrivalentes bastante semelhantes às observadas na meiose em seus pais, indicando que ambas as espécies são autotetraploides e compartilham genomas com um importante grau de homologia.

Tabela 12 - Porcentagem de cruzabilidade entre as combinações descritas no capítulo, utilizando grãos de pólen desidratados com sílica gel por 120 minutos e cloreto de lítio por 30 minutos e armazenados no nitrogênio líquido por até 10 meses, número de híbridos por cruzamento e taxa de formação de híbridos para cada combinação.

Combinações de Cruzamentos	Tratamento de criopreservação de pólen	Nº polinizações	Nº cariopses	% de cariopses obtidas	Nº Plantas germinadas	% Germinação	Híbridos confirmados molecularmente	Taxa de formação de híbridos
F ₁ #10 x BGP 98 2018	Silica 120'	180	4	2.22	1	25.00	1	0,005%
	LiCl 30'	323	11	3.41	0	0.00	-----	0%
F ₁ #04 x BGP 98 2018	Silica 120'	75	0	0.00	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	48	2	4.17	0	0.00	-----	0%
F ₁ #37 x BGP 98 2018	Silica 120'	403	13	3.23	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	322	5	1.55	0	0.00	-----	0%
F ₁ #37 x BGP 308 2018	Silica 120'	358	44	12.29	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	174	40	22.99	0	0.00	-----	0%
F ₁ #42 x BGP 98 2018	Silica 120'	124	13	10.48	3	23.08	1	0,008%
	LiCl 30'	123	1	0.81	0	0.00	-----	0%
F ₁ #10 x BGP 308 2018	Silica 120'	218	0	0.00	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	108	15	13.89	1	6.67	0	0%
F ₁ #10 x BGP 98 2019	Silica 120'	99	4	4.04	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	68	4	5.88	0	0.00	-----	0%
F ₁ #10 x BGP 308 2019	Silica 120'	316	14	4.43	5	35.71	2	0,006%
	LiCl 30'	226	1	0.44	1	100.00	0	0%
F ₁ #10 x BGP 293 2019	Silica 120'	201	9	4.48	7	77.78	1	0,005%
	LiCl 30'	265	2	0.75	1	50.00	0	0%

... continuação da Tabela 12

Combinações de Cruzamentos	Tratamento de criopreservação de pólen	Nº polinizações	Nº cariopses	% de cariopses obtidas	Nº Plantas germinadas	% Germinação	Híbridos confirmados molecularmente	Taxa de formação de híbridos
F ₁ #37 x BGP 98 2019	Silica 120'	212	1	0.47	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	81	0	0.00	0	0.00	-----	0%
F ₁ #37 x BGP 308 2019	Silica 120'	124	1	0.81	1	100.00	0	0%
	LiCl 30'	68	2	2.94	0	0.00	-----	0%
F ₁ #42 x BGP 98 2019	Silica 120'	57	0	0.00	0	0.00	-----	0%
	LiCl 30'	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0%
Total		4173	186		20		5	

Um total de 50 marcadores SSR e sete marcadores ISSR foram pré-selecionados e avaliados nos genitores (Tabela 13) para escolha dos polimórficos para cada combinação de genitor. Dos quais cinco ISSR conseguiram diferenciar os genitores de alguns cruzamentos: ISSR 1 (CT)8-G, ISSR 2 (AC)8-T, ISSR 8 (CA)8-G, ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C (CIDADE et al., 2008; BRUGNOLI et al., 2013; USANDIZAGA et al., 2015) e 15 marcadores SSR (PA02C3, PA02B6, PA02A5, PA01B7, Pp-UNICAMP6, Pp-UNICAMP8, Pp-UNICAMP11, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP19, Pp-UNICAMP 21, Pp-UNICAMP 24, Pdf-18, PR-15, PR-31 e PR-44) foram capazes de diferenciar os indivíduos na progênie, esses marcadores estão identificados com asterisco na Tabela 13, eles então foram avaliados nas progênies das combinações de cruzamentos realizadas para identificar se havia polimorfismo e para a identificação dos indivíduos híbridos (Tabela 14). Todos eles apresentavam pelo menos uma banda exclusiva do genitor masculino que não estava presente no genitor feminino. Ao todo 05 indivíduos híbridos foram identificados usando marcadores SSR e ISSR (Tabela 13).

De acordo com resultados da Tabela 14 é possível observar que dos 15 marcadores SSR utilizados para identificar aos híbridos na progênie, 12 (PA02C3, PA02A5, Pp-UNICAMP6, Pp-UNICAMP8, Pp-UNICAMP11, Pp-UNICAMP19, Pp-UNICAMP24, PR-15, PR-31, PR-44 e Pdf-18) diferenciou os indivíduos nos cruzamentos entre *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) e os dois ISSR [ISSR 9 (ATG)5-GA e ISSR 10 (GA)8-C] foram capaz de diferenciar a progênie nessa combinação.

Já no cruzamento entre cruzamentos entre *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x BGP 293 (*P. malacophyllum*) seis marcadores SSR (PA01B7, PA02B6, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP19, PR-15, Pdf-18) e quatro ISSR [ISSR 1 (CT)8-G, ISSR 2 (AC)8-T, ISSR 8 (CA)8-G e ISSR 10 (GA)8-C] foram capazes de diferenciar a progênie.

Sendo assim, constatou-se que para todas as combinações de cruzamentos interspecíficos desse capítulo, os marcadores SSR (Pp-UNICAMP19 e PR-15) e ISSR 10 (GA)8-C foram suficientes e eficazes para separar as progênies, então pode-se dizer que para essas combinações esses marcadores são promissores.

Tabela 13 - Marcadores moleculares microssatélites (SSR) e intermicrossatélites (ISSR) avaliados nos genitores *plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão (7), *P. malacophyllum* (3), *P. atratum* (5 e 6) usados nas diferentes combinações de cruzamentos.

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	Nº de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (nº de genitores que amplificam/nº de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. atratum</i>	<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. plicatum</i> x <i>P. guenoarum</i>
PA01E10	<i>P. atratum</i>	Cidade et al. (2013)	54	186 - 210	1 a 2	N	-	-			2/2	0/2	4/4
PA01B7*			60	239-279	1 a 2	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PA01C1			58	231	0*	-	-	-			-	-	-
PA01F10			50	194-240	1 a 4	S	-	-	1 a 4	7	2/2	2/2	4/4
PA02A5*			56	122-132	2 a 5	N	(7) x (5 e 6)	S	0 a 9	15	2/2	0/2	4/4
PA02B1			60	130-170	2 a 4	N	-	-			0/2	2/2	4/4
PA02B6*			60	169	1 a 5	S	(7) x (3)	N			2/2	2/2	4/4
PA02C3*			60	240-250	1 a 4	S	(7) x (5 e 6)	S	1 a 4	11	2/2	2/2	4/4
PA02F8			*TD	166-200	1 a 3	N	-	-	0 a 2	6	2/2	2/2	0/4
PA02G11	<i>P. atratum</i>	Cidade et al. (2010)	*TD	144-176	1	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PA02H4			*TD	218	0*	-	-	-			-	-	-
PA02H9			*TD	270-330	2	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PP01A5			60	257	3	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PP01B3			50	217	1	N	-	-			2/2	2/2	0/4
PP01D11			60	245	2	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PP01F3			60	180	2	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PP02D2			*TD	249	1	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PP02D6			*TD	223	1	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PP02F2			54	164	1 a 6	S	-	-			2/2	2/2	4/4

*TD = touchdown (60-55°C). Negrito: Genitores indicados na tabela 11. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

... continuação da Tabela 13

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	N° de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (n° de genitores que amplificam/n° de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. atratum</i>	<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. plicatum</i> x <i>P. guenoarum</i>
Pp-UNICAMP01			60	173-181	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP02			51	187-203	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP03			60	127-167	2 a 6	S	-	-			2/2	2/2	4/4
PpUNICAMP04			60	133-151	0*	-	-	-			-	-	-
PpUNICAMP05			60	157-173	2 a 4	N	-	-			0/2	0/2	4/4
Pp-UNICAMP06*			51	155-169	1 a 4	S	(7) x (5 e 6)	S	0 a 4	9	2/2	2/2	4/4
Pp-UNICAMP07			65	222-258	1	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP08*			51	144-170	1 a 2	N	-	-	0 a 4	11	2/2	2/2	0/4
Pp-UNICAMP09			56	228-260	1 a 5	N	-	-			2/2	2/2	0/4
Pp-UNICAMP10			60	230-256	1 a 4	N	-	-			0/2	0/2	0/4
Pp-UNICAMP11*			60	232-266	1 a 6	N	(7) x (5 e 6)	S	0 a 9	16	2/2	0/2	4/4
Pp-UNICAMP12			65	213-277	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP13	<i>P. plicatum</i>	Oliveira et al. (2016)	55	116-142	2	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP14			63	223-243	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP15*			55	152-166	3 a 7	N	-	-	0 a 15	22	0/2	2/2	4/4
PpUNICAMP16			55	258-300	1	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP17			57	147-191	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP18			65	119-153	2 a 4	N	-	-	0 a 10	18	2/2	1/2	4/4
Pp-UNICAMP19*			57	203-241	2 a 7	S	-	-	2 a 9	20	2/2	2/2	4/4
Pp-UNICAMP20*			65	156-162	0*	-	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP21			55	145-205	2 a 4	N	(7) x (5 e 6)	S	0 a 5	14	2/2	0/2	4/4
Pp-UNICAMP22			65	133-137	2	S	-	-			-	-	-
Pp-UNICAMP23			55	230-254	1 a 2	N	-	-			0/2	2/2	0/4
Pp-UNICAMP24*			63	179-215	1 a 3	N	(7) x (5 e 6)	S	0 a 3	5	2/2	0/2	4/4
Pp-UNICAMP25			63	218-316	1 a 3	N	(7) x (5 e 6)	N			2/2	0/2	0/4

Negrito: Genitores indicados na tabela 11. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

... continuação da Tabela 13

Marcadores	Espécie	Referência	Temperatura de amplificação (°C)	Tamanho esperado de amplificação (pb)	Nº de alelos	Amplifica em todos genitores (S/N)	Cruzamentos em que os genitores são polimórficos	Genotipado (S/N)?	Alelos por indivíduo	Alelos por loco	Transferibilidade (nº de genitores que amplificam/nº de genitores avaliados, por espécie)		
											<i>P. atratum</i>	<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. plicatum x P. guenoarum</i>
PR – 15*	<i>P. regnellii</i>	Cidade et al. (2009)	60	188-255	1 a 2	S	(7) x (3)	S	1 a 4	8	2/2	2/2	4/4
PR – 31*			60	276-274	1 a 2	N	(7) x (5 e 6)	S	0 a 5	9	2/2	0/2	4/4
PR – 25			60	137-146	1 a 2	N	-	-	0 a 3	8	0/2	2/2	0/4
PR – 44*			60	130-157	2 a 4	N	(7) x (5 e 6)	S	0 a 4	7	2/2	0/2	4/4
Pdfl - 8	<i>P. urvillei</i>	Malosetti e Speranza (2007)	53	198-238	1 a 5	S	-	-	0 a 4	10	2/2	2/2	4/4
Pdfl – 18*			53	251-306	2 a 6	N	(7) x (5 e 6)	S	2 a 5	14	2/2	2/2	2/4
ISSR 1* (CT) ₈ -G	<i>P. notatum</i> , <i>P. simplex</i>	Cidade et al. (2008), Brugnoli et al. (2013)	49	~2000 a 400	1 a 4	S	(7) x (3)	S	2 a 7	15	2/2	2/2	4/4
ISSR 2* (AC) ₈ -T			49	~2000 a 450	1 a 4	S	(7) x (3)	S	3 a 10	18	2/2	2/2	4/4
ISSR 6 (GT) ₈ -C	<i>P. simplex</i> , <i>Acroceras macrum</i>	Brugnoli et al. (2013), Usandizaga et al. (2015)	48	~1650 a 650	1 a 3	N	-	-	0 a 2	5	2/2	2/2	0/4
ISSR 8* (CA) ₈ -G			48	~1650 a 650	2 a 6	S	(7) x (3)	S	1 a 7	14	2/2	2/2	4/4
ISSR 7 (AG) ₈ -C	<i>P. simplex</i>	Brugnoli et al. (2013)	49	~2500 a 350	6 a 9	S	-	-	3 a 8	13	2/2	2/2	4/4
ISSR 9* (ATG) ₅ -GA	<i>Acroceras macrum</i>	Usandizaga et al. (2015)	42	~2500 a 650	2 a 8	S	(7) x (5 e 6)	S	2 a 10	23	2/2	2/2	4/4
ISSR 10* (GA) ₈ -C			48	~1500 a 650	4 a 5	S	(7) x (3)	S	3 a 9	20	2/2	2/2	4/4

Negrito: Genitores indicados na tabela 11. *marcador selecionado para ser avaliado na progênie.

Ao todo cinco indivíduos híbridos foram identificados usando marcadores SSR e ISSR (Tabela 14). No cruzamento entre *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão (plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x *P. atratum* (5; 6) no ano de 2018 foram identificados dois híbridos que tiveram bandas específicas do genitor masculino nos seguintes marcadores: ISSR 9 e ISSR 10 (Figura 17), PA02C3 e Pp- UNICAMP 08. No cruzamento entre o híbrido (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x *P. atratum* (BGP 98; BGP 308) no ano de 2019 foram identificados dois híbridos com os marcadores PA02C3 (Figura 16) e PR 44. No cruzamento entre o híbrido (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão - plantas F₁ #10, F₁ #4, F₁ #37 e F₁ #42) x *P. malacophyllum* (BGP 293) foi identificado um híbrido com marcador PR-15. Observou-se que todos os híbridos identificados foram oriundos de cruzamentos com grãos de pólen desidratados com Silica gel azul, enquanto que as hibridações com pólen desidratado com Cloreto de Lítio não apresentaram nenhuma semente germinada para esses cruzamentos.

Sabe-se que a umidade relativa do Cloreto de Lítio varia de 11 a 15%, dependendo da temperatura utilizada no momento da desidratação (BUTINK et al., 1998), enquanto que a Sílica gel azul tem umidade relativa de 10% à temperatura de 25°C (ALMEIDA, et al., 2011), isso pode ter influenciado no sucesso das hibridações, embora esse resultado não tenha sido observado nos cruzamentos realizados no Capítulo 3, no qual os cruzamentos foram bem sucedidos com ambos tratamentos de desidratação.

Tabela 14 - Identificação de híbridos de *Paspalum* por marcador molecular nos cruzamentos realizados em 2018 e 2019.

Marcador/cruzamento		<i>(P. plicatulum</i> 4PT x <i>P. guenoarum</i> cv. Azulão - plantas F ₁ #10, F ₁ #42, F ₁ #37, F ₁ #04) x BGP 98 e BGP 308 (<i>P. atratum</i>)	<i>(P. plicatulum</i> 4PT x <i>P. guenoarum</i> cv. Azulão - plantas F ₁ #10 e F ₁ #37) x BGP 308 (<i>P. atratum</i>)	<i>(P. plicatulum</i> 4PT x <i>P. guenoarum</i> cv. Azulão - planta F ₁ #10) x BGP 293 (<i>P. malacophyllum</i>)
		(2018)	(2019)	(2019)
ISSR 1 (CT) ₈ -G	polimórfico n° híbridos			x N/A
ISSR 2 (AC) ₈ -T	polimórfico n° híbridos			x N/A
ISSR 8 (CA) ₈ -G	polimórfico n° híbridos			x N/A
ISSR 9 (ATG) ₅ -GA	polimórfico n° híbridos	x 2	x 0	
ISSR 10 (GA) ₈ -C	polimórfico n° híbridos	x 2	x 0	x 0

... continuação da Tabela 14

Marcador/cruzamento		<i>(P. plicatum 4PT x P. guenoarum cv. Azulão - plantas F1 #10, F1 #42, F1 #37, F1 #04) x BGP 98 e BGP 308 (P. atratum) (2018)</i>	<i>(P. plicatum 4PT x P. guenoarum cv. Azulão - plantas F1 #10 e F1 #37) x BGP 308 (P. atratum) (2019)</i>	<i>(P. plicatum 4PT x P. guenoarum cv. Azulão - planta F1 #10) x BGP 293 (P. malacophyllum) (2019)</i>
PA01B7	polimórfico n° híbridos			x N/A
PA02A5	polimórfico n° híbridos	x 0	x 0	
PA02B6	polimórfico n° híbridos			x 0
PA02C3	polimórfico n° híbridos	x 1	x 2	
Pp-UNICAMP06	polimórfico n° híbridos	x 0	X N/A	
Pp-UNICAMP08	polimórfico n° híbridos	x 1	X N/A	
Pp-UNICAMP11	polimórfico n° híbridos	x N/A	X N/A	
Pp-UNICAMP15	polimórfico n° híbridos			x N/A
Pp-UNICAMP19	polimórfico n° híbridos	x 0	X N/A	x N/A
Pp-UNICAMP21	polimórfico n° híbridos	x 0	X N/A	
Pp-UNICAMP24	polimórfico n° híbridos	x 0	X N/A	
Pdfl- 18	polimórfico n° híbridos	x 0	X 0	x N/A
PR - 15	polimórfico n° híbridos	x 0	X 0	x 1
PR - 31	polimórfico n° híbridos	x 0	X 0	x 0
PR - 44	polimórfico n° híbridos	x 0	X 2	x 0
Total de híbridos por cruzamento		2	2	1

N/A – não avaliado

No presente trabalho, foi usado como genitor masculino *Paspalum atratum* com $2n = 4x = 40$ cromossomos que formam bivalentes, com ocasionais univalentes ou quadrivalentes. A presença de quadrivalentes indica que existe uma homologia segmentar entre os dois genomas ou que houve uma translocação cromossômica (QUARÍN et al, 1997).

Para calcular a similaridade genética entre os genitores, foram utilizados os padrões polimórficos de 18 marcadores SSR (PA02C3, PA02A5, PA02F8, PA01F10, Pp-UNICAMP6, Pp-UNICAMP-8, Pp-UNICAMP 11, Pp-UNICAMP15, Pp-UNICAMP18, Pp-UNICAMP19, Pp-UNICAMP21, Pp-UNICAMP 24, Pdf1-8, Pdf1-18, PR-25, PR-15, PR-31, PR-44) e sete ISSR [(CT)8-G, 2 (AC)8-T, 6 (GT)8-C, 8 (CA)8-G, (AG)8-C, (ATG)5-GA, (GA)8-C].

Observou-se que alguns marcadores não amplificaram em alguns genitores (Tabela 13), por exemplo, para os genitores femininos, plantas F1 #10, F1 #4, F1 #37 e F1 #42 de *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão (7) e genitores masculinos de *P. atratum* (5, 6) três marcadores não amplificaram, enquanto que para o genitor masculino *P. malacophyllum* (3), considerando todos marcadores SSR avaliados, apenas 9 amplificaram.

As similaridades genéticas variaram de 9,84% a 10,16% entre (*P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#10) e *P. atratum* (BGP 308 e BGP 98), 9,68% entre *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#42) e *P. atratum* (BGP 98), 7,03% entre *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#37) e *P. atratum* (BGP 308) e 13,16% entre *P. plicatum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – planta F1#10) e *P. malacophyllum* (BGP 293) (Figura 15).

Era esperada uma maior similaridade entre *P. atratum* e as espécies que originaram os genitores femininos (*P. plicatum* 4PT e *P. guenoarum* cv. Azulão), pois elas pertencem ao grupo informal Plicatula *P. malacophyllum*, que pertence a outro grupo e outro subgênero, apresentou maior similaridade com os genitores femininos do que *P. atratum*. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que os marcadores SSR utilizados foram desenvolvidos para *P. atratum* e *P. plicatum*, o que refletiu também na ausência de amplificação da amostra de *P. malacophyllum* em seis dos 12 SSR avaliados. Os genitores femininos apresentaram diferença entre si por se tratarem de híbridos interespecíficos (irmãos completos) que ainda estão segregando.

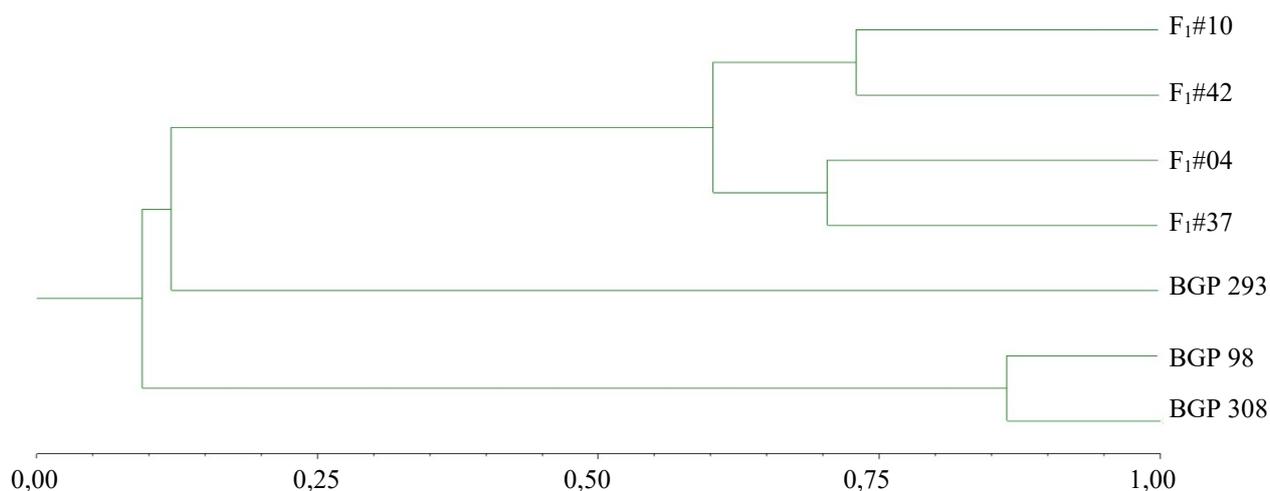


Figura 15. Dendrograma de análise de agrupamento (UPMGMA), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, para os genitores utilizados nas diferentes combinações de cruzamentos do capítulo: híbrido *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão – plantas F₁#10, F₁#42, F₁#04, F₁#37; *Paspalum malacophyllum* (BGP 293); *Paspalum atratum* (BGP 98 e BGP 308).

Observando os resultados de cruzamento entre *P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão e *Paspalum malacophyllum* nota-se que, de 466 polinizações realizadas, apenas 11 cariopses foram formadas, uma taxa de cruzabilidade de 0,005% (Tabela 12). Essa baixa taxa pode ser explicada pelo fato de que *Paspalum malacophyllum* estar inserido no subgênero *Anachyris*, enquanto as espécies do Grupo Plicatula pertencem ao subgênero *Paspalum*.

Sabe-se que *P. malacophyllum* possui genoma MMMM com cromossomos apresentando associações bivalentes e quadrivalentes na meiose (HOJSGAARD et al., 2008), no entanto, não se conhece a constituição genômica das espécies do grupo Plicatula. A distância genética dos genitores pode ter afetado um melhor desempenho do cruzamento, assim como ocorreu com os cruzamentos com *P. atratum*.

A taxa de formação de híbridos nesses cruzamentos variou de 0% a 0,008%, sendo que para os cruzamentos entre (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. atratum*, as maiores taxas foram observadas no cruzamento com a planta F₁#10, 0,005% para o ano de 2018 e 0,006% para o cruzamento no ano de 2019, e de 0,008% com a planta F₁#42.

Essas combinações de cruzamentos envolvem três espécies aparentemente diferentes tanto nos cruzamentos entre (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. atratum* como entre (*P. plicatulum* 4PT x *P. guenoarum* cv. Azulão) x *P. malacophyllum*. São cruzamentos complexos que envolvem indivíduos com genomas distintos e entre espécies de grupos botânicos diferentes, o que pode colaborar para uma baixa produção de cariopses e consequentemente de plântulas, bem como a baixa obtenção de híbridos confirmados.

A confirmação do sucesso do cruzamento é de extrema importância para comprovarmos que os grãos de pólen criopreservados ainda se mantêm viáveis. Para isso, o uso de marcadores moleculares é útil na obtenção de resultados. Os marcadores SSR e ISSR mostraram-se ferramentas excelentes para confirmar a ocorrência ou não das fecundações cruzadas neste trabalho, e eles têm sido utilizados com sucesso para espécies de *Paspalum* (LOPES, 2017) e outras espécies de plantas (FERREIRA et al., 2019).

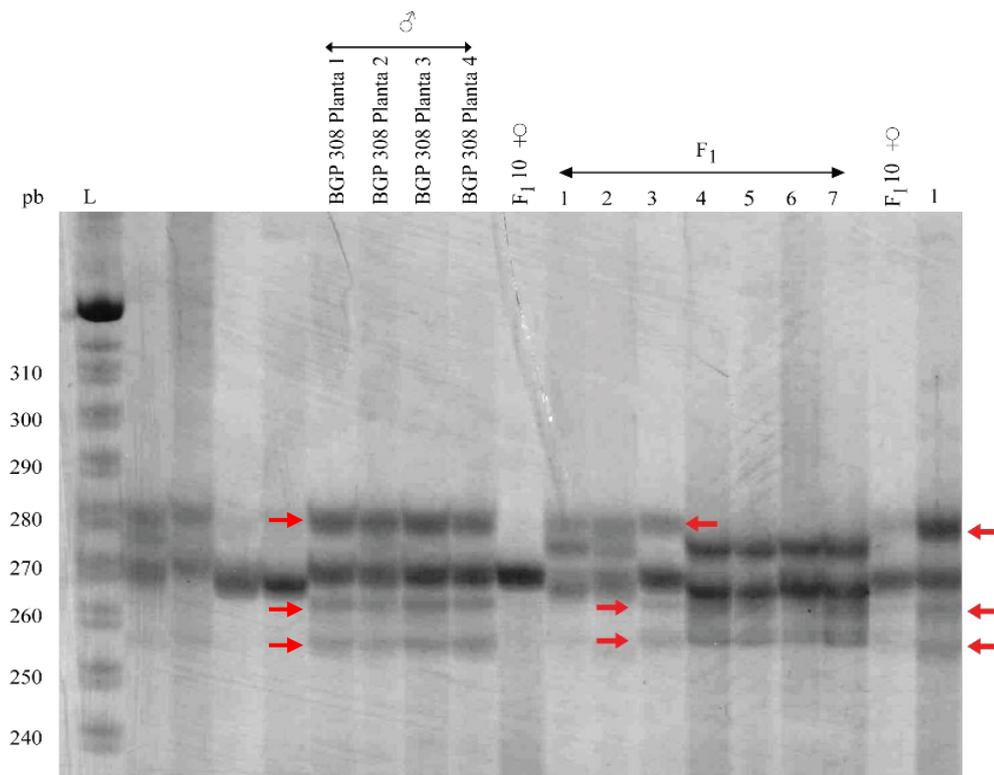


Figura 16. Perfil de amplificação do marcador PA02C3 em gel de poliacrilamida 6% das amostras do cruzamento entre *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão – planta F₁#10 e *Paspalum atratum* (BGP 308). Os alelos exclusivos do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirmam a hibridação estão indicados pelas setas vermelhas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de bases (pb). L: padrão de peso molecular 10 pb (Invitrogen).

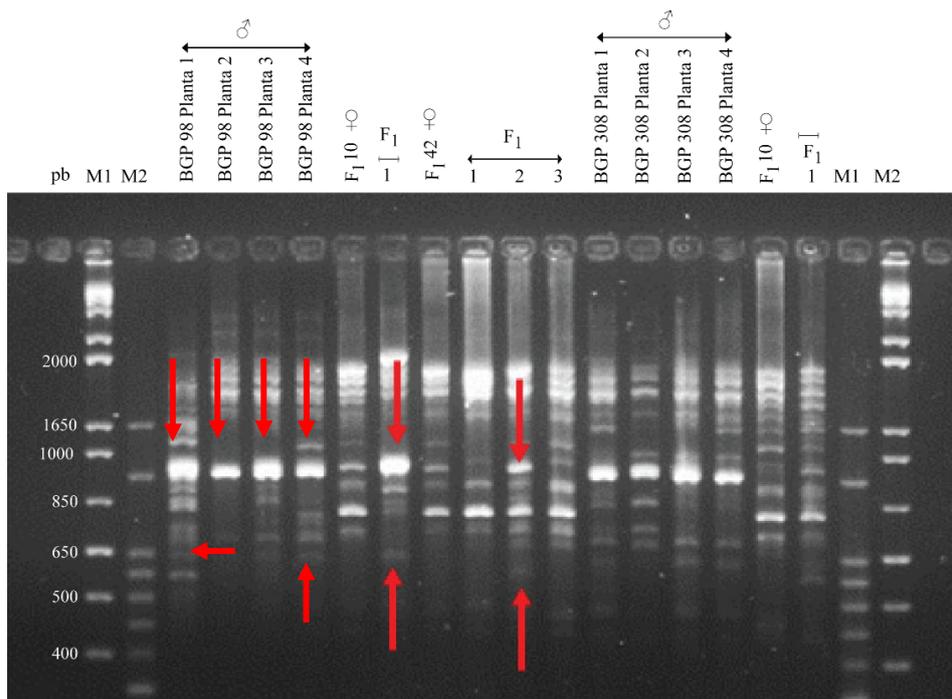


Figura 17. Perfil de amplificação do marcador ISSR 10, em gel de agarose 2%, das amostras do cruzamento entre *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão – plantas F₁#10 e planta F₁#42 e *Paspalum atratum* (BGP 98). O alelo exclusivo do genitor masculino não apresentado pelo genitor feminino e que confirma a hibridação estão indicados pelas setas amarelas. Os padrões de peso molecular estão indicados, em pares de base (pb). M1: padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen) e M2: padrão de peso molecular 50bp Ludwing.

4.3 CONCLUSÃO

Foram confirmados cinco híbridos utilizando marcadores microssatélites e intermicrossatélites, dos cruzamentos entre *Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão (7) x *P. atratum* (5 e 6) e entre (*Paspalum plicatulum* 4PT x *Paspalum guenoarum* cv. Azulão (7) x *P. malacophyllum* (3).

Foi possível observar que grãos de pólen criopreservados desidratados com sílica gel podem ser utilizados em hibridações com espécies de florescimento assíncrono em programas de melhoramento genético de forrageiras.

Essa metodologia já está sendo adotada pelo programa de melhoramento de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste e em fase de testes nos programas de melhoramento de braquiária (Gênero *Urochloa*) e *Panicum* sp., na Embrapa Gado de Corte.

Os marcadores microssatélites e intermicrossatélites utilizados nesse trabalho foram eficientes para separar os genótipos de *Paspalum* utilizados nas diferentes combinações apresentados neste estudo.

As progênes híbridas configuram uma combinação genética inédita e serão incorporadas pelo programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste

4.4 PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisar a viabilidade dos grãos de pólen, a produção de sementes, o modo de reprodução, o comportamento da meiose e potencial forrageiro das plantas a campo.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, C. A. et al. Reproductive Systems in *Paspalum*: Relevance for Germplasm Collection and Conservation, Breeding Techniques, and Adoption of Released Cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1377, 2019.

AGUILERA, P. M.; SARTOR, M. E.; GALDEANO, F.; ESPINOZA, F.; QUARÍN, C. L. Interspecific Tetraploid Hybrids between Two Forage Grass Species: Sexual *Paspalum plicatum* and apomitic *P. guenoarum*. **Crop Science**, v. 51, July-august, 2011.

ALMEIDA, C.; AMARAL, A. D.; NETO, J.; SERENO, M. D. M. Conservação e germinação in vitro de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 493-497, 2011.

BENNETT, H. W.; BASHAW, E. C. Interspecific Hybridization with *Paspalum* spp. 1. **Crop Science**, v. 6, n. 1, p. 52-54, 1966.

BRUGNOLI, E. A.; URBANI, M. H.; QUARIN, C. L.; MARTINEZ, E. J.; ACUÑA, C. A. Diversity in diploid, tetraploid, and mixed diploid–tetraploid populations of *Paspalum simplex*. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1509-1516, 2013.

BUITINK, J.; WALTERS, C.; HOEKSTRA, F. A.; CRANE, J. Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents: interpretation on the basis of water activity and glass concepts. **Physiologia Plantarum**, v. 103, n. 2, p. 145-153, 1998.

BURSON, B. L.; BENNETT, H. W. "Meiotic and reproductive behavior of some introduced *Paspalum* species." **Miss Acad Sci J**, 1971.

BURSON, B. L.; HUSSEY, M. A. Cytology of *Paspalum malacophyllum* and its relationship to *P. juergensii* and *P. dilatatum*. **International journal of plant sciences**, v. 159, n. 1, p. 153-159, 1998.

BURTON, G. W. "A cytological study of some species in the genus *Paspalum*." **J. Agric. Res.**, v. 60, n. 3, p. 193-197, 1940.

CHASE, A. C. L. The North American species of *Paspalum*. **Contr. U.S. Natl. Herb.**, v. 28, p. 1-310, 1929.

CIDADE, F. W. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae). **Conservation genetics**, v. 10, n. 6, p. 1977-1980, 2009.

CIDADE, F. W. et al. Microsatellite loci for *Paspalum atratum* (Poaceae) and cross-amplification in other species. **American journal of botany**, v. 97, n. 11, p. e107-e110, 2010.

CIDADE, F. W.; DALL'AGNOL, M.; BERED, F.; de SOUZA-CHIES, T. T. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). **Genetic resources and crop evolution**, v. 55, n. 2, p. 235-246, 2008.

CLAYTON, W. D., et al. Genera graminum. Grasses of the world. Genera graminum. **Grasses of the World.**, v. 13, 1986, 389p.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DA SILVEIRA, M. C. T.; PEREZ, N. B. Informações sobre plantas forrageiras C4 para cultivo em condições de deficiência de drenagem e tolerância a frio. **Embrapa Pecuária Sul-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

DINATO, N. B.; SANTOS, I. I.; LEONARDECZ, E.; BURSON, B.; QUARÍN, C. L.; PAULA, A. F. de; FÁVERO, A. P. Storage of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) pollen at different temperatures. **Crop Science**, v. 58, p.1-8, 2018.

ESPINOZA, F.; QUARÍN, C. L. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomitic *Paspalum* species. **Australian Journal of Botanic**, v. 45, p. 871-87, 1997.

EVERS, G. W.; BURSON, B. L. Dallisgrass and other *Paspalum* species. In: MOSER, L.E.; BURSON, B. L.; SOLLENBERGER, L.E. (Ed.). **Warm-season (C4) grasses**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 2004. p. 681-713.

FERNANDES, C. D., et al. Controle químico da mela-das-sementes e do carvão em cultivares de *Brachiaria brizantha*. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, p. 136-144, 2017.

FERREIRA, C. F. et al. Fingerprint molecular em genótipos de citros utilizando marcadores microsatélites não-ancorados. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 26., 2019, Juazeiro, BA/Petrolina, PE. Fruticultura de precisão: desafios e oportunidades-anais. Petrolina: Embrapa Semiárido: UNIVASF: SBF, 2019.

FONSECA, D. M.; SANTOS, M. ER; MARTUSCELLO, J. A. Importância das forrageiras no sistema de produção. **Plantas forrageiras. Viçosa: UFV**, p. 13-29, 2010.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of diploids, natural and induced tetraploids and intraspecies hybrids of bahiagrass, *Paspalum notatum* Flügge. **Crop Science**, Madison, v. 1, p. 402-406, 1961.

GOULD, F. W. **The grasses of Texas**. Texas A&M University, Texas Agricultural Experiment Station., 1975.

HOJSGAARD, D. et al. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). **Genetic resources and crop evolution**, v. 56, n. 4, p. 533-545, 2009.

HOJSGAARD, D. et al. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris* (Poaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 203, n. 7, p. 535-547, 2008.

HOJSGAARD, D.H., BURSON, B.L., QUARIN, C.L. and MARTÍNEZ, E.J. Unravelling the ambiguous reproductive biology of *Paspalum malacophyllum*: a decades old story clarified. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 63, n. 6, p.1063-1071, 2016.

HONFI, A. I.; QUARIN, C.O L.; VALLS, J. F.M. Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. **Darwiniana**, p. 87-94, 1990.

KILLEEN T.J. The grasses of Chiquitania, Santa Cruz, Bolivia. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 1990 Jan 1:125-201.

LOPES, M. M. et al. Identificação e confirmação de hibridação da safra 2015/2016 em *Paspalum* L.(Poaceae) com marcadores SSR e ISSR. 2017.

MORRONE, J. J. "La importancia de los atlas biogeográficos para la conservación de la biodiversidad." In *Proyecto Iberoamericano de Biogeografía y Entomología Sistemática: PRIBES 2000: trabajos del 1er taller iberoamericano de entomología sistemática*, pp. 69-78. Sociedad Entomológica Aragonesa, SEA, 2000.

MORRONE, O. et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.

NOVO, P. E. et al. Cytogenetic relationships, polyploid origin and taxonomic issues in *Paspalum* species: inter-and intraspecific hybrids between a sexual synthetic autotetraploid and five wild apomictic tetraploid species. **Plant Biology**, v. 21, n. 2, p. 267-277, 2018.

NOVO, P. E.; ESPINOZA, F.; QUARIN, C. L. An apomictic tetraploid *Paspalum chaseanum* cytotype and its cytogenetic relationship with *P. plicatulum* (Poaceae): taxonomic and genetic implications. **Australian Journal of Botany**, v. 61, n. 7, p. 538-543, 2013.

NOVO, P. E. et al. Hybridization and heterosis in the Plicatula group of *Paspalum*. **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 198, 2017.

NOVO, Patricia Elda et al. Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 4, p. 356-362, 2016.

OLIVEIRA, F. A., et al. First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum* species of the Plicatula group. **BMC research notes**, 9:511, 2016.

OLIVEIRA, R. C. D.; VALLS, J. F. M. Novos sinônimos e ocorrências em *Paspalum* L.(Poaceae). **Hoehnea** [online], v. 35, n. 2, 2008.

OLIVEIRA, R.C. **O gênero *Paspalum* L., grupo Plicatula (Poaceae: Paniceae), no Brasil.** 2004. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ORTIZ, J. P. A. et al. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 767-787, 2013.

***Paspalum* in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13469>>. Acesso em: janeiro, 2020.

POEHLMAN, J. M.; SLEPER, D. A. Methods in plant breeding. **Breeding Field Crops**, p. 172-174, 1995.

POZZOBON, M. T. et al. Cytogenetic analyses in *Paspalum* L. reveal new diploid species and accessions. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1292-1299, 2008.

QUARÍN, C. L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. I. Cytological and reproductive behavior of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. **Tropical Grasslands**, v. 31, p. 114-116, 1997.

RAMIREZ, J. R. El pasto Rojas, una gramínea forrajera promissora en el Paraguay. **Revista Argentina de Agronomía**, v. 21, n. 2, p. 84-101, 1954.

SANTOS, P.M. **Controle do desenvolvimento das hastes no capim-Tanzânia: um desafio.** 2002. 98 p. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SARTOR, M. E.; QUARÍN, C. L.; ESPINOZA, F. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. **Crop Science**, v. 49, p. 1270-1276, 2009.

SPERANZA, P.; MALOSETTI, M. Nuclear and cytoplasmic microsatellite markers for the species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae). **Plant Genetic Resources**, v. 5, n. 1, p. 14-26, 2007.

STEPHENS, C. G., et al. **A soil and land use survey of the hundreds of Riddoch, Hindmarsh, Grey, Young, and Nangwarry, County Grey, South Australia.** HE Daw, government printer, 1941.

TROPICAL FORAGES. Fact Sheet Index. Disponível em: http://tropicalforages.info/key/forages/Media/Html/entities/paspalum_plicatulum.htm. Acesso em: Janeiro, 2020.

USANDIZAGA, S. C. F.; BRUNOGNOLI, E. A.; WEISS, A. I.; ZILLI, A. L.; SCHEDLER, M.; PAGANO, E. M.; ... & ACUÑA, C. A. Genetic and morphological characterization of *Acroceras macrum* Stapf. **Grass and forage science**, v. 70, n. 4, p. 695-704, 2015.

VALLS, J. F. M.; M. T. POZZOBON. "Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil." **Anais...** do Encontro Internacional sobre Melhoramento Genético de *Paspalum*, p. 15-21, 1987.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América Del Sur Austral (Argentina, Bolivia, Sur Del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)**. Missouri: Botanical Garden Press. 2005. 297 p.