

# Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto)

Vânia Helena Techio<sup>1\*</sup>, Lisete Chamma Davide<sup>2</sup>, Cássia Ângela Pedrozo<sup>2</sup> e Antônio Vander Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Contestado (UnC), Rua Victor Sopesa, 3000, Cx. Postal 211, 89700-000, Concórdia, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLa), Lavras, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. \*Autora para correspondência. e-mail: vht@uncnet.br

**RESUMO.** O objetivo deste trabalho foi estimar a viabilidade do pólen em acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos por meio de germinação *in vitro* e coloração com carmim propiônico,orceína acética e corante de Alexander. Os testes de germinação foram realizados com grãos de pólen frescos e armazenados por 30 dias. Os acessos de capim-elefante e de milheto apresentaram alta viabilidade de pólen. Apenas um deles, quando avaliado com o corante de Alexander, mostrou baixa fertilidade. Para os híbridos, observou-se alta taxa de pólen funcionais com os corantes nucleares. Entretanto, o corante de Alexander confirmou a completa esterilidade desses acessos. Os acessos de capim-elefante e milheto apresentaram baixa porcentagem de pólen viáveis quando induzidos à germinação em meio de cultura. Nos híbridos foi constatada completa esterilidade do grão de pólen, condizente com as anormalidades meióticas relatadas na literatura. Quanto ao armazenamento, os grãos de pólen de todos os acessos perderam completamente o poder germinativo.

**Palavras-chave:** viabilidade de pólen, *Pennisetum*, corantes, germinação *in vitro*.

**ABSTRACT. Pollen viability in elephantgrass, pearl millet and interspecific hybrids (elephantgrass x pearl millet) accessions.** The aim of this work was to estimate the pollen viability in elephantgrass, pearl millet and interspecific hybrids accessions through *in vitro* germination and staining with propionic carmine, acetic orcein and Alexander's stain. The germination tests were accomplished with fresh pollen grains and stored for 30 days. The elephantgrass and pearl millet accessions presented a high pollen viability. Just one of the accessions, when evaluated with Alexander's stain, showed low fertility. For the hybrid, a high rate of functional pollen was observed with the nuclear stain. However, Alexander's stain confirmed the complete sterility of those accessions. Elephantgrass and pearl millet accessions presented a low percentage of viable pollen grain, when induced to germination in culture medium. Complete sterility of the pollen grain was verified in the hybrid, agreeing with the meiotic abnormalities already described in the literature. After storage, the pollen grains of all accessions lost entirely their germinative power.

**Key words:** pollen viability, *Pennisetum*, stain, *in vitro* germination.

## Introdução

O pressuposto básico dos programas de melhoramento genético vegetal está fundamentado na obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no germoplasma de determinada espécie. Dentre os fatores mais importantes para o sucesso desses programas destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos. A eficácia dos cruzamentos, tanto entre variedades e cultivares de uma espécie como

entre espécies, depende diretamente da viabilidade do pólen.

A determinação da viabilidade do pólen pode ser feita por métodos diretos, tais como a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e métodos indiretos, baseados em parâmetros citológicos, como a coloração (Shivanna e Johri, 1985; Dafni, 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992; Kearns e Inouye, 1993).

Dentre os corantes mais utilizados destacam-se:

carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio (Stanley e Linskens, 1974; Sharma e Sharma, 1994), cloreto de trifeniltetrazólio e tetrazólio vermelho (Shivanna e Rangaswamy, 1992), os quais promovem diferenças na coloração dos grãos de pólen, fornecendo resultados de forma rápida e com baixo custo.

Na literatura não há a descrição de um teste de viabilidade universal utilizando um corante específico. Os estudos em *Pennisetum* mencionam a utilização de corantes nucleares na determinação da viabilidade do pólen (Sree Ramulu, 1968; Chatterji e Timothy, 1969; Sethi et al., 1970; Sree Rangasamy, 1972; Brunken, 1979; Sujatha et al., 1989). Esses corantes, de acordo com Alexander (1969, 1980), têm uma aplicação limitada, pois coram somente pólenes funcionais, enquanto que os inviáveis são identificados por não corarem. Desse modo, não são adequados para espécies cujos grãos de pólen apresentam paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas, pois dificultam a sua penetração, impedindo a coloração. Nessa condição, pólenes viáveis podem não apresentar coloração e serem equivocadamente classificados como abortados. Alternativamente, o autor propôs um corante a base de verde malaquita e fucsina ácida que devido às suas propriedades químicas básica e ácida, respectivamente, coram pólenes viáveis e não viáveis, mostrando-se eficiente para várias espécies.

Neste caso, a avaliação comparativa de diferentes corantes (nucleares e não nucleares) seria um procedimento recomendado para *Pennisetum* na tentativa de se obter resultados mais confiáveis na determinação da viabilidade do pólen das espécies desse grupo.

A coloração, embora seja um procedimento simples e barato, não fornece informações sobre a capacidade germinativa do pólen, o que pode ser obtido por meio de testes de germinação *in vitro*. Esses testes têm sido empregados principalmente quando é necessário armazenar pólenes em função da realização de cruzamentos controlados entre parentais com diferenças nos períodos de florescimento ou que se encontram em regiões distantes.

Em *Pennisetum*, a constatação da capacidade germinativa do pólen pode permitir verificar a manutenção do poder germinativo dos pólenes armazenados. Esse procedimento é, particularmente, importante para viabilizar cruzamentos entre variedades de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), as quais mostram isolamento reprodutivo temporal, decorrente da não coincidência da época de florescimento. No germoplasma do capim-elefante,

os acessos foram classificados quanto à época de florescimento em três categorias, sendo: precoce (março e abril), intermediário (maio e junho) e tardio (julho e agosto) (Xavier et al., 1993). Em cruzamentos interespecíficos entre capim-elefante e milheto, conforme citado por Aken'ova e Chheda (1970), em que nem sempre há coincidência entre o período em que o estigma do milheto está receptivo e a disponibilidade de grãos de pólen de capim-elefante, o armazenamento também pode se mostrar como uma alternativa viável para os programas de melhoramento genético.

Assim, o objetivo deste estudo foi estimar a viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante (*P. purpureum*), milheto (*P. glaucum*) e híbridos interespecíficos (*P. purpureum* x *P. glaucum*), utilizando testes de coloração e germinação *in vitro*.

## Material e métodos

Foram utilizados 4 acessos de capim-elefante (*P. purpureum*), 5 acessos de milheto (*P. glaucum*) e 5 acessos híbridos interespecíficos (*P. purpureum* x *P. glaucum*), obtidos da Coleção de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais.

**Avaliação da viabilidade do pólen por meio de coloração:** Anteras obtidas de espiguetas pré-fixadas em Carnoy (álcool etílico: ácido acético, 3:1) foram seccionadas transversalmente e os grãos de pólen foram cuidadosamente extraídos. Para coloração foram testados, independentemente, os corantes: carmim propiônico 2%,orceína acética 1% e corante de Alexander (Alexander, 1980). Para os dois primeiros corantes, a viabilidade foi determinada pela capacidade de coloração dos grãos de pólen. Para o corante de Alexander, foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram coloração roxa e inviáveis aqueles corados de verde. Foram avaliadas 10 lâminas e 100 grãos de pólen por lâmina por acesso.

**Avaliação da viabilidade do pólen fresco por meio da germinação in vitro:** Para a germinação do pólen de acessos de capim-elefante e dos híbridos interespecíficos foi utilizado o meio de cultura 1 e para o milheto foram testados os meios 1 e 2, com as seguintes composições:

Meio de cultura 1: 9 g de sacarose; 30 mg de  $\text{CaCl}_2$ ;  $2\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,7 g de ágar em 100 mL de água destilada.

Meio de cultura 2: 13 g de sacarose; 1 g de ágar; 0,5 mL de solução  $\text{H}_3\text{BO}_3$  5 ppm; 0,5 mL de solução  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 ppm e 90 mL de água destilada.

Os grãos de pólen retirados de anteras provenientes de panículas recém-coletadas foram

espalhados sobre uma placa escavada contendo o meio de cultura. As placas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa com temperatura de 27°C, durante 24 horas. Foram avaliadas 10 lâminas e 100 grãos de pólen por lâmina por acesso. A viabilidade do pólen foi dada em função da porcentagem de pólen germinados, sendo considerados viáveis aqueles grãos de pólen que apresentavam tubo polínico com comprimento igual ou superior ao seu diâmetro, conforme recomendações de Shivanna e Rangaswamy (1992).

**Avaliação da viabilidade do pólen armazenado por meio da germinação in vitro:** Anteras retiradas de panículas recém coletadas foram colocadas em um dessecador por 24h. Os grãos de pólen foram removidos e transferidos para frascos de vidro fechados (8 mL) e armazenados em baixas temperaturas (-18°C) por 1, 2 e 3 meses. Os procedimentos para a germinação do pólen e avaliação foram semelhantes ao descrito anteriormente para pólen fresco.

As imagens dos grãos de pólen foram capturadas por meio de uma microcâmara Optronics® conectada ao fotomicroscópio Olympus BX60 e transferidas para um microcomputador, utilizando o software Optronics®.

## Resultados e discussão

Em média, os acessos de capim-elefante e de milheto apresentaram alta viabilidade do grão de pólen (superior a 90%), independente do corante utilizado (Tabela 1; Figura 1A, B e C). O elevado percentual de pólen funcionais nesses acessos está associado à regularidade meiótica (Techio *et al.*, 2006) e ao horário de coleta, padronizado entre 8h30min e 10h, momento em que as anteras começam a se tornar deiscentes, levando a crer que a viabilidade atinja seu ponto máximo.

Sujatha *et al.* (1989), usando carmim acético 2%, mencionaram 78% de fertilidade para o capim-elefante, enquanto que nos trabalhos de Sethi *et al.* (1970) e Sree Rangasamy (1972), com o mesmo corante, essa taxa foi de 61,8% e 95%, respectivamente. Para o milheto, a taxa de fertilidade variou de 87 a 97% (Sree Ramulu, 1968; Sethi *et al.*, 1970; Sujatha *et al.*, 1989).

A exceção, dentre os materiais avaliados, foi o acesso de capim-elefante BAG 63, cuja fertilidade foi de 72%, quando utilizado o corante de Alexander. Essa planta, obtida por Martinez *et al.* (1986) via cultura de calos de meristemas apicais de capim-elefante, foi considerada um mutante (referido como Cuba T 169), pois diferiu fenotipicamente da planta doadora do explante em relação à largura, altura e

ângulo de inserção da folha, forma do colmo e dimorfismo estacional (Martinez *et al.*, 1990). Avaliações realizadas por Techio *et al.* (2006) confirmaram a ocorrência de anormalidades no processo meiótico desse acesso, indicando ser esta a possível causa da menor viabilidade do pólen. A condição artificial do meio, os reguladores de crescimento, o genótipo e a idade da planta têm sido apontados como principais fontes causadoras das alterações citogenéticas (Bayliss, 1980; Peschke e Phillips, 1992; Sybenga, 1992), que variam de não disjunção e duplicação cromossômica à aberrações cromossômicas estruturais (Sybenga, 1992).

**Tabela 1.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis obtidos com três corantes para acessos de capim-elefante (*P. purpureum*), milheto (*P. glaucum*) e híbridos interespecíficos (*P. purpureum* x *P. glaucum*) do Banco de Germoplasma da Embrapa – Gado de Leite, Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais.

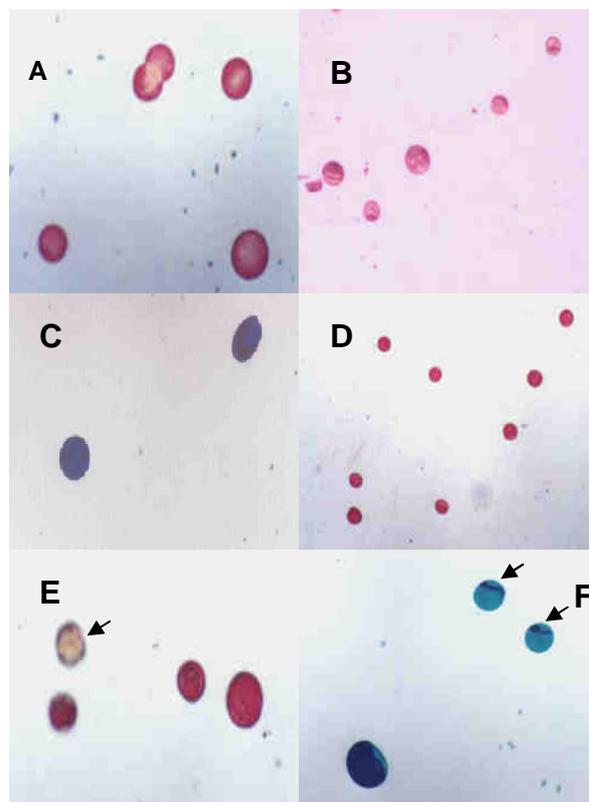
Acessos	Identificação	Corantes		
		Orceína Acética 1%	Carmim propiônico 2%	Corante de Alexander
BAG 63	<i>P. purpureum</i>	100,0	91,31	71,7
BAG 65	<i>P. purpureum</i>	99,9	97,5	99,8
BAG 75	<i>P. purpureum</i>	99,4	98,6	99,9
BAG 91	<i>P. purpureum</i>	99,4	97,7	99,8
F94-53	<i>P. purpureum</i>	100,0	99,8	98,8
M38	<i>P. glaucum</i>	98,9	99,6	100
M24	<i>P. glaucum</i>	100	98,7	100
M36	<i>P. glaucum</i>	100	100	100
M35	<i>P. glaucum</i>	100	96,1	100
M44	<i>P. glaucum</i>	100	99,7	100
F94-44	<i>P. purpureum</i> x <i>P. glaucum</i>	100,0	96,7	0,4
F94-49-06	<i>P. purpureum</i> x <i>P. glaucum</i>	99,2	97,6	0
F94-60-01	<i>P. purpureum</i> x <i>P. glaucum</i>	99,9	96,9	0
F94-52-02	<i>P. purpureum</i> x <i>P. glaucum</i>	100	99,6	0

Para os híbridos interespecíficos, os valores de viabilidade polínica variaram de acordo com o corante empregado (Tabela 1).

Os corantes nucleares utilizados (orceína acética e carmim propiônico) mostraram alta taxa de pólen funcionais (acima de 90%, Tabela 1; Figura 1D e E). Essa frequência de pólen viáveis não era esperada, uma vez que híbridos entre *P. purpureum* x *P. glaucum* são descritos como estéreis devido à irregularidades meióticas (Jauhar, 1968 e 1981; Techio *et al.*, 2006). Tais resultados foram muito superiores aos obtidos por Sree Ramulu (1968) e Sree Rangasamy (1972), que descreveram uma porcentagem reduzida de viabilidade (5%) para pólen corados com carmim acético.

Por outro lado, o corante de Alexander confirmou que dentre os quatro acessos híbridos

interespecíficos avaliados, três apresentam completa esterilidade (Tabela 1; Figura 1F). As análises usando esse corante parecem fornecer dados mais acurados sobre a viabilidade do pólen, pois se obtém uma coloração diferencial dos pólenes viáveis e não viáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam coloração reversa. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Dessa maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander, 1980).



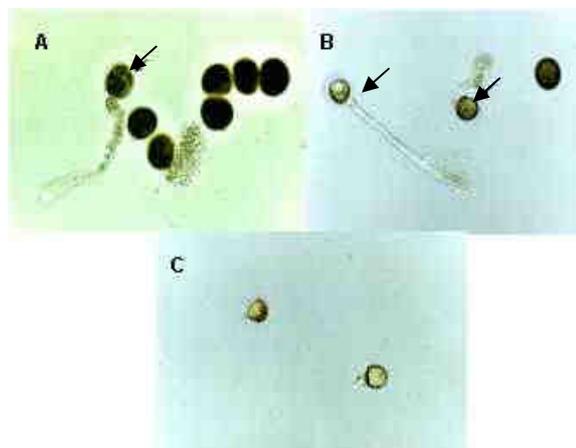
**Figura 1.** Viabilidade de pólen obtida por meio de coloração. Capim-elefante (*P. purpureum*): A. Orceína acética 1%; B. Carmim propiônico 2%; C. Corante de Alexander. Híbrido interespecífico: D. Orceína acética 1%; E. Carmim propiônico 2%; F. Corante de Alexander (A seta indica grãos de pólen inviáveis).

O acesso F94-53, identificado no Banco de Germoplasma como híbrido interespecífico, apresentou alta taxa de viabilidade do pólen (98,8%, Tabela 1) quando avaliado com corante de Alexander. Análises mitóticas e morfológicas complementares confirmaram tratar-se de um genótipo de capim-elefante com  $2n=4x=28$  cromossomos, justificando a presença de pólenes férteis.

Os dados de germinação *in vitro* mostraram que os acessos de milho exibiram baixa frequência de pólenes funcionais, embora tenham apresentado taxas de fertilidade diferenciadas em resposta aos dois meios de cultura testados (Tabela 2; Figura 2A).

**Tabela 2.** Porcentagem de grãos de pólen viáveis em teste de germinação *in vitro* de pólen fresco, para acessos de *P. purpureum*, *P. glaucum* e híbridos interespecíficos (*P. purpureum* x *P. glaucum*) do Banco de Germoplasma da Embrapa – Gado de Leite, Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais.

Acessos	Meios de Cultura	
	1	2
Capim-elefante		
BAG 63	10,9	-
BAG 65	0	-
BAG 75	39,4	-
BAG 91	3,6	-
F94-53	0	-
Milho		
M38	6,8	0
M24	6,0	48,4
M36	47,6	37,2
M35	4,2	7,2
M44	43,8	55,8
Híbridos interespecíficos		
F94-44	0	-
F94-49-06	0	-
F94-60-01	0	-
F94-52-02	0	-



**Figura 2.** Pólenes viáveis em germinação (seta) e inviáveis. A. Milho (*P. glaucum*) B. Capim-elefante (*P. purpureum*) C. Híbridos interespecíficos (*P. purpureum* x *P. glaucum*).

Quando utilizado o meio de cultura 1, o acesso M36 apresentou a maior porcentagem de pólenes viáveis (47,6%) e o M35, a menor porcentagem (4,2%). Com o meio de cultura 2, os acessos M44 e M38 apresentaram a maior e a menor taxas de viabilidade, respectivamente. Esse comportamento é compatível com a descrição feita por Ayyangar e Rao (1935). Segundo esses autores, os grãos de pólen do milho e de espécies de *Andropogon* e *Sorghum* plasmolisam e não germinam em meio de cultura. Chaudhury e Shivanna (1986) descreveram também

para o milheto, uma taxa reduzida de pólenes frescos germinados *in vitro*, cuja frequência foi de 57,6%, 18,1% e 12% para três genótipos.

Os acessos de capim-elefante também exibiram baixa taxa de viabilidade quando induzidos à germinação em meio de cultura (Tabela 2; Figura 2B). Aken'ova e Chheda (1970) descreveram para o capim-elefante, uma taxa de 54,3% de viabilidade que se manteve por mais um dia, sob diferentes temperaturas de armazenamento e umidade relativa de 90 a 100%.

A perda da viabilidade do pólen 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; Lisci *et al.*, 1994). As gramíneas, tal como relatado por Pacini *et al.* (1997) para *Festuca arundinaceae*, apresentam pólenes parcialmente desidratados que entre 48h e 72h reduzem a viabilidade para próximo de zero após a deiscência das anteras.

Em função desse comportamento típico das espécies de gramíneas, Kihara (1982) recomendou que o acompanhamento da germinação seja feito por meio de observações *in vivo* das interações pólen-pistilo.

Outro aspecto que precisa ser considerado é que a viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo. Segundo Shivanna e Rangaswamy (1992), o período de florescimento, as alterações ambientais e as diferenças genotípicas podem contribuir para tal variabilidade.

A viabilidade e a longevidade dos grãos de pólen também dependem da sua composição celular. Shivanna e Rangaswamy (1992) descreveram que a maior limitação dos testes de germinação *in vitro* é a dificuldade em obter uma germinação satisfatória em muitas espécies, principalmente aquelas que apresentam grãos tricelulares, como é o caso da família Poaceae. Esse tipo de grão de pólen respira e germina mais rapidamente e apresenta menor longevidade do que os bicelulares (Hanna e Towill, 1995).

Para os híbridos interespecíficos, quando avaliada a germinação *in vitro*, observou-se completa esterilidade dos grãos de pólen (Figura 2C). Esses resultados são compatíveis com os obtidos por coloração (Tabela 1) e por Techio *et al.* (2006), que relataram alta frequência de anormalidades meióticas nos mesmos híbridos.

Todos os materiais genotípicos avaliados apresentaram total esterilidade dos grãos de pólen após um período de 30 dias de armazenamento. Este

resultado indica que as condições do armazenamento não conseguiram preservar a viabilidade dos grãos de pólen.

Vasil (1962) relatou que os grãos de pólen do milheto constituem uma exceção entre as gramíneas, pois conseguem manter a viabilidade por até 177 dias, em temperatura de 16- 35°C e umidade relativa 0-50%. As avaliações de Aken'ova e Chheda (1970) para o capim-elefante, mostraram que o grão de pólen perde sua viabilidade em 72 horas, em diferentes tratamentos testados. Entretanto, quando armazenado a 4°C e umidade relativa de 100%, aproximadamente 21% do pólen manteve sua viabilidade após 7 dias. Nas condições de laboratório testadas para o milheto por Chaudhury e Shivanna (1986), foi constatado que o pólen não suporta armazenamento além de três semanas com os teores de umidade relativa testados (5, 40 e 90%) .

## Conclusão

Os acessos de capim-elefante e de milheto apresentaram alta viabilidade do grão de pólen independente do corante utilizado. Esse resultado não se repetiu nos testes de germinação *in vitro*, nos quais a composição dos meios de cultura influenciou a taxa de viabilidade dos grãos de pólen dos acessos de milheto.

Para três dos acessos híbridos interespecíficos avaliados, ao contrário dos corantes nucleares, o corante de Alexander e os testes de germinação *in vitro* confirmaram a completa esterilidade dos grãos de pólen.

Quando avaliados após armazenamento, os grãos de pólen de todos os acessos estudados (milheto, capim-elefante e híbridos interespecíficos) apresentaram completa esterilidade.

## Referências

- AKEN'OVA, M.E.; CHHEDA, H.R. Effects of storage on viability of elephantgrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pollen. *Nigerian Agric. J.*, Ibadan, v. 7, n. 1, p. 111-114, 1970.
- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.*, Baltimore, v. 44, p. 117-122, 1969.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.*, Baltimore, v. 55, p. 13-18, 1980.
- AYYANGAR, G.N.R.; RAO, V.P. Pollen dummy. *Current Sci.*, Bangalore, v. 19, p. 315, 1935.
- BAYLISS, M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Intern. Rev. Cytol.*, New York, v. 11, Suppl., p. 113-144, 1980.
- BRUNKEN, J.N. Cytotaxonomy and evolution in

- Pennisetum* section *Brevivalvula* (Gramineae) in tropical Africa. *Bot. J. Linn. Soc.*, London, v. 79, p. 37-49, 1979.
- CHATTERJI, A.K.; TIMOTHY, D.H. Microsporogenesis and embryogenesis in *Pennisetum flacidum* Griseb. *Crop Sci.*, Madison, v. 9, p. 219-222, 1969.
- CHAUDHURY, R.; SHIVANNA, K.R. Studies on pollen storage of *Pennisetum typhoides*. *Phytomorphology*, New Dehli, v. 36, p. 211-218, 1986.
- DAFNI, A. *Pollination ecology: a practical approach* (the practical approach series). New York: University Press, 1992. 250 p.
- HANNA, W.W.; TOWILL, L.E. Long-term pollen storage. *Plant Breed. Rev.*, Westport, v. 13, p. 79-207, 1995.
- JAUHAR, P.P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. *Genetica*, Gravenhage, v. 39, n. 3-4, p. 360-370, 1968.
- JAUHAR, P.P. Cytogenetics of pearl millet. *Adv. Agron.*, New York, v. 34, p. 407-479, 1981.
- KEARNS, C.A.; INOUE, D. *Techniques for pollinations biologists*. Niwot: University Press of Colorado, 1993.
- KIHARA, H. Wheat studies – retrospects e prospects. *Dev. Crop Sci.*, Amsterdam, v. 3, p. 1-86, 1982.
- LINSKENS, H.F.; CRESTI, M. The effect of temperature, humidity and light on the dehiscence of tobacco anthers. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.*, Amsterdam, v. 91, p. 369-375, 1988.
- LISCI, M. et al. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae) an anemophilous species flowering all year round. *Ann. Bot.*, Oxford, v. 74, p. 125-135, 1994.
- MARTINEZ, R.O. et al. *El cultivo de tejidos y la obtención y selección de mutantes. Los pastos en Cuba. Tomo I. Producción*. La Habana: Edica – Instituto de Ciencia Animal, 1986.
- MARTINEZ, R.O. et al. Obtencion de mutantes utilizando el cultivo de tejidos y otras tecnicas. In: HERRERA, R. S. (Ed.). *King grass plantacion establecimiento y manejo en Cuba*. La Habana: Edica – Instituto de Ciencia Animal, 1990. p. 11- 42.
- NEPI, M.; PACINI, E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Ann. Bot.*, Oxford, v. 72, p. 527-536, 1993.
- PACINI, E. et al. Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Ann. Bot.*, Oxford, v. 80, p. 83-87, 1997.
- PESCHKE, V.M.; PHILLIPS, R.L. Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Adv. Gen.*, New York, v. 30, p. 41-75, 1992.
- SETHI, G.S. et al. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. *Cytologia*, Tokyo, v. 35, p. 96-101, 1970.
- 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.
- SHIVANNA, K.R.; JOHRI, B.M. *The angiosperm pollen: structure and function*. New Dehli: Wiley Eastern Ltd., 1985.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. *Pollen biology biochemistry management*. Berlin: Springer-Verlag, 1974.
- SREE RAMULU, K. Meiosis and fertility in derivatives of amphiploid *Pennisetum*. *Caryologia*, Florence, v. 21, n. 2, p. 147-156, 1968.
- SREE RANGASAMY, S.R. Cytological studies on diploid and polyploid taxa of the genus *Pennisetum* Rich. *Genetica*, Gravenhage, v. 43, p. 257-273, 1972.
- SUJATHA, D.M. et al. Meiotic studies in some species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). *Cytologia*, Tokyo, v. 54, p. 641-652, 1989.
- SYBENGA, J. *Cytogenetics in plant breeding*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- TECHIO, V.H. et al. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*P. Glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Gen. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.
- VASIL, I.K. Studies on pollen storage of some crop plants. *J. Indian Bot. Soc.*, New Delhi, v. 41, p. 178-196, 1962.
- XAVIER, D.F. et al. Poder germinativo de sementes de capim-elefante. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 565-569, 1993.

Received on August 01, 2005.

Accepted on March 02, 2006.