



**ANA LUISA ARANTES CHAVES**

**CONSTITUIÇÃO E RELAÇÕES GENÔMICAS ENTRE  
ESPÉCIES DE *Cynodon* Rich. (Poaceae) EVIDENCIADAS PELA  
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* GENÔMICA**

**LAVRAS-MG  
2020**

**ANA LUISA ARANTES CHAVES**

**CONSTITUIÇÃO E RELAÇÕES GENÔMICAS ENTRE ESPÉCIES DE *Cynodon*  
Rich. (Poaceae) EVIDENCIADAS PELA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* GENÔMICA**

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

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

**LAVRAS-MG**

**2020**

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

Chaves, Ana Luisa Arantes.

Constituição e relações genômicas entre espécies de *Cynodon*  
Rich. (Poaceae) evidenciadas pela hibridização *in situ* genômica /  
Ana Luisa Arantes Chaves. - 2020.

58 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Flávio Rodrigo Gandolfi Benites.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Aloploiploide segmental. 2. Citótipo. 3. Gametas não  
reduzidos. I. Techio, Vânia Helena. II. Benites, Flávio Rodrigo  
Gandolfi. III. Título.

**ANA LUISA ARANTES CHAVES**

**CONSTITUIÇÃO E RELAÇÕES GENÔMICAS ENTRE ESPÉCIES DE *Cynodon*  
Rich. (Poaceae) EVIDENCIADAS PELA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* GENÔMICA**

**CONSTITUTION AND GENOMIC RELATIONSHIPS BETWEEN *Cynodon* Rich.  
SPECIES (Poaceae) EVIDENCED BY GENOMIC *IN SITU* HYBRIDIZATION**

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

APROVADA em 04 de fevereiro de 2020

Dra. Sandra Patussi Brammer - Embrapa Trigo, Passo Fundo/RS

Dra. Cristina Maria Pinto de Paula - UFMG

Profª. Dra. Vânia Helena Techio

Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2020**

*Para aqueles que lutam por uma educação pública, gratuita e de qualidade para todos.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

À Universidade Federal de Lavras e ao povo brasileiro por proporcionar esta oportunidade.

A todos os professores e funcionários que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

À professora Vânia pela orientação. Agradeço também por toda a paciência e preocupação.

Aos técnicos, Felipe e Lamartine, pelo auxílio e trabalho realizado com muita dedicação.

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética por compartilhar bons momentos durante o trabalho. Em especial para Bia, Dani, Ana Gabriela, Nina, Alex e Yasmim por me ouvirem e me compreenderem nos momentos em que mais precisava.

Ao estudante de iniciação científica, Pedro Henrique, por toda a ajuda durante a execução do trabalho.

À minha psicóloga Carol Canestri por me fazer enxergar que eu mesma fui responsável pela minha melhora.

Obrigada a todos os amigos que conquistei Lavras. Especialmente ao Lucas, “Andrés”, Andressa, Thuila, Alexandre, Isa e Gleicy.

Obrigada à Ana Luiza Oliveira, Ingrid, Mari e Taynah. A saudade pode ser grande, mas a felicidade em perceber que nada muda em nossa amizade é ainda maior.

Obrigada à minha amiga Ana Lamounier, e seu filho Francisco, por me mostrarem outra forma de amor.

Obrigada ao meu companheiro de vida, Marco Tulio, por desconstruir junto a mim o significado de união e construir uma nova forma para aquilo que acreditamos ser amor.

Aos meus pais, Rosangela e Rosemberg, por serem o meu maior orgulho, inspiração e meta de vida. Agradeço por serem meu exemplo de amor, companheirismo e fé. Obrigada ao meu irmão, Daniel, por ser sempre tão amoroso e não medir esforços para me ajudar em qualquer situação. Obrigada à minha irmã, Pollyana, por sua existência.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada a todos que se fizeram presentes nesses últimos dois anos.

Gratidão.

*"Sempre há resistência quando a ciência avança."*

**RESUMO**

Eventos de poliploidia são considerados os principais mecanismos para a variação do número cromossômico em *Cynodon*. Entretanto, o tipo de poliploidia, a composição genômica das espécies e a taxonomia ainda permanecem controversas. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar os genomas de quatro espécies do gênero por meio de Hibridização *in situ* Genômica (GISH), análise inédita para o táxon. As formas diploides de *C. dactylon*, *C. incompletus* e *C. nlemfuensis* demonstraram homeologia e seus genomas foram designados como DD, D<sup>1</sup>D<sup>1</sup>, D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>, respectivamente. *Cynodon dactylon* 2x e *C. incompletus* 2x são genomicamente próximos, enquanto *C. nlemfuensis* 2x apresentou maior divergência de sequências repetitivas. A origem de *C. dactylon* 4x (DDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup>) pode ter envolvido o cruzamento de seu citótipo diploide com *C. nlemfuensis* 2x, enquanto de *C. transvaalensis* 4x (DD<sup>2</sup>D<sup>1</sup>D<sup>1</sup>) foi possivelmente derivado do cruzamento de *C. dactylon* 4x e *C. incompletus* 2x. A participação de gametas não reduzidos é fundamental para a ocorrência destes eventos de alopoliploidia segmental. A divergência entre os genomas dos citótipos de *C. dactylon* sugere uma possível discriminação de espécies e ressalta as ambiguidades taxonômicas do gênero.

**Palavras-chave:** Alopoliploide segmental; Citótipo; Hibridação; Gametas não reduzidos.



## ABSTRACT

Polyploidy events are considered the main mechanisms for the variation of the chromosomal number in *Cynodon*. However, the type of polyploidy, the genomic composition of the species and the taxonomy still remain controversial. Thus, the objective of this work was to investigate the genomes of four species of the genus through Genomic *in situ* Hybridization (GISH), an unprecedented analysis for the taxon. The diploid forms of *C. dactylon*, *C. incompletus* and *C. nlemfuensis* demonstrated homeology and their genomes were designated as DD, D<sup>1</sup>D<sup>1</sup>, D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>, respectively. *Cynodon dactylon* 2x and *C. incompletus* 2x are genomically close, while *C. nlemfuensis* 2x showed greater divergence of repetitive sequences. The origin of *C. dactylon* 4x (DDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup>) may have involved the crossing of its diploid cytotype with *C. nlemfuensis* 2x, while of *C. transvaalensis* 4x (DD<sup>2</sup>D<sup>1</sup>D<sup>1</sup>) was possibly derived from the crossing of *C. dactylon* 4x and *C. incompletus* 2x. The participation of non-reduced gametes is essential for the occurrence of these events of segmental allopolyploidy. The divergence between the genomes of the *C. dactylon* cytotypes suggests possible species discrimination and points out the taxonomic ambiguities of the genus.

**Keywords:** Segmental allopolyploid; Cytotype; Hybridization; Unreduced Gametes.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
2.1 Origem e aspectos taxonômicos de <i>Cynodon</i> .....	12
2.2 Caracterização citogenética e evolução cromossômica em <i>Cynodon</i> .....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Material vegetal.....	19
3.2 Preparo de lâminas.....	19
3.3 Extração de DNA genômico.....	20
3.4 Preparo de sondas.....	20
3.5 Hibridização <i>in situ</i> genômica (GISH).....	20
3.6 Apuração da ocorrência de gametas não reduzidos.....	23
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Análise citogenômica em espécies diploides de <i>Cynodon</i> .....	25
4.2 GISH comparativa em <i>C. dactylon</i> tetraploide.....	27
4.3 GISH comparativa em <i>C. transvaalensis</i> .....	28
4.4 GISH recíproca e self-GISH nas espécies tetraploides <i>C. dactylon</i> e <i>C. transvaalensis</i> .....	29
4.5 GISH comparativa em citótipos de <i>C. dactylon</i> .....	30
4.6 Apuração de gametas não reduzidos.....	31
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
5.1 Análise citogenômica em espécies diploides de <i>Cynodon</i> .....	32
5.2 Análise citogenômica em espécies poliploides de <i>Cynodon</i> .....	36
5.3 Análise citogenômica em “citótipos” de <i>C. dactylon</i> .....	38
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Cynodon* Rich. é atualmente composto por 15 espécies (CLAYTON et al., 2016) que apresentam valor econômico principalmente como forrageiras (WU; TALIAFERRO, 2009; VAN DE WOUW et al., 2009; BENITES; SOBRINHO; VILELA, 2016). *Cynodon dactylon* (L.) Pers. destaca-se por ser constituído de variantes morfológicas naturais com ampla distribuição (WU, 2011) e por sua importância etnobotânica em países asiáticos (NAGORI; SOLANKI, 2011; DANDE; KHAN, 2012; AL-SNAFI, 2016), devido ao seu potencial fitoterápico no tratamento de doenças (SINGH et al., 2007; SORAYA et al., 2015; WU; QIU; ZHU, 2017; SJ; JANAKIRAMAN, 2018).

De modo geral, *Cynodon* apresenta elevada diversidade morfológica, desde a anatomia foliar até a morfologia de suas inflorescências (OAKLEY, 1999; HUANG et al., 2012; TUFAIL et al., 2017; MUCHUT et al., 2017; CHAVES et al., 2018; MUCHUT et al., 2019). O táxon se divergiu no Oligoceno há cerca de 31 milhões de anos (KUMAR et al., 2017) no continente Africano (BEARD; WATSON, 1982) e com posteriores eventos de introdução nas Américas (HARLAN; DE WET, 1969) e Oceania (JEWELL et al., 2012). Análises filogenéticas propostas por Muchut et al. (2017) e Chiavegatto et al. (submetido) forneceram ensaios sobre as relações de parentesco e sugerem que *Cynodon transvaalensis* Burt Davy. e *C. dactylon* compartilham o mesmo ancestral, enquanto *Cynodon incompletus* Nees. é mais distantemente relacionado com as demais espécies.

O gênero também exibe alta variabilidade genética (TALIAFERRO, 1995; HUANG et al., 2010; FARSANI et al., 2011; AKBARI; SALEHI; NIAZI, 2018), a qual tem sido associada ao processo de poliploidia (GULSEN et al., 2009; ZHANG et al., 2019). O uso de marcadores moleculares, mapas gênicos e análises citogenéticas apontam evidências de alopoliploidização com herança dissômica em *C. dactylon* (GUO et al., 2015; 2017; CHAVES et al., 2019; CHIAVEGATTO et al., 2019) e o único relato para nomenclatura genômica foi baseado na meiose de híbridos artificiais, tendo sido proposto um genoma comum com a classificação “DD” para espécies diploides e DDD’D’ para alotetraploides segmentais (FELDER, 1967).

As descrições citogenéticas indicam o número básico de cromossomos de  $x=9$ , (FORBES; BURTON, 1963; CHIAVEGATTO et al., 2016) com algumas espécies apresentando séries poliploides. *Cynodon transvaalensis* é majoritariamente diploide,

com apenas um relato de tetraploidia (CHIAVEGATTO et al., 2016); *Cynodon plectostachyus* (K.Schum.) Pilg. apresenta plantas diploides e hexaploides (FORBES; BURTON, 1963); enquanto *Cynodon aethiopicus* Clayton & Harlan, *C. incompletus* e *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst possuem plantas diploides e tetraploides (HARLAN et al., 1970b). *Cynodon dactylon* é a espécie com maior amplitude de variação, com presença de 18 a 54 cromossomos, predominando a forma tetraploide ( $2n=4x=36$ ) (WU, 2011; GUO et al., 2017).

A configuração de pareamento em bivalentes foi observada de forma majoritária em diploides (FELDER, 1967; BRILMAN, KNEEBONE e ENDRIZZI, 1982; AKSHITA et al., 2011) e em poliploides naturais e artificiais do gênero (JOHNSTON, 1975; BRILMAN, KNEEBONE; ENDRIZZI, 1982, SILVA et al., 2018), enquanto plantas triploides de *C. dactylon* apresentaram configurações em uni, bi e trivalentes (GUPTA; SRIVASTAVA, 1970). Estes dados convergem com a perspectiva de hibridação interespecífica, sugerindo uma evolução reticulada complexa (ARNOLD, 2006; VRIESENDORP, 2007; MALLETT; BESANSKY; HAHN, 2016) com a formação de “citótipos” que podem envolver diferentes genomas (GUO et al., 2015; 2017).

A definição do conceito de citótipo ainda é discutida em relação à constituição genômica. No entanto, é consensual de que séries poliploides frequentemente causam ambiguidades taxonômicas (DOYLE et al., 2017). Em espécies que apresentam esta variação para o número cromossômico, a técnica de Hibridização *in situ* Genômica (GISH) auxiliou na detecção da ocorrência de auto ou aloploidia e elucidação dos eventos de hibridação (HASTEROK et al., 2004; D'HONT et al., 2005; CHOI et al., 2008; PAULA et al., 2017; JOUVE et al., 2018; PAŠTOVÁ et al., 2019; CORRÊA et al., 2020). Compreender estes aspectos faz-se importante para o estabelecimento das relações de parentesco entre espécies (HESLOP-HARRISON, 2000; WENDEL, 2000) e podem, portanto, auxiliar na circunscrição taxonômica (RAINA; RANI, 2001; WOLNY, HASTEROK, 2009; LYSAK; KOCH, 2011; PENDINEN et al., 2012) e para a programação de cruzamentos no melhoramento genético (SILVA; SOUZA, 2013) de forrageiras do gênero *Cynodon*.

Diante o exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar a constituição genômica e a relação entre espécies de *Cynodon* a fim de elucidar origens auto ou aloploidias. Para melhor compreensão dos eventos de hibridação também foi realizada uma apuração da ocorrência de gametas não reduzidos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem e aspectos taxonômicos de *Cynodon*

*Cynodon* está incluído na família Poaceae, subfamília Chloridoideae, tribo Cynodonteae e subtribo Eleusininae (PETERSON; ROMASCHENKO; JOHNSON 2010; SORENG et al., 2015). O gênero é composto por plantas anuais e perenes (CARO, 1983; JEWELL et al., 2012) de regiões tropicais e subtropicais (CORRÊA; SANTOS, 2003), apresentando hábito rasteiro (CARO, 1983); inflorescências racemosas e digitadas (MUCHUT et al., 2017; MUCHUT et al., 2019); folhas com anatomia Kranz (DHANAPAL et al., 2017) e metabolismo C4 (ZHAO et al., 2011).

Em relação aos caracteres exomorfológicos e histofoliare, as espécies se diferenciam principalmente quanto à disposição das papilas; comprimento e aspecto da orla da lígula; tipo de prefoliação; pilosidade das folhas e morfologia da ráquis da inflorescência (CARO; SANCHEZ, 1969; HARLAN, 1970). Além disso, a conformação do sistema caulinar discrimina o táxon em dois grupos: as gramas bermuda, que apresentam rizoma e estolão simultaneamente e as gramas estrela, que possuem apenas estolão (NASCIMENTO; NASCIMENTO; LEAL, 2002; TALIAFERRO; ROUQUETE; MISLEVY, 2004).

Harlan et al. (1970a) classificaram nove espécies e dez variedades para o gênero. Atualmente, o banco de dados do Kew Royal Botanic Garden (CLAYTON et al., 2016) lista 15 espécies e apenas duas variedades: *C. aethiopicus*; *Cynodon ambiguus* (Ohwi) P. M. Peterson; *Cynodon barberi* Rang. & Tadul; *Cynodon convergens* F. Muell; *Cynodon coursii* A. Camus; *C. dactylon*; *C. incompletus*; *Cynodon* × *magennisii* Hurcombe; *C. nlemfuensis* (var. *nlemfuensis* Vanderyst e var. *robustus* Clayton & L.R. Harlan); *C. plectostachyus*; *Cynodon prostratus* (C.A.Gardner & C.E.Hubb.) P. M. Peterson; *Cynodon radiatus* Roth; *Cynodon tenellus* R. Br.; *Cynodon simonii* P. M. Peterson e *C. transvaalensis*. Entretanto, *Cynodon dactylon*, *C. nlemfuensis* e *C. transvaalensis* apresentaram polifilia em árvores filogenéticas (PETERSON; ROMASCHENKO; ARRIETA, 2015; MUCHUT et al., 2017), reforçando que as relações taxonômicas ainda não são claramente estabelecidas (JEWELL et al., 2012).

Apesar de ser considerado um táxon pequeno (HARLAN; DE WET; RICHARDSON, 1969; HARLAN; DE WET; RAWAL, 1970), o número de espécies é

um aspecto de difícil delimitação, principalmente devido à sua rápida especiação (PETERSON; ROMASCHENKO; JOHNSON, 2010; JEWELL et al., 2012), complexidade taxonômica e sistemática (HARLAN; DE WET; RICHARDSON, 1969; JEWELL et al., 2012) e variabilidade intraespecífica (TALIAFERRO, 1995; OAKLEY, 1999; CHEN et al., 2000). Esta situação também pode ser decorrente da fragmentação de suas ocorrências geográficas e do isolamento genético de algumas espécies, como observado para *C. plectostachyus*; *C. barberi*, *C. arcuatus* e *C. incompletus* (CLAYTON; HARLAN, 1970; HARLAN; DE WET; RAWAL, 1970; DE WET; HARLAN, 1970; HARLAN et al., 1970a; TALIAFERRO; ROUQUETE; MISLEVY, 2004). Em consequência desses fatores, o grupo possui um elevado número de sinonímias (The Plant List, 2013).

*Cynodon incompletus* é uma grama estrela originalmente nativa da África do Sul (DE WET; HARLAN, 1971), que apresenta estolões avermelhados e inflorescências com 3 a 5 ráculos em disposição unilateral (HARLAN et al., 1970a). As plantas crescem em habitats moderadamente secos (TALIAFERRO; ROUQUETTE; MISLEVY, 2004), cujas lâminas foliares são pilosas, lanceoladas e lineares (HARLAN et al., 1970a, DE WET; HARLAN, 1971). Apesar dos relatos de isolamento genético, há formação de híbridos diploides e triploides estéreis com *C. dactylon* (DE WET; HARLAN, 1971; TALIAFERRO, 1995; TALIAFERRO; ROUQUETE; MISLEVY, 2004).

*Cynodon nlemfuensis* é uma grama estrela com distribuição em regiões mais úmidas na África Central e ao leste do continente (WU, 2011). Para a espécie foram descritas duas variedades: var. *nlemfuensis* e var. *robustus*, ambas com formas diploide ( $2n=2x=18$ ) e/ou tetraploide ( $2n=4x=36$ ) (HARLAN et al., 1970b). As inflorescências geralmente possuem entre quatro a 16 ráculos em disposição espiral (CARO; SANCHEZ, 1969; TALIAFERRO; ROUQUETTE; MISLEVY, 2004).

*Cynodon transvaalensis* é uma grama bermuda também nativa da África do Sul (DE WET; HARLAN, 1970), que possui características morfológicas distintas, como inflorescências dispostas em três ráculos e folhas finas, eretas e verde-amareladas. Em seu habitat natural, as plantas são normalmente encontradas em áreas úmidas e formam um denso gramado (TALIAFERRO; ROUQUETE; MISLEVY, 2004). A espécie apresenta considerável diversidade genética (WU et al., 2005; TAN et al., 2014) e é encontrada majoritariamente na forma diploide (DE WET; HARLAN, 1970), com apenas um relato de tetraploidia (CHIAVEGATTO et al., 2016).

*Cynodon dactylon* é uma espécie cosmopolita, sendo considerada a mais importante do gênero devido à sua prevalência, ampla distribuição geográfica e ocorrência de citótipos que se diferem em relação ao nível de ploidia (WU et al., 2004; WU; TALIAFERRO, 2009; WU, 2011), sendo a forma tetraploide encontrada com maior frequência na natureza (HARLAN; DE WET, 1969; WU et al., 2006; KANG et al., 2008). A espécie é classificada como grama bermuda, apresentando grossa cutícula e inflorescências com 4 a 6 ráculos em disposição unilateral (CARO; SANCHEZ, 1969). O cruzamento interespecífico de *C. dactylon* ( $2n=4x=36$ ) com *C. transvaalensis* ( $2n=2x=18$ ) originou o híbrido triploide natural *Cynodon* × *magennisii* (HARLAN; DE WET; RICHARDSON, 1969), indicando possível homologia entre os genomas (ALIX et al., 2017). Além disso, Jewell et al. (2012), baseados na observação de trivalentes meióticos, sugeriram que *C. transvaalensis* poderia ser um parental da forma tetraploide de *C. dactylon*.

Caro e Sanchez (1969) descreveram quatro variedades para *C. dactylon*: var. *biflorus* Merino; var. *dactylon* (L.) Pers; var. *longiglumis* Caro & E.A. Sánchez e var. *pilosus* Caro & E.A. Sánchez. No sistema de classificação proposto por Harlan e de Wet (1969) há seis variedades caracterizadas quanto ao comportamento cromossômico e ecológico, distribuição natural e aspectos morfológicos: var. *afghanicus* Harlan. de Wet & Rawal; var. *aridus*; var. *coursii* Harlan. de Wet & Rawal; var. *dactylon*; var. *elegans* Harlan. de Wet & Rawal e var. *polevansii* Harlan. de Wet & Rawal. Entretanto, Clayton et al. (2016), não reconhecem variedades para a espécie, possivelmente devido à dificuldade em delimitar caracteres diagnósticos (SACHDEVA; BHATIA, 1979; GULSEN et al., 2009). Os variantes morfológicos anteriormente apontados para *C. dactylon* poderiam estar relacionados à plasticidade fenotípica (DONG; DE KROON, 1994) ou ao desenvolvimento de ecótipos (TUFAIL et al., 2017).

## 2.2 Caracterização citogenética e evolução cromossômica em *Cynodon*

A realização de análises citogenéticas, como o estabelecimento do nível de ploidia, caracterização do complemento cromossômico e avaliação do pareamento entre homólogos durante a meiose, fornecem dados fundamentais para estudos evolutivos e taxonômicos (CIFUENTES et al., 2010; LE COMBER et al., 2010; BRAZ et al., 2018). Diferentes números básicos de cromossomos foram relatados em *Cynodon*, como  $x=8$  (DHALIWAL; GUPTA, 2011),  $x=9$  (AVDULOV, 1931; HARLAN, DE WET, 1969;

DE SILVA; SNAYDON, 1995) e  $x=10$  (HUNTER, 1934; HURCOMBE, 1947; ROCHECOUSTE, 1962). Entretanto, Forbes e Burton (1963), perceberam que alguns fragmentos ocasionados por quebras cromossômicas ou em função da dificuldade de visualização das constrições secundárias poderiam ser a causa da contagem equivocada, confirmando  $x=9$ . A presença de cromossomos B também foi questionada (POWELL et al., 1968; KANG et al., 2008; SINGHAL; KUMARI; KUMAR, 2014), o que se relaciona aos diferentes números básicos propostos.

A comparação cariotípica em diferentes taxa permite a reconstrução do estado ancestral do número básico, além de determinar relações entre espécies e como estas divergiram (RIESEBERG, 2001; NOOR et al., 2001; HILU, 2004; GUERRA, 2008; MAYROSE; BARKER; OTTO, 2009; PRESGRAVES, 2010; PERUZZI, 2013; MURAT et al., 2017). Nesta perspectiva, Chiavegatto et al. (submetido) sugerem  $x=6$  como número básico ancestral para a subtribo Eleusininae, ocorrendo um evento de disploidia descendente ( $x=5$ ) e posterior processo de poliploidização ( $x=10$ ), cujo clado do gênero *Cynodon* apresenta mais uma perda cromossômica, originando  $x=9$  como caráter derivado. Khanal et al. (2017) acreditam que estes eventos de disploidia são do tipo “nested chromosome fusions” e também propõem a ocorrência de, pelo menos, três eventos independentes de translocação durante a evolução de *Cynodon*.

A fim de compreender os eventos de evolução cromossômica, a caracterização cariotípica pode ser empregada na citotaxonomia por meio de técnicas de citogenética clássica e molecular (GUERRA, 2000; 2008; 2012; CANDAN, 2013). Neste sentido, Chiavegatto et al. (2016), baseando-se em três índices de assimetria (STEBBINS, 1971; ZARCO, 1986; PERUZZI; EROĞLU, 2013), determinaram que *C. nlemfuensis* ( $2n=2x=18$ ) possui cariótipo mais simétrico, enquanto *C. incompletus* ( $2n=2x=18$ ) apresentou maior assimetria e presença de cromossomos submetacêntricos. Deste modo, é possível averiguar mudanças na morfologia cromossômica através da ocorrência de rearranjos, ou alterações do comprimento total do lote haploide por duplicações e deleções (DENG et al., 2019; OSTEVIK et al., 2019).

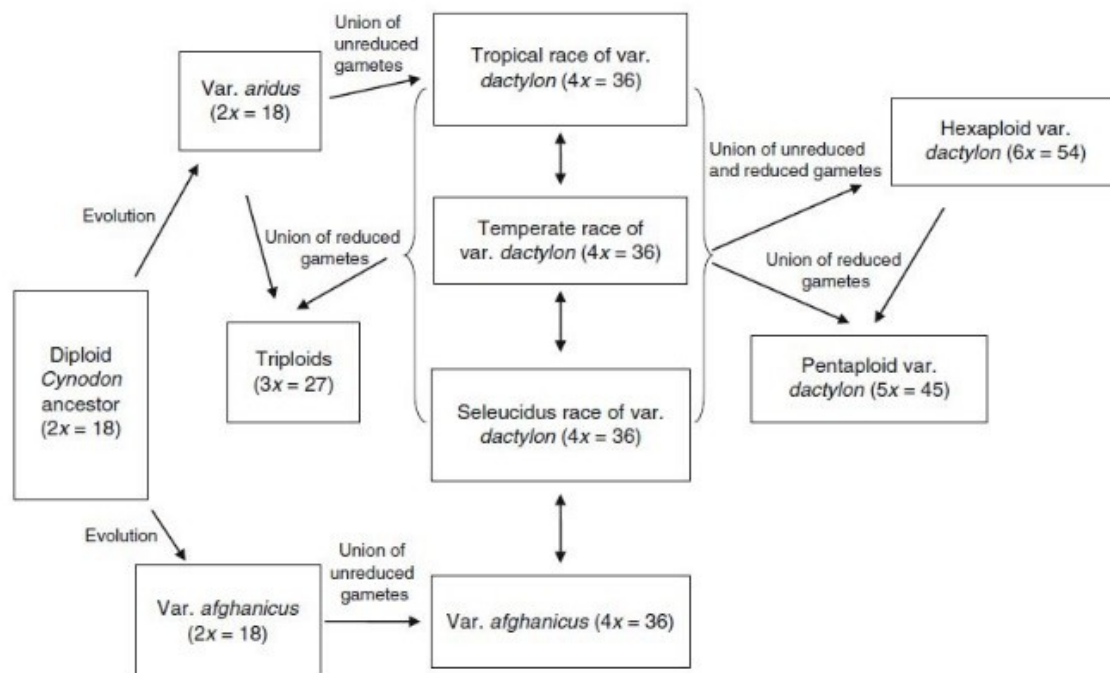
Os sítios de DNA ribossomal, bem como bandas CMA<sup>+</sup> e DAPI<sup>+</sup>, foram considerados como marcadores citogenéticos para a ocorrência de rearranjos cromossômicos estruturais ou ação de elementos transponíveis, explicando o polimorfismo cromossômico entre citótipos de *C. dactylon* (CHAVES et al., 2019; CHIAVEGATTO et al., 2019). Outra forma de variabilidade intraespecífica está relacionada ao tamanho do genoma, com acessos apresentando 1.22 a 2.55pg de DNA



nuclear (CHAVES et al., 2019). No gênero, a discriminação do nível de ploidia é dificilmente realizada por meio deste parâmetro, uma vez que certas plantas não demonstram aumento da quantidade de DNA com aumento do número cromossômico (WU et al., 2006; KANG et al., 2008; CHIAVEGATTO et al., 2016). Este fator pode ser explicado devido à ocorrência de reestruturação genômica pós-poliploidização, com processos relacionados a perda ou amplificação de sequências, alterando a quantidade de DNA (LEITCH et al., 2008). Outra possibilidade se refere às diferenças no valor C em espécies parentais envolvidas na formação de alopoliploides (TATE; SOLTIS; SOLTIS, 2005; MARKOVA; VYSKOT, 2009).

Além de mecanismos como disploidia, diversos eventos de poliploidia ocorreram em *Cynodon*, os quais foram responsáveis por originar citótipos (WU, 2009; 2011). Harlan e de Wet (1969) propõem que a diversidade genética de *C. dactylon* se deve a uma possível divisão da população com base no comportamento cromossômico, cuja formação de gametas não reduzidos ou duplicação dos cromossomos nos estágios embrionários resultaram em formas triploides, tetraploides, pentaploides e hexaploides (MALIK; TRIPATHI, 1968; WU et al., 2004; GULSEN et al., 2009; WU, 2009) (FIGURA 1). Apesar desta proposta, poucas evidências estão disponíveis (HARLAN; DE WET, 1969) e, para compreensão de tais eventos, o estudo meiótico faz-se importante para indicar diferenças na composição genômica e similaridades genéticas entre as espécies (MOORE, 2002; BROWNFIELD; KÖHLER, 2010; CIFUENTES et al., 2010; MASON; PIRES, 2015; ROCHA et al., 2019).

Figura 1 - Origem dos citótipos de *Cynodon dactylon*.



Fonte: Wu (2009).

Embora as pesquisas com marcadores moleculares tenham evidenciado a diversidade genética em algumas espécies de *Cynodon*, a constituição, evolução e a forma de herança de seu genoma são amplamente desconhecidas (GULSEN et al., 2009; KHANAL et al., 2017). Apesar de alguns estudos apontarem autoploidia (HARLAN et al., 1966; HOFF, 1968; BETHEL et al., 2006), outros indicam aloploidia em *C. dactylon*, a maioria utilizando marcadores SSR e mapas genéticos (FELDER, 1967; BRILMAN, 1981, GULSEN et al., 2009; HARRIS-SHULTZ et al., 2010; GONG et al., 2013; GUO et al., 2015; 2017). Felder (1967), sugeriu que as formas diploides de *C. coursii*; *C. dactylon*; *C. incompletus* e *C. transvaalensis* formariam um complexo taxonômico devido à maior facilidade de desenvolvimento de híbridos com regularidade meiótica, propondo que estas espécies demonstrariam um genoma comum (DD), enquanto os alotetraploides apresentariam genoma DDD'D'. Entretanto, até o momento, nenhum estudo utilizando GISH foi realizado em *Cynodon* ou em espécies de gêneros relacionados.

Em autoploides espera-se pareamento cromossômico em multivalentes e herança polissômica, enquanto em aloploides genômicos observa-se apenas bivalentes intragenômicos e herança dissômica (SYBENGA, 1992). Em aloploides

segmentais, a hibridação de espécies taxonomicamente próximas demonstra homeologia cromossômica (STEBBINS, 1971; SYBENGA, 1992), o que foi proposto para origem de *C. dactylon* (FELDER, 1967; HARRIS-SHULTZ et al., 2010). A formação majoritária de bivalentes e de alguns multivalentes em tetraploides da espécie, reforça o indicativo de aloploidia segmental (FORBES; BURTON, 1963; HARLAN; DE WET, 1969; HANNA; BURTON, 1977; BRILMAN, 1981; SILVA et al., 2018). Além disso, o mapa de ligação elaborado por Guo et al. (2017) confirmou o comportamento preferencial de bivalentes em *C. dactylon*.

Em poliploides, principalmente nos que possuem contribuições de diferentes genomas, a estratégia de formação de bivalentes está relacionada ao processo de diploidização, o qual aumenta a estabilidade genômica e reduz as taxas de infertilidade (JENKINS; REES, 1991; DORONE, 2013). A partir de estudos moleculares, Khanal et al. (2017) sugeriram que *C. dactylon* está em estado avançado de diploidização, o que também sustenta a hipótese de paleopoliploidia em espécies da subtribo Eleusininae (CHIAVEGATTO et al., submetido).

Durante o processo de diploidização, a consequente reestruturação do genoma pode desencadear rearranjos cromossômicos e levar à perda de sequências repetitivas (SOLTIS; SOLTIS, 1999; SALINA et al., 2004; MUTTI; BULLAR; GILL, 2017). Em conformidade, Chiavegatto et al. (2019), observaram uma tendência de perda de bandas DAPI<sup>+</sup> na região terminal do braço curto e em região (peri)centromérica durante a evolução cromossômica de *Cynodon*. Chaves et al. (2019) também verificaram alterações no número de blocos heterocromáticos em acessos tetraploides de *C. dactylon*, o que poderia aumentar a divergência entre os cromossomos promovendo o comportamento meiótico diploide. Outra situação relacionada ao comportamento diploide em espécies reconhecidamente aloploidias é a presença de genes supressores do pareamento homeólogo, tais como o ph1 encontrado no cromossomo 5B (CIFUENTES et al., 2010) e ph2 no cromossomo 3D (SUTTON et al., 2003) em *Triticum aestivum* L. e ainda o gene prBN de *Brassica napus* L. (JENCZEWSKI et al., 2003).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

Foram avaliadas quatro espécies de *Cynodon* (TABELA 1) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do United States Department of Agriculture (USDA) de Griffin na Georgia e cedidos pelo programa de melhoramento conduzido pela Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora - MG.

Tabela 1 - Identificação dos acessos de *Cynodon*.

Espécie	Número Cromossômico	Acesso
<i>C. dactylon</i>	2n=2x=18 <sup>a</sup>	PI 291169-04
<i>C. dactylon</i>	2n=3x=27 <sup>a</sup>	PI 477004-26
<i>C. dactylon</i>	2n=4x=36 <sup>b</sup>	PI 287244-16
<i>C. dactylon</i>	2n=5x=45 <sup>c</sup>	PI 289750-10
<i>C. transvaalensis</i>	2n=4x=36 <sup>c</sup>	PI289923-09
<i>C. incompletus</i>	2n=2x=18 <sup>c</sup>	PI 29175301 PL15
<i>C. nlemfuensis</i>	2n=2x=18 <sup>c</sup>	ERX-7 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Chaves et al., (2019);

<sup>b</sup> Primeira contagem cromossômica;

<sup>c</sup> Chiavegatto et al., (2016);

<sup>d</sup> Genótipo de grama-estrela roxa. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG.

#### 3.2 Preparo de Lâminas

Para a obtenção de metáfases mitóticas, raízes foram coletadas às 12 horas; pré-tratadas com ciclohexamida (0,0025%) por 2 horas e 10 minutos em temperatura ambiente (TA); fixadas em Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético) e armazenadas à -20°C. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada e em tampão citrato-fosfato (pH 4,8) contendo Triton X-100 a 1%, por 10 minutos. O material foi submetido a mais três lavagens em água destilada e uma lavagem em tampão citrato-fosfato. Em seguida, as raízes foram submetidas à digestão enzimática (10µL de celulase/pectinase 4:2 + 5µL de pectoliase 5% + 5µL de citohelicase 5%) por 2 horas e 12 minutos em banho-seco, à 37°C. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação e secagem ao ar (CARVALHO; SARAIVA, 1993).

### 3.3 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico (gDNA) foi realizada com protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1987). Cerca de 1g de folhas jovens das espécies diploides e tetraploides de *Cynodon* foram maceradas em nitrogênio líquido e adicionado 10 mL de tampão CTAB pré-aquecido a 65°C para homogeneização. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30min, realizando agitação a cada 10min.

Com as amostras em TA, foram adicionados 10 mL de clorofórmio-álcool isoamílico. Em seguida foi realizada centrifugação a 5000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado e adicionado 3 vezes o volume de álcool-acetato de amônio a -20°C. A amostra foi armazenada a -20°C por 1 hora para a precipitação do DNA e retirada do excesso de álcool-acetato de amônio.

O DNA foi dissolvido em aproximadamente 300µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) e, posteriormente, adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico, com centrifugação de 5min a 5000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e adicionado 3x o volume com álcool-acetato de sódio. Após 24 horas, a amostra foi novamente centrifugada, sendo retirado o álcool-acetato. O DNA foi ressuspendido em água ultra pura e quantificado em aparelho NanoView.

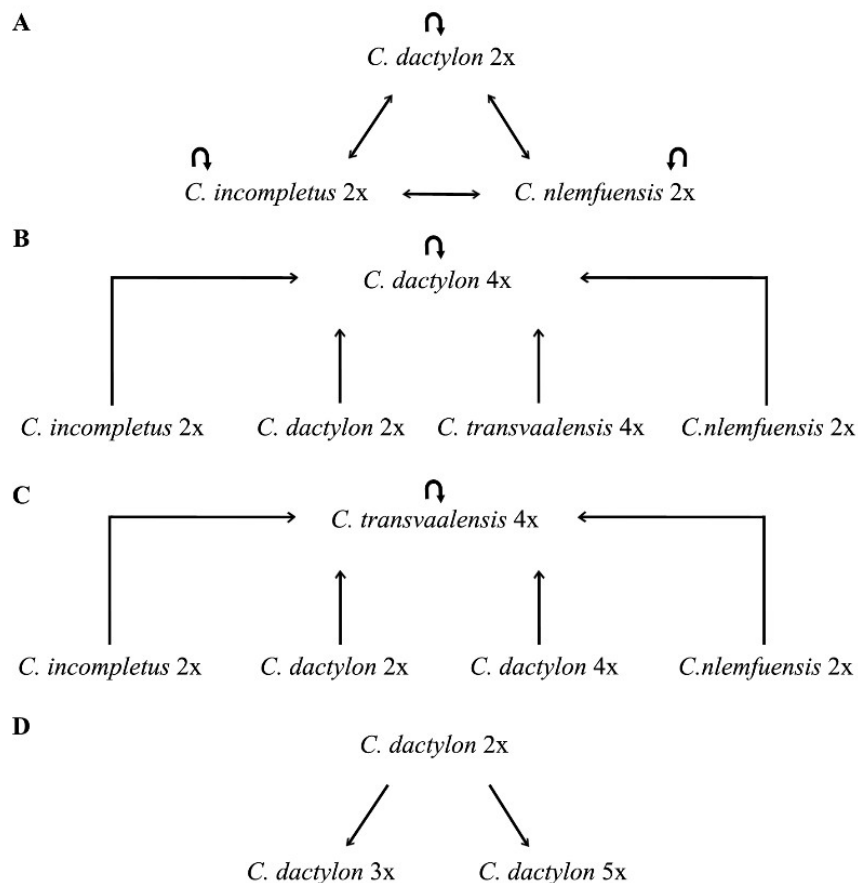
### 3.4 Preparo de sondas

As sondas dos acessos diploide e tetraploide de *C. dactylon* e demais espécies foram marcadas por meio da reação “nick translation” (BRAMMER et al., 2009). As reações foram realizadas a 15°C por cerca de 1h e 45min, contendo 1µL de DNA (1.000 ng/µL); 2,5µL de tampão (0,5 M Tris HCl pH 7,5 - 50mM MgCl<sub>2</sub>); 2,5 µL nucleotídeos marcados com digoxigenina ou biotina (0,33 mM dTTP + 0.16 mN dUTP); 2,5 µL de nucleotídeos não marcados (dATP, dCTP e dGTP a 0,5 mM cada); 1 µL de DNase I (0,02 U); 1,5 µL DNA Polimerase I (0,5 U) e 14 µL de água ultra. As sondas utilizadas para a GISH apresentavam cerca de 300pb.

### 3.5 Hibridização *in situ* genômica (GISH)

Primeiramente foram realizadas análises de GISH comparativa (cGISH), double-GISH (dGISH) e self-GISH para compreender a relação genômica entre as espécies diploides (FIGURA 2A). GISH comparativa com sondas genômicas das espécies diploides foi realizada em *C. dactylon* ( $2n=4x=36$ ) e *C. transvaalensis* ( $2n=4x=36$ ). Além disso, GISH recíproca e self-GISH foram empregadas para as espécies tetraploides (FIGURA 2B e C). Por fim, uma análise com foco nos citótipos de *C. dactylon* foi realizada utilizando a sonda gDNA diploide nos acessos triploide e pentaploide (FIGURA 2D).

Figura 2 - Diagrama representando a organização das análises da GISH em espécies de *Cynodon*.



Legenda: Setas duplas indicam GISH recíproca. Setas curvas indicam self-GISH. A: cGISH, dGISH e self-GISH em espécies diploides. B: cGISH e self-GISH em *C. dactylon* tetraploide. C: cGISH e self-GISH em *C. transvaalensis*. D: cGISH em citótipos triploide e pentaploide de *C. dactylon*. Fonte: Do autor (2020).

Para a realização da GISH, foi utilizado um protocolo adaptado de Brammer et al. (2009). As preparações cromossômicas foram pós-fixadas (10 $\mu$ L de formaldeído e

90µL de tampão SSC 2x) por 5min. A desnaturação foi realizada com 100µL de formamida 70% em SSC 2x a 85°C por 1 min e 26s. Em seguida, as lâminas foram submetidas a série alcoólica (etanol 70%, 90% e 100%) a -20°C por 5 minutos cada. A mistura de hibridização foi preparada com 15 µL de formamida 100%; 3 µL de SSC 20x pH 7,0; 2 µL de sonda marcada; 6 µL de sulfato de dextran 50% e 4 µL de água ultra pura. A desnaturação foi realizada a 95°C por 8 minutos, seguida de incubação no gelo por 5 min. A realização da GISH sem o uso de DNA bloqueio foi empregada devido a técnica ser inédita para espécies do gênero e para a verificação do padrão de marcação das sondas genômicas.

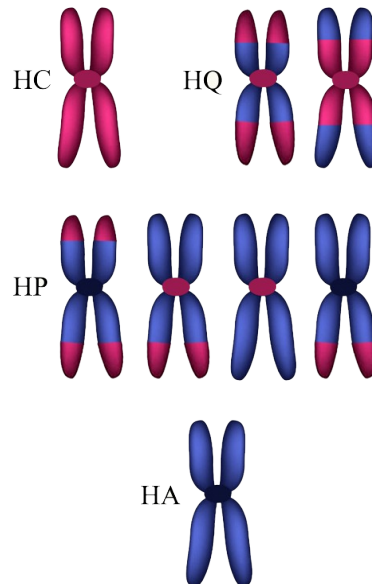
A hibridização foi executada por cerca de 48 horas a 37°C em câmara úmida. Posteriormente foram realizadas lavagens em SSC 2x por 5 minutos, SSC 2x a 42°C por 10 minutos e TNT 1x por 5 minutos. A detecção foi feita com o uso dos anticorpos antidigoxigenina-rodamina e streptavidina-alexafluor 488. As lâminas foram incubadas por 1h a 37°C em câmara úmida, seguido de três lavagens de 5 minutos em TNT 1x e uma lavagem em PBS 1x sob agitação.

As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 com câmara monocromática refrigerada usando filtros específicos para DAPI (Excitação: 330-385 nm; Emissão: 420nm), rodamina (Excitação: 400-410nm; Emissão: 455nm) e alexafluor 488 (Excitação: 490nm Emissão: 525nm). As imagens obtidas foram processadas para ajustes de brilho e contraste no software Photoshop CS6®.

Para avaliar a proporção dos genomas foram realizadas medições da área total dos cromossomos em relação a área hibridizada pelas sondas, com auxílio do software livre ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012). Para as análises de GISH comparativa foram medidas 10 metáfases para cada acesso/sonda. Em dGISH foram avaliadas cinco metáfases e núcleos para cada espécie diploide. Para a construção de cariótipos em self-GISH foram medidas cinco metáfases em cada espécie diploide e tetraploide sob auxílio do software Karyotype (ALTINORDU et al., 2016).

Para a compreensão da organização cromossômica e genômica das espécies diploides e citótipos triploide e pentaploide de *C. dactylon*, foi adotada a classificação da figura 3. Considerando a ocorrência de aloploidia em *C. dactylon* 4x e *C. transvaalensis* 4x, os cromossomos completamente ou quase completamente marcados e os que apresentaram maior percentual de hibridização foram agrupados representando um genoma (G1), enquanto os cromossomos parcialmente marcados ou com ausência/reduzida proporção de hibridização formaram outro genoma (G2).

Figura 3 - Padrões de hibridização (em rosa) em cromossomos de *Cynodon*.



Legenda: HC: hibridização completa. HQ: hibridização quase completa. HP: hibridização parcial. HA: hibridização ausente ou reduzida proporção de hibridização. Fonte: Do autor (2020).

### 3.6 Apuração da ocorrência de gametas não reduzidos

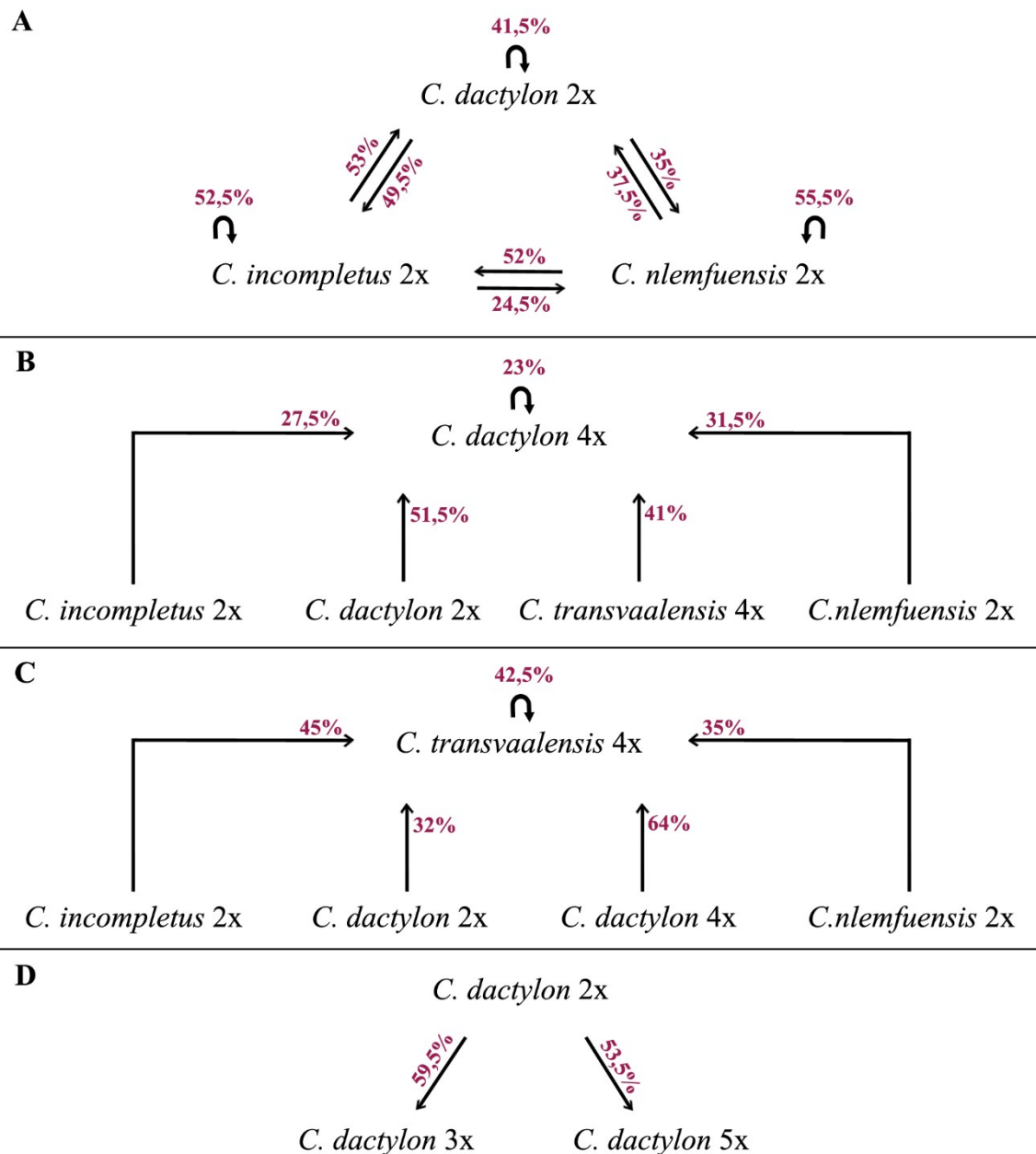
Inflorescências jovens de *C. dactylon* ( $2n=2x=18$ ) foram coletadas e fixadas em álcool etílico: ácido acético: ácido propiônico (6:3:2) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O preparo de lâminas seguiu a técnica de esmagamento (GUERRA; SOUSA, 2002). Para análise de ocorrência de gametas não reduzidos foram medidos os diâmetros polar e equatorial (ERDTMAN, 1943) de 350 grãos de pólen com auxílio do programa ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012). As medidas foram submetidas à análise de variância e teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5% de probabilidade pelo programa Sisvar (FERREIRA, 2014). Para a análise de viabilidade polínica foram avaliados 200 grãos de pólen/lâmina em 5 lâminas utilizando o corante Alexander. As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Carl Zeiss, AxioLabA1) equipado com microcâmera (AxioCam ICc1) para captura das imagens.



#### 4 RESULTADOS

Diferentes padrões e proporções de hibridização foram observados conforme o tipo de sonda utilizada e espécie em análise (FIGURAS 3 e 4). As marcas GISH frequentemente estavam colocalizadas com as bandas DAPI<sup>+</sup> e, portanto, posicionadas preferencialmente em região terminal e (peri)centromérica e, em menor frequência, se estendendo para a região distal.

Figura 4 - Proporção (%) de hibridização dos genomas de espécies de *Cynodon* obtidos pela GISH.



Fonte: Do autor (2020).

#### 4.1 Análise citogenômica de espécies diploides de *Cynodon*

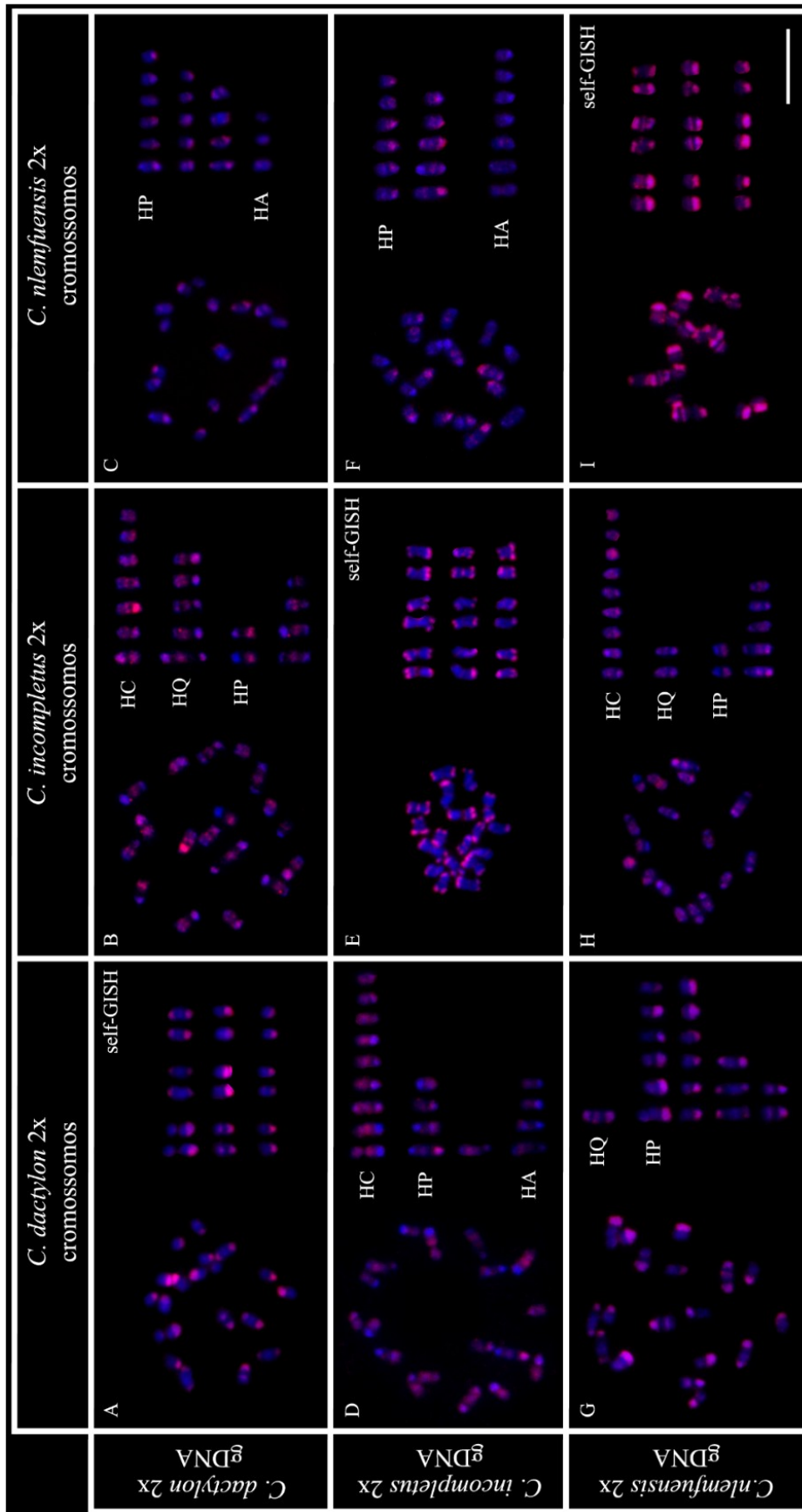
A proporção das regiões cromossômicas hibridizadas em análises de GISH comparativa foi maior entre os genomas de *C. dactylon* e *C. incompletus* (FIGURA 4A), o que pode ser constatada pela marcação completa de aproximadamente nove cromossomos na GISH recíproca (FIGURA 5B e D). *Cynodon nlemfuensis* apresentou apenas cromossomos hibridizados parcialmente ou com ausência de marcação com as sondas genômicas de *C. dactylon* e *C. incompletus* (FIGURA 5C e F).

Nas três espécies diploides avaliadas, algumas regiões cromossômicas apresentaram-se hibridizadas tanto em self-GISH como em dGISH (FIGURAS 5A, E, I e 6A, B e C). Em *Cynodon incompletus* foi observada maior homogeneização para sequências de *C. dactylon* e *C. nlemfuensis*, cujos núcleos interfásicos demonstraram cromocentros menos evidentes em comparação com as demais espécies. Observa-se também uma delimitação sutil dos genomas de *C. dactylon* e de *C. nlemfuensis*, os quais parecem ocupar domínios diferentes em núcleos de *C. incompletus* (FIGURA 6B).

As regiões terminais dos cromossomos de *C. dactylon* mostraram-se majoritariamente hibridizadas com a sonda de *C. nlemfuensis*, com algumas colocalizações com o gDNA de *C. incompletus*, o que também foi verificado nos cromocentros dos núcleos interfásicos. A região intersticial de todos os cromossomos de *C. dactylon* foram hibridizadas com o gDNA de *C. incompletus* (FIGURA 6A). O oposto foi observado nos cromossomos de *C. nlemfuensis*, os quais demonstraram menor intensidade de marcação com a sonda de *C. incompletus* (FIGURA 6C).

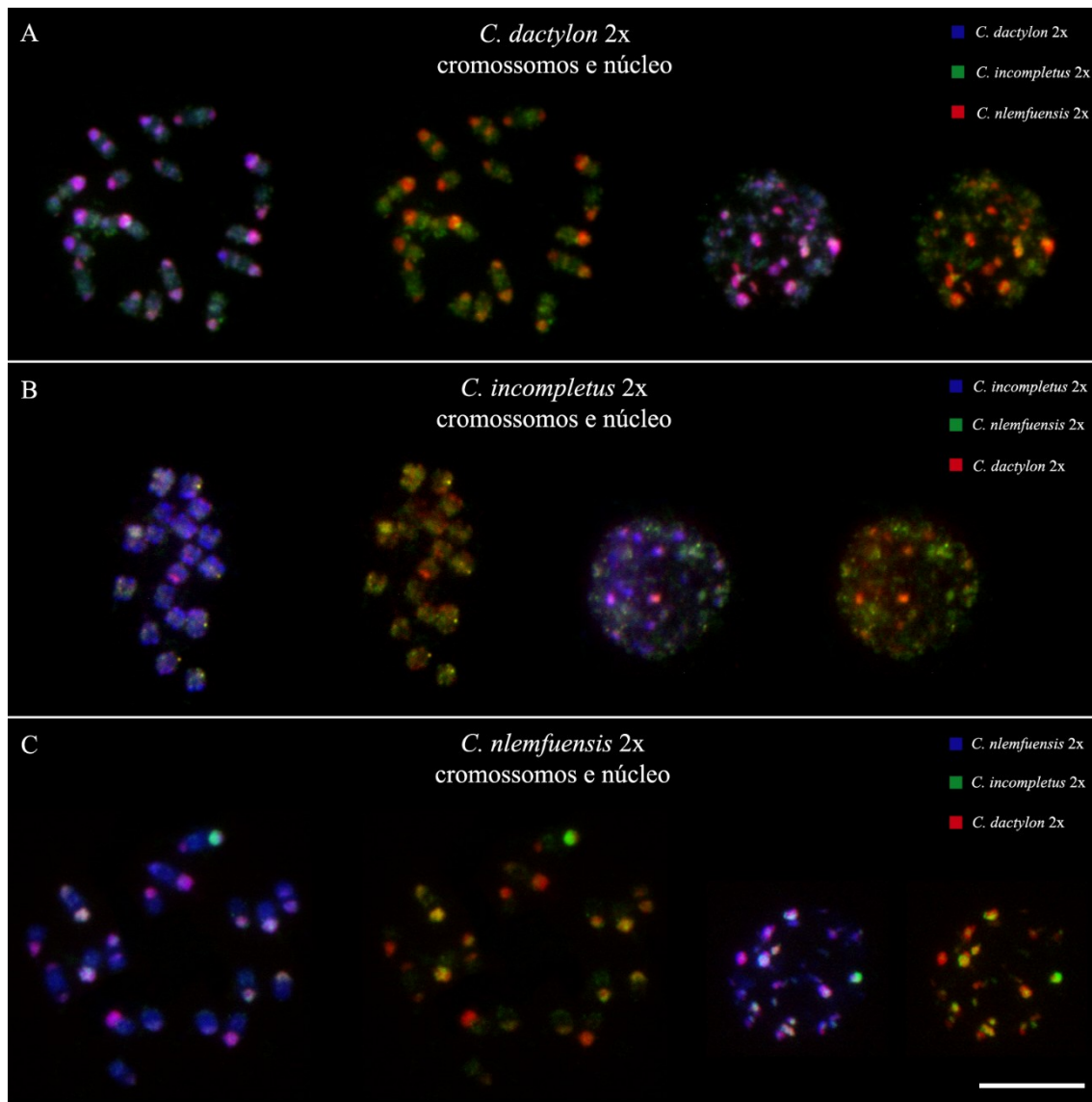
A partir da self-GISH foi possível identificar bandas que auxiliaram na organização do cariótipo e evidenciaram diferenciação cromossômica entre as espécies (FIGURA 5A, E e I). *Cynodon nlemfuensis* apresentou maior porcentagem de auto hibridização (55,5%), seguido por *C. incompletus* (52,5%) e *C. dactylon* (41,5%). Destas, *Cynodon nlemfuensis* demonstra um padrão de marcação mais disperso (FIGURA 5I).

Figura 5 - cGISH e self-GISH em espécies diploides ( $2n=2x=18$ ) de *Cynodon*.



Legenda: Barra: 10μm. Fonte: Do autor (2020).

Figura 6 - dGISH em espécies diploides ( $2n=2x=18$ ) de *Cynodon*.



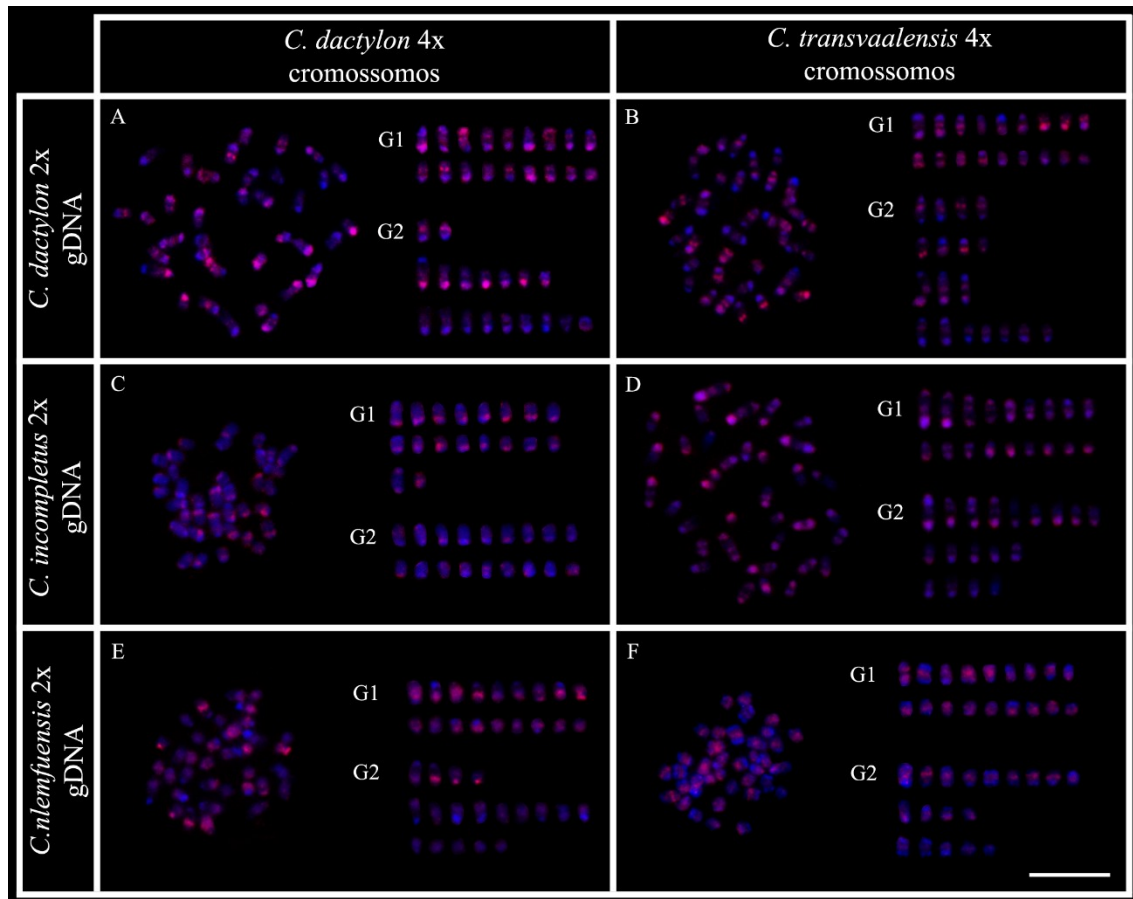
Legenda: Barra: 10 $\mu$ m. Fonte: Do autor (2020).

#### 4.2 GISH comparativa em *C. dactylon* tetraploide

O padrão de hibridização de *C. dactylon* diploide em *C. dactylon* tetraploide evidenciou nove cromossomos completamente marcados, 18 parcialmente hibridizados e nove cromossomos com ausência de hibridização (FIGURA 7A), totalizando 51,5% de contribuição genômica (FIGURA 4B). A sonda de gDNA de *C. nlemfuensis* evidenciou nove cromossomos completamente marcados, 13 com marcas parciais e 14 cromossomos com ausência ou reduzida proporção de hibridização (FIGURA 7E), totalizando um percentual de 31,5% nos cromossomos de *C. dactylon* 4x (FIGURA 4B). Também foi possível observar uma diminuição da contribuição do genoma de *C.*

*incompletus* em *C. dactylon* tetraploide (27,5%) comparando-se com *C. dactylon* diploide (53%), ocorrendo apenas cromossomos parcialmente marcados ou com ausência de hibridização (FIGURAS 4B e 7C).

Figura 7 - GISH comparativa em *C. dactylon* ( $2n=4x=36$ ) e *C. transvaalensis* ( $2n=4x=36$ ).



Legenda: G1 e G2 indicam separação de dois putativos genomas, sendo, respectivamente, representados por cromossomos completamente ou quase completamente hibridizados e por cromossomos parcialmente hibridizados ou com ausência de hibridização. Barra: 10 $\mu$ m. Fonte: Do autor (2020).

### 4.3 GISH comparativa em *C. transvaalensis*

A sonda de *C. dactylon* diploide evidenciou oito cromossomos completamente marcados, 21 com marcas parciais e sete cromossomos com ausência de hibridização (FIGURA 7B), totalizando 32% de similaridade genômica com *C. transvaalensis* (FIGURA 4C). Em relação à sonda genômica de *C. nlemfuensis* a contribuição também foi semelhante (35%, FIGURA 4C), porém com nove cromossomos completamente marcados, 22 com marcas parciais e cinco cromossomos com ausência de hibridização (FIGURA 7F). A sonda de *C. incompletus* evidenciou nove cromossomos

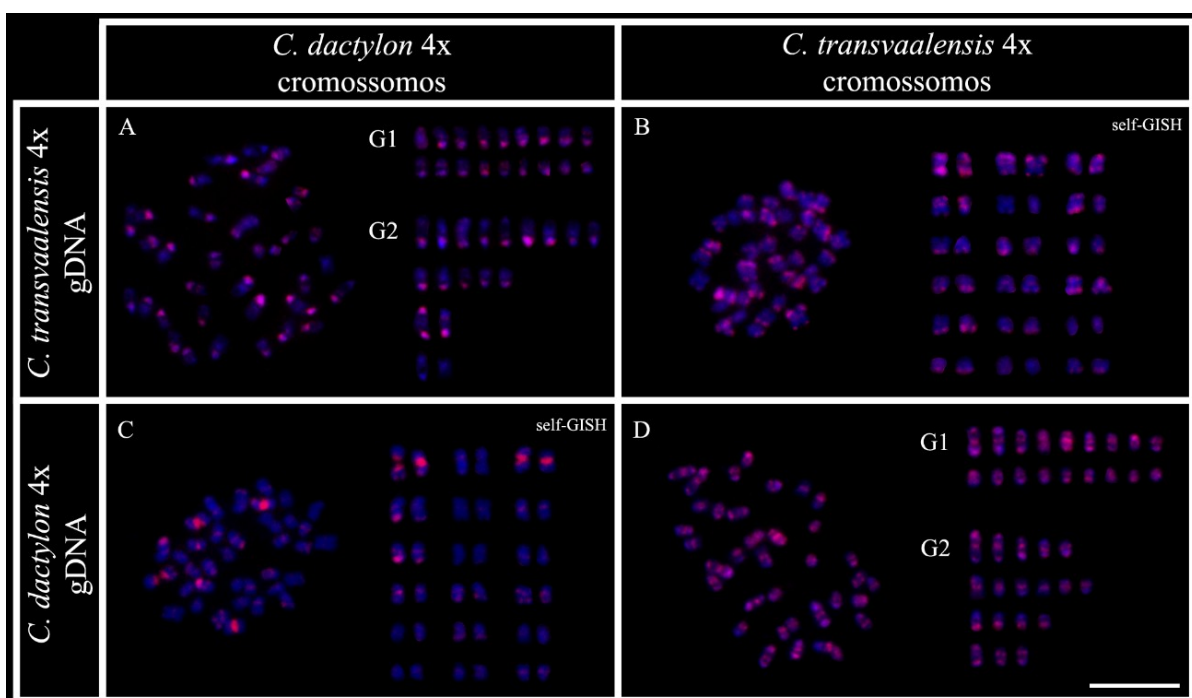
completamente ou quase completamente marcados, 23 com hibridização parcial e apenas quatro cromossomos com ausência de hibridização (FIGURA 7D), totalizando um percentual de 45% sobre o genoma de *C. transvaalensis* (FIGURAS 4C).

#### 4.4 GISH recíproca e self-GISH nas espécies tetraploides *C. dactylon* e *C. transvaalensis*

A GISH recíproca entre estas espécies demonstrou similaridade genômica. Entretanto, o genoma de *C. dactylon* tetraploide foi mais representativo em *C. transvaalensis* (64%) do que o inverso (41%) (FIGURA 4B e C). A sonda genômica de *C. dactylon* 4x nos cromossomos de *C. transvaalensis* 4x evidenciou 21 cromossomos completamente ou quase completamente marcados e 15 com marcas parciais (FIGURA 8D). A sonda de *C. transvaalensis* 4x em cromossomos de *C. dactylon* 4x sinalizou apenas quatro cromossomos completamente hibridizados, com os demais apresentando hibridização parcial ou ausência de marcação (FIGURA 8A).

A self-GISH nas espécies tetraploides também evidenciou bandas cromossômicas e diferenciação cariotípica (FIGURA 8B e C). *Cynodon transvaalensis* demonstrou maior porcentagem de auto hibridização (42,5%), enquanto *C. dactylon* apresentou apenas 23%.

Figura 8 - Self-GISH e GISH recíproca em *C. dactylon* ( $2n=4x=36$ ) e *C. transvaalensis* ( $2n=4x=36$ ).



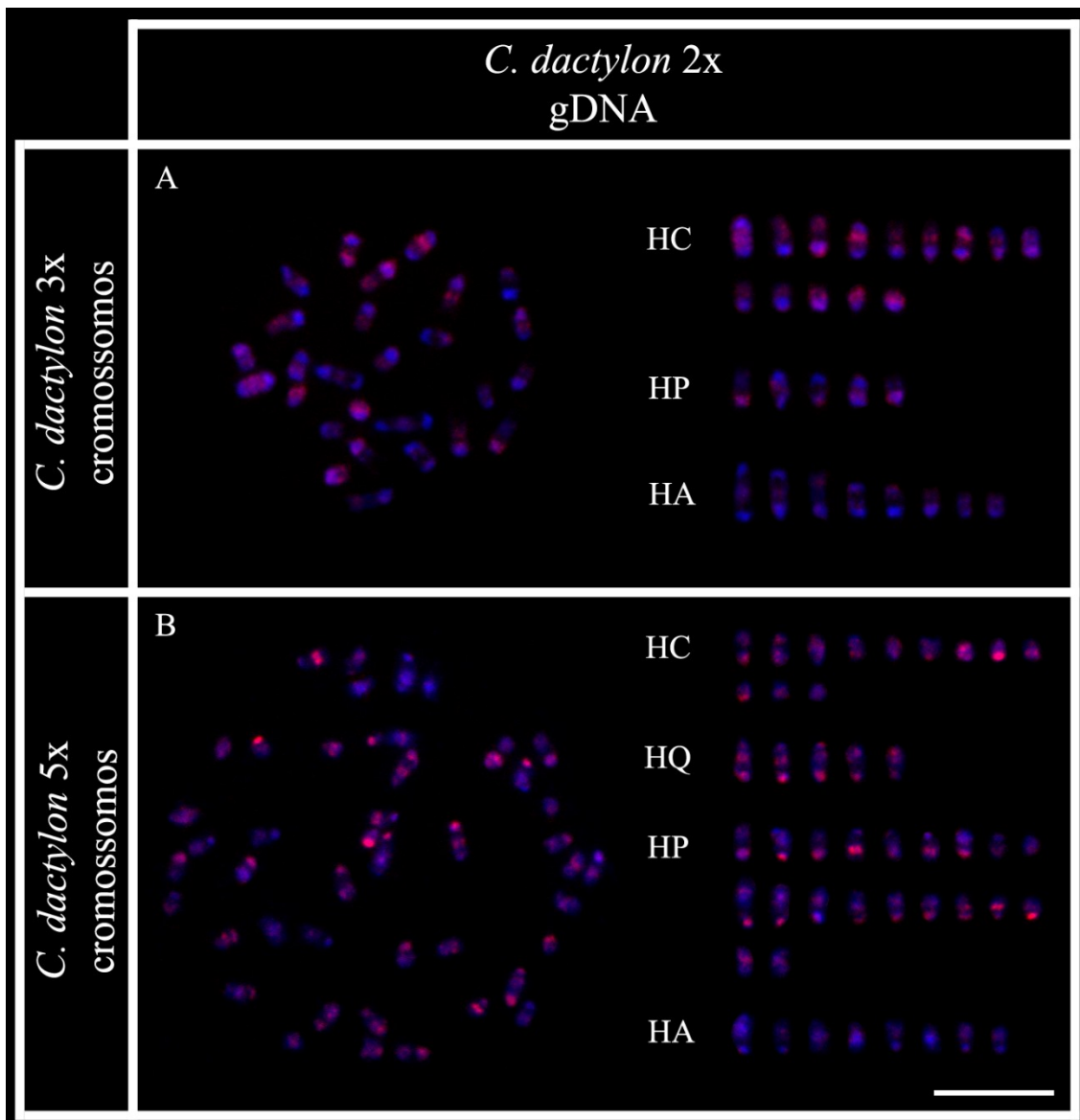
Legenda: G1 e G2 indicam separação de dois putativos genomas, sendo, respectivamente, representados por cromossomos completamente ou quase completamente hibridizados e por cromossomos parcialmente hibridizados ou com ausência de hibridização. Barra: 10 $\mu$ m. Fonte: Do autor (2020).

#### 4.5 GISH comparativa em citótipos de *C. dactylon*

A fim de investigar a contribuição do genoma diploide nos demais citótipos de *C. dactylon*, um acesso triploide e um pentaploide foram avaliados. O acesso triploide apresentou 14 cromossomos com hibridização completa, cinco com hibridização parcial e oito cromossomos não marcados pela sonda de *C. dactylon* 2x (FIGURA 9A), totalizando 59,5% de similaridade (FIGURA 4D). O acesso pentaploide apresentou 17 cromossomos completamente ou quase completamente marcados, 20 com marcas parciais e oito cromossomos com ausência de hibridização (FIGURA 9B), totalizando 53,5% de similaridade (FIGURA 4D).

Figura 9 - GISH comparativa em citótipos triploide ( $2n=3x=27$ ) e pentaploide ( $2n=5x=45$ ) de *C. dactylon*.



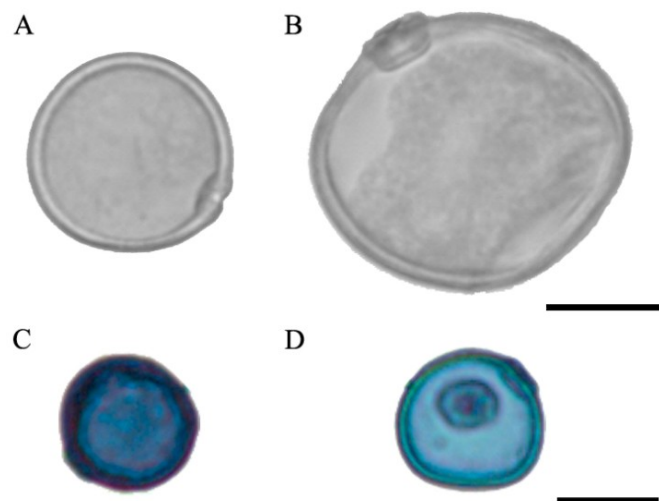


Legenda: Barra: 10  $\mu\text{m}$ . Fonte: Do autor (2020).

#### 4.6 Apuração da ocorrência de gametas não reduzidos

Foram observados grãos de pólen com cerca de 16 $\mu\text{m}$  para ambos os diâmetros polar e equatorial (FIGURA 10A). Entretanto, grãos de pólen com cerca de 20,5 $\mu\text{m}$  foram encontrados em uma frequência de 24%, sugerindo tratar-se da formação de gametas não reduzidos (FIGURA 10B). Os grãos de pólen maiores e menores apresentaram taxa de viabilidade similares (62% e 73%, respectivamente).

Figura 10 - Grãos de pólen de diferentes tamanhos em *C. dactylon* diploide.



Legenda: A e B representam a ocorrência de gametas reduzidos e não reduzidos, respectivamente. C e D representam grãos de pólen viáveis e inviáveis, respectivamente. Barras: 10  $\mu\text{m}$ . Fonte: Do autor (2020).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Análise citogenômica em espécies diploides de *Cynodon*

O padrão de hibridização entre os comossomos/genomas das três espécies diploides revelou a predominância de marcação em blocos heterocromáticos. Os sinais GISH estavam majoritariamente colocalizados com as bandas DAPI<sup>+</sup>, as quais foram descritas como importantes marcadores citotaxonômicos para *Cynodon* (CHAVES et al., 2019; CHIAVEGATTO et al., 2019). Em alguns cromossomos, as regiões ricas em adenina e timina, principalmente em região terminal, não apresentaram marcação para as sondas, o que ressalta os distintos padrões de hibridização, presença de polimorfismo cromossômico e diversidade de repeats em blocos heterocromáticos, o que pode ser explicado, por exemplo, pela diversidade de sequências subteloméricas encontradas em plantas (MARION, 2014; MAJKA et al., 2017).

Houve divergência entre sequências repetitivas das espécies diploides avaliadas. *Cynodon nlemfuensis*, por exemplo, apresentou maior número de cromossomos com ausência de marcas GISH e, conseqüentemente, menor percentual de hibridização com as sondas genômicas de *C. dactylon* e *C. incompletus*, condição evidenciada principalmente em dGISH. Deste modo, *C. nlemfuensis* aparenta demonstrar maior diversidade de sequências espécie-específicas (SEE) em comparação com as demais

espécies diploides, uma vez que a técnica de GISH se baseia na existência de sequências divergentes (SCHUBERT et al., 2001). A origem de SEE ainda é incerta, mas pode ser associada ao acúmulo de mutações e/ou atividade de elementos transponíveis (BELYAYEV; RASKINA; NEVO, 2001a).

A presença e ausência de marcações em regiões (peri)centroméricas sugere variação interespecífica e intercromossomal para a composição de centrômeros em *Cynodon*. Situação semelhante foi observada em *Thinopyrum ponticum* syn. *Thinopyrum obtusiflorum* (DC.) Banfi, que apresentou esta região cromossômica com marcas distintas quando utilizadas as sondas dos genomas A, D, J e J<sup>s</sup> correspondentes a diferentes espécies do gênero e da família Poaceae (SEPSI et al., 2008). Em *Brassica* L. (LIM et al., 2007), trigo (SU et al., 2019) e arroz (BAO et al., 2006) foram observadas variações interespecíficas e entre cromossomos para a sequências centroméricas com o uso de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Vários estudos têm discutido que a diversidade de DNA satélite em centrômeros (COMAI; MAHESHWARI; MARIMUTHU, 2017) representa um paradoxo entre sua composição e a conservação de sua função (HENIKOFF; AHMAD; MALIK, 2001; JIANG et al., 2003).

O número de cromossomos hibridizados em região (peri)centromérica pelas sondas genômicas das espécies diploides em metáfases de *C. transvaalensis* foi maior em comparação à *C. dactylon* 2x e 4x. Deste modo, é possível inferir que durante a divergência das linhagens de *C. dactylon* e *C. transvaalensis* (CHIAVEGATTO et al., submetido), esta teria conservado um maior número de sequências centroméricas de seu ancestral. Diante o exposto, a evolução e a diversidade de sequências repetitivas podem ter sido uma das principais forças para a divergência de espécies do gênero, como proposto para *Cucumis* L. (ZHANG et al., 2015).

Os percentuais e os padrões de hibridização observados pela GISH comparativa demonstraram que *C. dactylon* e *C. incompletus* possuem genomas mais similares em comparação a *C. nlemfuensis*. A maior homologia genômica entre *C. dactylon* e *C. incompletus* se contrapõe às análises filogenéticas baseadas em DNA plastidial e ribossomal, as quais apontam que *C. incompletus* seria mais distantemente relacionado com *C. dactylon* (MUCHUT et al., 2017; CHIAVEGATTO et al., submetido). Entretanto, Majka et al. (2017) observaram relações genômicas em espécies filogeneticamente distantes da subfamília Pooideae, o que demonstra que algumas classes de DNA repetitivo podem ser amplamente conservadas em nível de gênero ou

hierarquias taxonômicas maiores (BELYAYEV; RASKINA; NEVO, 2001b; SHARMA; RAINA, 2005; ZHANG et al., 2015).

Especificamente, Chiavegatto et al. (2019), demonstraram que a reconstrução do estado cariotípico ancestral do gênero sugere que *C. dactylon* ( $2n=2x=18$ ) e *C. nlemfuensis* ( $2n=2x=18$ ) são intimamente relacionados quanto ao número e posição dos sítios ribossomais e bandas heterocromáticas. A divergência entre este dado e as proporções de hibridização da GISH pode ser explicada em razão de que a maioria das regiões terminais dos cromossomos de *C. dactylon* 2x foram marcadas pelo genoma de *C. nlemfuensis*, locais onde houve colocalização com as bandas DAPI<sup>+</sup>. Esta situação foi possivelmente responsável por evidenciar a semelhança dos cariótipos dessas espécies (CHIAVEGATTO et al., 2019). Harlan et al. (1970b) também haviam sugerido que *C. nlemfuensis* ( $2n=2x=18$ ) apresentava similaridades genéticas e morfológicas com citótipos diploides de *C. dactylon*, postulando que os taxa seriam estritamente próximos.

Na tentativa de estabelecer as relações de afinidade genômica, Felder (1967) sugeriu que as formas diploides de *C. coursii*; *C. dactylon*; *C. incompletus* e *C. transvaalensis* formariam um complexo taxonômico devido à maior facilidade de desenvolvimento de híbridos com regularidade meiótica, propondo que essas espécies apresentariam um genoma comum, designado como DD, enquanto suas formas tetraploides apresentariam genoma DDD'D', indicando constituição genômica típica de alopoliploides segmentais. Desta forma, baseando-se nos resultados da GISH, que confirmam a homeologia entre os genomas das espécies, e utilizando a designação dos genomas "D", a nomenclatura proposta para *C. dactylon*, *C. incompletus* e *C. nlemfuensis* é DD, D<sup>1</sup>D<sup>1</sup> e D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>, com a seguinte relação de afinidade genômica: *C. dactylon* > *C. incompletus* > *C. nlemfuensis*.

O padrão de hibridização observado em cromossomos de *C. dactylon* e *C. incompletus* também sugere a ocorrência de homoploidia para suas respectivas origens, mas que precisa ser confirmada com uma análise mais detalhada do genoma dessas e de outras espécies diploides do gênero. A hipótese de homoploidia em *C. dactylon* e *C. incompletus* foi baseada a partir da observação de nove cromossomos completamente hibridizados em *C. incompletus* pela sonda genômica de *C. nlemfuensis* e nove cromossomos inteiramente marcados em *C. dactylon* pelo gDNA de *C. incompletus*. A equivalência deste padrão de marcação em relação ao número básico do gênero ( $x=9$ ) (FORBES; BURTON, 1963; CHIAVEGATTO et al., submetido) é uma evidência genômica para a especiação híbrida homoploide (SCHUMER; ROSENTHAL;

ANDOLFATTO, 2014). Outros estudos com GISH evidenciaram padrões semelhantes em *Begonia* × *chungii* C.I Peng & S.M.Ku (KONO; CHUNG; PENG, 2012) e *Elytrigia* × *mucronata* syn. *Thinoelymus mucronatus* (Opiz) Banfi (PAŠTOVÁ et al., 2019).

Além disso, *C. incompletus* demonstrou uma delimitação sutil de territórios genômicos em núcleos interfásicos para as sequências específicas de *C. dactylon* e *C. nlemfuensis*, característica marcante em híbridos (LEITCH et al., 1990, 1991; MARKOVA et al., 2006; XIONG et al., 2006). Em espécies que apresentam baixa quantidade de DNA, como no gênero *Cynodon* (CHIAVEGATTO et al., 2016), os núcleos são dispostos em territórios cromossômicos difusos (JONES; HEGARTY, 2009), o que foi evidenciado em dGISH.

A hibridação homoploide é também designada como especiação recombinatória, uma vez que segmentos cromossômicos das espécies parentais se recombinam na progênie híbrida (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004; BAACK et al., 2005; BUERKLE; RIESEBERG, 2008; PEREIRA; RÁB; COLLARES-PEREIRA, 2013; VITALE et al., 2019). *Cynodon dactylon* e *C. incompletus* apresentaram marcas distintas em dGISH em diferentes regiões cromossômicas, o que pode ser um indício da ocorrência de permuta entre os genomas. Entretanto, como discutido anteriormente, algumas sequências repetitivas em *Cynodon* podem ter sido conservadas durante o curso evolutivo e não necessariamente são produto de recombinação.

Outro critério para a ocorrência de especiação híbrida homoploide é o isolamento reprodutivo das linhagens em relação aos parentais (SCHUMER; ROSENTHAL; ANDOLFATTO, 2014). Zhang et al. (2019) sugerem que a divergência genética observada em *C. dactylon*, aliada aos diferentes números cromossômicos que a espécie possui, podem promover o isolamento reprodutivo, enquanto *C. incompletus* apresenta isolamento genético devido à maior dificuldade em formação de híbridos interespecíficos artificiais (DE WET; HARLAN, 1970).

A formação de bandas em self-GISH foi possível devido ao atendimento de dois critérios: pela distribuição não uniforme de heterocromatina e utilização de baixas concentrações de DNA em sondas (< 100ng/lâmina), uma vez que maiores concentrações aumentam a possibilidade de rotular cromossomos inteiros (SHE et al., 2007). Deste modo, as espécies avaliadas demonstraram padrões de marcação distintos que permitiram realizar a montagem de cariótipos. Diversas espécies animais e vegetais apresentaram polimorfismo cromossômico evidenciado por esta técnica (SHE et al.,

2007; PEREIRA; RÁB; COLLARES-PEREIRA, 2013; PITA et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

## 5.2 Análise citogenômica em espécies poliploides de *Cynodon*

O padrão de marcas GISH em *C. dactylon* 4x com as sondas genômicas de *C. dactylon* 2x (genoma DD) e de *C. nlemfuensis* 2x (genoma D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>) sustentam a ocorrência de alopoliploidia e sugerem que *C. dactylon* 4x pode ter sido originado pela união de gametas não reduzidos dessas duas espécies, sugerindo a composição genômica DDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup> (FIGURA 11).

A análise citogenômica em *C. transvaalensis* 4x também indica alopoliploidia. Ao confrontar os percentuais e padrões de hibridização da GISH recíproca entre as espécies tetraploides é possível inferir que há maior probabilidade do envolvimento de *C. dactylon* 4x para a origem da forma tetraploide de *C. transvaalensis*. A alta representatividade da sonda gDNA de *C. dactylon* 4x (64%) nos cromossomos de *C. transvaalensis*, comparado aos 32% de hibridização da sonda de gDNA de *C. dactylon* 2x, sustentam esta afirmativa. Essa proposta também é ratificada pelo menor percentual de hibridização da sonda genômica de *C. transvaalensis* em metáfases de *C. dactylon* 4x (41%), com presença de apenas marcação parcial nos cromossomos.

A porcentagem de hibridização e o número semelhante de cromossomos completamente marcados com as sondas gDNA de *C. nlemfuensis* 2x (D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>) e de *C. incompletus* 2x (D<sup>1</sup>D<sup>1</sup>) não exclui a possibilidade de que ambas são potenciais parentais de *C. transvaalensis*, via produção de gametas não reduzidos. Entretanto, a sonda genômica de *C. incompletus* demonstrou maior percentual de hibridização nos cromossomos de *C. transvaalensis* (45%) em comparação a *C. nlemfuensis* (35%). Considerando este cenário, a nomenclatura genômica de *C. transvaalensis* poderia ser classificada como DD<sup>2</sup>D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>, mas com maior probabilidade para DD<sup>2</sup>D<sup>1</sup>D<sup>1</sup> (FIGURA 11).

A proposta do envolvimento de *C. dactylon* 4x para a origem de *C. transvaalensis* 4x, difere das observações meióticas e filogenéticas de Jewell et al. (2012), os quais propuseram que *C. transvaalensis* 2x seria um parental da forma tetraploide de *C. dactylon*. Não obstante, há que se ressaltar que a investigação destes autores se baseou no citótipo diploide de *C. transvaalensis* e foi realizada anteriormente à descrição da ocorrência de tetraploidia nesta espécie (CHIAVEGATTO et al., 2016).

Além da certificação da homeologia genômica pela GISH observada nesse estudo, a alopoliploidia segmental nas espécies tetraploides de *Cynodon* também foi baseada na proximidade taxonômica entre *C. nlemfuensis*, *C. dactylon* e *C. transvaalensis* (PETERSON et al., 2015; MUCHUT et al., 2017; CHIAVEGATTO et al., submetido) e em relação ao pareamento cromossômico em poliploides com presença de multivalentes e não exclusivamente em bivalentes (FELDER, 1964; SILVA et al., 2018). Especificamente, em *C. dactylon* 4x e *C. transvaalensis* 2x, essa homeologia é confirmada pela presença de trivalentes em híbridos interespecíficos triploides (FORBES; BURTON, 1963). Além disso, o possível evento de especiação híbrida heteroploide para a origem de *Cynodon* × *magennisii* ( $2n=3x=27$ ), que apresenta *C. dactylon* ( $2n=4x=36$ ) e *C. transvaalensis* ( $2n=2x=18$ ) como parentais (HARLAN; DE WET; RICHARDSON, 1969), demonstra similaridade genômica entre as espécies.

Os possíveis eventos de hibridação aqui apresentados se respaldam na congruência biogeográfica das espécies. *Cynodon dactylon* é cosmopolita, *C. nlemfuensis* é distribuído naturalmente na África central e ao leste do continente, enquanto *C. incompletus* e *C. transvaalensis* são nativos da África do Sul (HARLAN; DE WET; RAWAL, 1970; CLAYTON; HARLAN, 1970, WU, 2011). Em resumo, as propostas de hibridação aqui apresentadas, a origem de *Cynodon* × *magennisii* e a possibilidade de especiação homoploide, demonstram que o gênero pode ter sido originado por evolução reticulada, processo em que linhagens se hibridizam repetidas vezes ao longo de gerações, com interações pós-divergência na rede (VRIESENDORP, 2007).

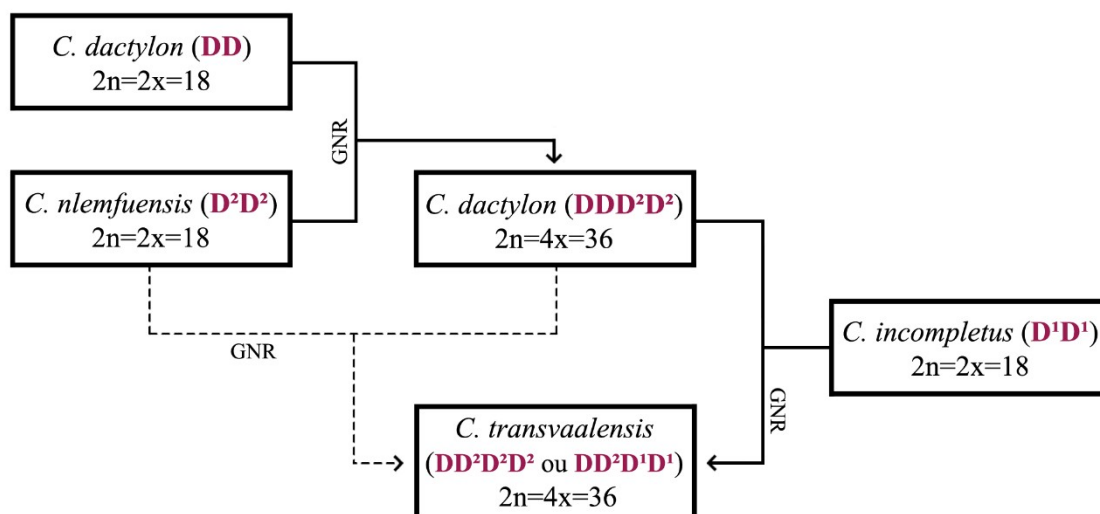
É importante ressaltar que *C. nlemfuensis* e *C. incompletus* também se apresentam na forma tetraploide na natureza, enquanto *C. transvaalensis* é encontrado majoritariamente na forma diploide (WU, 2011), mas com um relato de tetraploidia (CHIAVEGATTO et al, 2016). Em vista disso, a análise de GISH em diferentes citótipos e em outras espécies pode evidenciar formas alternativas para a hibridação, sendo crucial para o entendimento das relações genômicas e dos eventos evolutivos associados à poliploidia e especiação.

De modo semelhante ao observado em *Cynodon*, a técnica de GISH sem o uso de DNA bloqueio conseguiu delimitar genomas distintos em espécies e híbridos de diferentes famílias de Angiospermas (HAN et al., 2004; MATOBA; SOEJIMA; HOSHI, 2007; TANG et al., 2010, 2011; CONTRERAS et al., 2012; MELO; SILVA; SOUZA, 2015). Esta situação somente é possível com a divergência de repeats e

abundância de sequências repetitivas espécie-específicas entre os genitores do aloploiploide (ANAMTHAWAT-JÓNSSON et al., 1990; DESEL et al., 2002; KATO et al., 2005; WOLNY; HASTEROK, 2009; MARKOVA; VYSKOT, 2009), o que sustenta a evidência de aloploidização em *C. dactylon* e *C. transvaalensis*.

Os resultados mostraram que as formas diploides de *C. incompletus* e *C. dactylon* são estritamente relacionadas. Entretanto, ao se comparar *C. incompletus* 2x e *C. dactylon* 4x observou-se uma maior divergência genômica evidenciada por um decréscimo do percentual do genoma de *C. incompletus* em *C. dactylon* 4x. Uma das explicações para este fenômeno pode estar relacionada à uma diminuição da representatividade de sequências específicas, tais como a perda de blocos heterocromáticos de *C. incompletus* decorrentes da extensa reorganização genômica pós-poliploidização e ao processo de diploidização de *C. dactylon* 4x (KHANAL et al., 2017; SILVA et al., 2018; CHAVES et al., 2019).

Figura 11 - Propostas de hibridação envolvendo as espécies *C. dactylon*, *C. nlemfuensis* e *C. transvaalensis*.



Legenda: Setas indicam resultados de cruzamentos. Linhas pontilhadas indicam propostas alternativas para hibridação, sendo GNR - gametas não reduzidos. Fonte: Do autor (2020).

### 5.3 Análise citogenômica em “citótipos” de *C. dactylon*

Com base nos resultados obtidos pela GISH, a origem dos citótipos em *C. dactylon* sugere o envolvimento de gametas não reduzidos, como proposto por outros autores (MALIK; TRIPATHI, 1968; WU et al., 2004; 2009; GULSEN et al., 2009).



Apesar disso, são poucas evidências disponíveis, exceto alguns relatos em híbridos artificiais (FELDER, 1967; HARLAN; DE WET, 1969). A confirmação de grãos de pólen de *C. dactylon* 2x com dimensões semelhantes aos encontrados em tetraploides da espécie (SILVA et al., 2018) é uma forte evidência de que esse processo ocorre.

O padrão de marcas GISH da sonda genômica de *C. dactylon* 2x nos citótipos triploide e pentaploide também sugere a ocorrência de aloploidização. A origem de triploides de *C. dactylon* pode envolver o cruzamento entre plantas diploides e tetraploides da espécie, em razão da presença de 14 cromossomos completamente hibridizados. A ocorrência de oito cromossomos com ausência de hibridização poderia estar relacionada ao genoma D<sup>2</sup> presente em *C. dactylon* 4x. Logo, a nomenclatura genômica para *C. dactylon* 3x seria DDD<sup>2</sup>. Contudo, não se descarta a hipótese de que uma segunda espécie diploide participe do cruzamento com gametas não reduzidos de *C. dactylon* 2x para a formação de triploides (FIGURA 12). A observação de 9 bivalentes e 9 univalentes em *C. dactylon* 3x (GUPTA; SRIVASTAVA, 1970) se aproxima dos dados obtidos pela GISH.

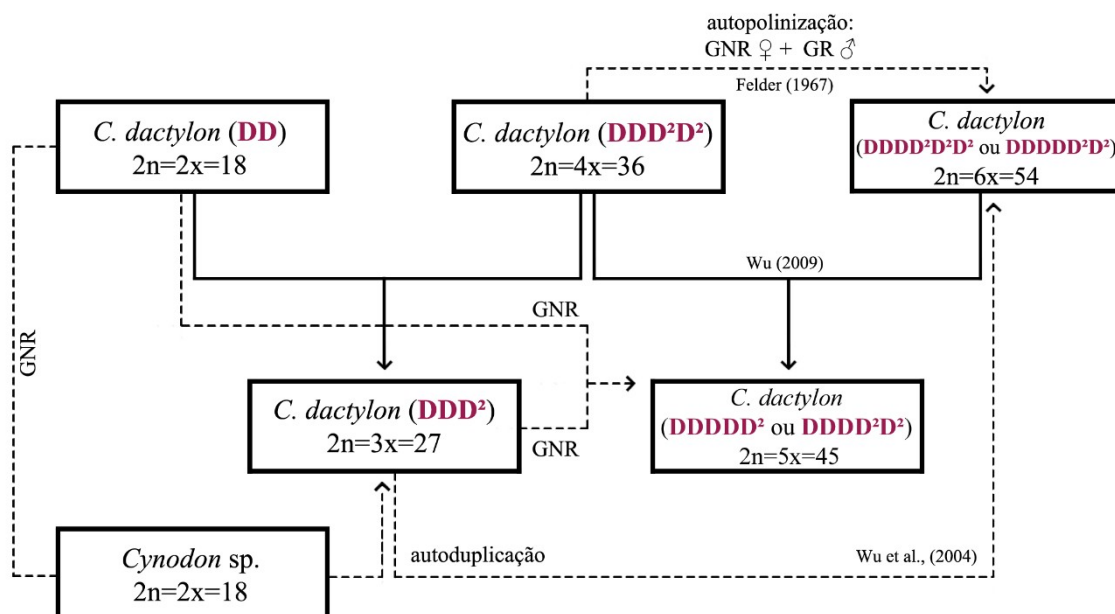
Embora não tenha sido investigada neste estudo, a origem de hexaploides é aqui discutida. Felder (1967) propôs que plantas “autohexaploides” resultavam da autopolinização de *C. dactylon* 4x com a união de um gameta feminino não reduzido e um masculino reduzido, conseqüentemente o genoma de *C. dactylon* 6x seria DDDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>. Wu et al. (2004) propuseram a duplicação espontânea de cromossomos em um zigoto triploide como fonte de geração do citótipo hexaploide, o qual teria o genoma DDDDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup> (FIGURA 12). É importante ressaltar que os mecanismos de autoduplicação em plantas reconhecidamente aloploidoides (como *C. dactylon* 3x e 4x) manterão a presença de genomas distintos na progênie (TATE; SOLTIS; SOLTIS, 2005). Diante o exposto, o termo melhor empregado para *C. dactylon* 6x seria autoalohexaploide.

Em relação à origem de pentaploides, Wu (2009) sugere o cruzamento das formas 4x e 6x de *C. dactylon*, entretanto, a ocorrência de hexaploides na natureza é rara (WU et al., 2004). Nesta hipótese, o citótipo 6x deveria contribuir majoritariamente com o genoma D em seus gametas, uma vez que a nomenclatura genômica mais adequada para *C. dactylon* 5x seria DDDDD<sup>2</sup> com menor probabilidade para DDDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup> e outras formas com maior representatividade de “D<sup>2</sup>”, posto que foram observados apenas 8 cromossomos não marcados quando utilizada a sonda genômica de *C.*

*dactylon* 2x (DD). Os cromossomos com ausência de hibridização pertenceriam ao genoma D<sup>2</sup>, como proposto para *C. dactylon* 3x.

Outra possibilidade para a formação de pentaploides é o cruzamento entre as formas diploide (DD) e triploide (DDD<sup>2</sup>) de *C. dactylon* com participação de gametas não reduzidos, originando um genoma designado como DDDDD<sup>2</sup> (FIGURA 12). Entretanto, essa alternativa é menos provável, pois plantas com ploidias ímpares são mais propensas a formar gametas aneuploides (RAMSEY; SCHEMSKE, 2002). Há que se considerar que a composição genômica de triploides e pentaploides ainda é controversa, mas a ocorrência de aloploidia é sustentada.

Figura 12 - Propostas para a origem dos “citótipos” de *C. dactylon*.



Legenda: Setas indicam resultados de cruzamentos. Linhas pontilhadas indicam propostas alternativas para hibridação, sendo GNR - gametas não reduzidos e GR - gametas reduzidos.  
Fonte: Do autor (2020).

A composição genômica em citótipos de *C. dactylon* pode apresentar variação, uma vez que a combinação de diferentes tipos de gametas torna possível que aloploides, em geral, tenham mais de uma origem (JUDD et al., 2009; LIU; GU, 2011). Por exemplo, como mencionado anteriormente, *C. dactylon* 6x pode ter sido originado pela autopolinização de plantas tetraploides com a união de gametas femininos não reduzidos e masculinos reduzidos (FELDER, 1967) ou pela autoduplicação de zigotos triploides (WU et al., 2004). As duas possibilidades não se excluem e podem ocorrer simultaneamente na natureza. Situação semelhante foi

encontrada em plantas nonaploides de *Elytrigia* × *mucronata* syn. *Thinoelymus mucronatus* (Opiz) Banfi, as quais apresentaram genomas StStStStStDHHV e StStStStDDHVV (PAŠTOVÁ et al., 2019). Além disso, *C. dactylon* também apresenta variação cariotípica, inclusive entre plantas com mesmo nível de ploidia (CHAVES et al., 2019; CHIAVEGATTO et al., 2019), o que pode ser associado às diferentes composições cromossômicas/genômicas dos gametas envolvidos no cruzamento.

Entre os citótipos 2x, 4x e 5x, os percentuais de hibridização mostraram que o genoma de *C. dactylon* 2x foi mais representativo no triploide (59,5%). A ocorrência de alogamia em *Cynodon* (JANK; VALLE; RESENDE, 2011) pode ser o fator responsável pela diminuição da contribuição do genoma 2x no citótipo tetraploide e maior representatividade no triploide pois, de modo geral, ploidias ímpares dificilmente são férteis e sua população tende a ser mais homogênea (KOLÁŘ et al., 2017). Entretanto, é importante ressaltar que ploidias ímpares também atuam na evolução reticulada (KOLÁŘ et al., 2017) e, de acordo com os resultados obtidos pela GISH, a estrutura de relacionamento genômico em *Cynodon* pode apresentar altos níveis de reticulação.

Diante o exposto, a delimitação taxonômica dos citótipos de *C. dactylon* requer análises apuradas em âmbito genômico, filogenético, morfológico, ecológico e de genética populacional. Após os eventos de hibridação em simpatria apresentados neste estudo, é fundamental que ocorra isolamento reprodutivo para promover especiação (WANG et al., 2017). De modo geral, a diferenciação da composição de DNA repetitivo afetou diretamente a estrutura cromossômica das espécies avaliadas, principalmente em *C. dactylon* 2x e 4x. Diferentes combinações de cariótipos parentais, juntamente com alterações cromossômicas pós-hibridação podem contribuir para o isolamento reprodutivo e resultar no estabelecimento de linhagens únicas, fornecendo matéria prima para a especiação (KOO et al., 2010).

Portanto, os citótipos de *C. dactylon* poderiam ser classificados como espécies distintas de *C. dactylon* 2x em função da hibridação, considerada como evento especiativo por Wiley e Lieberman (2011), e consequente distinção da composição genômica. Além disso, baseando-se nos conceitos filogenético e morfológico/fenético de espécie, *C. dactylon* sofreria fragmentações, pois apresentou polifilia (PETERSON et al., 2015) e diferenças morfológicas nas inflorescências (MUCHUT et al., 2017; 2019) que poderiam ser apontadas como caracteres diagnósticos.

Os citótipos de *C. dactylon* poderiam ser classificados como espécies crípticas devido à similaridade morfológica (WU et al., 2006; NASIRI et al., 2012; CLAYTON et

al., 2016) e presença de dados citogenômicos que corroboram a discriminação. Entretanto, Ernst Mayr (2000) considera que uma população não perde seu status de espécie quando alguns indivíduos pertencentes a esta, hibridizam com indivíduos de outra espécie. Portanto, percebe-se que a delimitação de alopoliploides é complexa e que todo conceito de espécie a ser utilizado é passível de ambiguidades taxonômicas (DE QUEIROZ, 2007; JUDD et al., 2009; JONES; SAGITOV; OXELMAN, 2013; CONIX, 2019).

## 6 CONCLUSÕES

Os genomas das espécies diploides foram classificados como DD, D<sup>1</sup>D<sup>1</sup> e D<sup>2</sup>D<sup>2</sup> para *C. dactylon*, *C. incompletus* e *C. nlemfuensis*, com o seguinte grau de relacionamento DD > D<sup>1</sup>D<sup>1</sup> > D<sup>2</sup>D<sup>2</sup>.

*Cynodon dactylon* e *C. transvaalensis* são alotetraploides segmentais. *Cynodon dactylon* 4x (DDD<sup>2</sup>D<sup>2</sup>) pode ter se originado pelo cruzamento de *C. dactylon* 2x com *C. nlemfuensis* 2x por meio de gametas não reduzidos.

A circunscrição taxonômica dos citótipos de *C. dactylon* é questionável e demonstra que a espécie necessita de uma revisão.

A origem de *C. transvaalensis* 4x (DD<sup>2</sup>D<sup>1</sup>D<sup>1</sup>) pode estar associada ao cruzamento de *C. dactylon* 4x e *C. incompletus* 2x com participação de gametas não reduzidos. Deste modo, a estrutura de relacionamento genômico do gênero aparenta ser altamente reticulada.

## REFERÊNCIAS

- AKBARI, M.; SALEHI, H.; NIAZI, A. Evaluation of diversity based on morphological variabilities and ISSR molecular markers in Iranian *Cynodon dactylon* (L.) Pers. accessions to select and introduce cold-tolerant genotypes. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 259-270, 2018.
- ALIX, K.; GÉRARD, P. R.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. **Annals of Botany**, v. 120 n. 2, p. 183-194, 2017.
- AL-SNAFI, A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Cynodon dactylon* - A review. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 6, n. 7, p. 17-31, 2016
- ALTINORDU, F.; PERUZZI, L.; YU, Y.; HE, X. A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType. **Taxon**, v. 65 n. 3, p. 586-592, 2016.
- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A. R.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S; Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79 n.6, p. 721-728, 1990.
- ARNOLD, M. L. **Evolution through genetic exchange**. Chennai, India: Oxford University Press, 2006.
- AVDULOV, N. P. Karyo-systematische untersuchungen der familie Gramineen. **Bulletin of Applied Botany, of Genetics and Plant Breeding**, v. 44, p. 1-428, 1931.
- BAACK, E. J.; WHITNEY, K. D.; RIESEBERG, L. H. Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. **New Phytologist**, v. 167, n. 2, p. 623-630, 2005.
- BAO, W.; ZHANG, W.; YANG, Q.; ZHANG, Y.; HAN, B.; GU, M.; CHENG, Z. Diversity of centromeric repeats in two closely related wild rice species, *Oryza officinalis* and *Oryza rhizomatis*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, n.5, p. 421-430, 2006.
- BEARD, J. B.; WATSON, J. R. Recent turfgrass plant explorations in Africa. **USGA Green Section Record**, v. 10, n 8, p. 6-8, 1982.

- BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E. Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two *Triticeae* species. **Chromosome Research**, v. 9, n. 2, p. 129-136, 2001a.
- BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E. Evolutionary dynamics and chromosomal distribution of repetitive sequences on chromosomes of *Aegilops speltoides* revealed by genomic *in situ* hybridization. **Heredity**, v. 86, n. 6, p. 738, 2001b.
- BENITES, F. R. G.; SOUZA SOBRINHO, F.; VILELA, D. **A contribuição do gênero *Cynodon* para a pecuária de leite**. Pecuária de Leite no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, p. 147-166, 2016.
- BETHEL, C. M.; SCIARA, E. B.; ESTILL, J. C.; BOWERS, J. E.; HANNA, W.; PATERSON, A. H. A framework linkage map of bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *transvaalensis*) based on single-dose restriction fragments. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n.4, p. 727-737, 2006.
- BRAMMER, S. P.; POERSCH, L. B.; de OLIVEIRA, A. R.; VASCONCELOS, S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. **Hibridização genômica *in situ* em *Triticeae*: um enfoque metodológico**. Embrapa Trigo-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), Passo Fundo - RS, 2009.
- BRAZ, G. T.; HE, L.; ZHAO, H.; ZHANG, T.; SEMRAU, K.; ROUILLARD, J. M.; JIANG, J. Comparative oligo-FISH mapping: an efficient and powerful methodology to reveal karyotypic and chromosomal evolution. **Genetics**, v. 208, n. 2, p. 513-523, 2018.
- BRILMAN, L. A.; KNEEBONE, W. R.; ENDRIZZI, J. E. Pachytene chromosome morphology of diploid *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Cytologia** v. 47, n. 1, p. 171-181, 1982.
- BROWNFIELD, L.; KÖHLER, C. Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 5, p. 1659-1668, 2010.
- BUERKLE, C. A.; RIESEBERG, L. H. The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 62, n. 2, p. 266-275, 2008.
- CANDAN, F. Some observations on plant karyology and investigation methods. In: SILVA-OPPS, M. **Current Progress in Biological Research**. First Edition. Rijeka, Croatia: InTech DTP team, 2013. Cap. 10.
- CARO, J. A. Cuatro especies y una variedad nuevas de *Cynodon* (Gramineae). **Dominguezia**, v. 6, n. 1, p. 5-20, 2018.
- CARO, J.A.; SANCHEZ, E. Las especies de *Cynodon* (Gramineae) de la Republica Argentina. **Kurtziana**, v. 5, p. 191-252, 1969.
- CARVALHO de, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142-145, 1993.

CHAVES, A. L. A.; CHIAVEGATTO, R. B., BENITES, F. R. G.; TECHIO, V. H. Comparative karyotype analysis among cytotypes of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Poaceae). **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 4873–4881, 2019.

CHAVES, A. L. A.; CHIAVEGATTO, R. B.; GAVILANES, M. L.; BENITES, F. R.; TECHIO, V. H. Effect of polyploidy on the leaf epidermis structure of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Poaceae). **Biologia**, v. 73, n.10, p. 1007-1013, 2018.

CHEN, T.; HU, T.; HUANG, C.; WU, S.; THSENG, F. Intraspecific variation of Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) in Taiwan. **Journal of Agriculture and Forestry**, v. 49, n.4, p. 19-31, 2000.

CHIAVEGATTO, R. B.; CHAVES, A. L. A.; ROCHA, L. C.; BENITES, F. R. G.; PERUZZI, L.; TECHIO, V. H. Heterochromatin Bands and rDNA Sites Evolution in Polyploidization Events in *Cynodon* Rich. (Poaceae). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 37, n.5, p. 477-487, 2019.

CHIAVEGATTO, R. B.; PAULA, C. M.; SOUZA, S. F.; BENITES, F. R.; TECHIO, V. H. Karyotype asymmetry in *Cynodon* Rich. (Poaceae) accessions. **Genetics and Molecular Research**, v4, p. 2-15, 2016.

CHOI, H. W.; KIM, J. S.; LEE, S. H.; BANG, J. W. Physical mapping by FISH and GISH of rDNA loci and discrimination of genomes A and B in *Scilla scilloides* complex distributed in Korea. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n6, p. 408-412, 2008.

CIFUENTES, M.; GRANDONT, L., MOORE, G.; CHÈVRE, A. M.; JENCZEWSKI, E. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. **New Phytologist**, v. 186, n. 1, p. 29-36, 2010.

CONIX, S. Measuring evolutionary independence: A pragmatic approach to species classification. **Biology & Philosophy**, v. 34, n6, p. 53, 2019.

CORRÊA, C. T.; BONETTI, N. G.; BARRIOS, S. C.; DO VALLE, C. B.; TORRES, G. A.; TECHIO, V. H. GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa* P. Beauv. **Molecular Biology Reports**, p. 1-10, 2020.

CORRÊA, L. de A.; POTT, E. B. Manejo e utilização de plantas forrageiras dos gêneros *Panicum*, *Brachiaria* e *Cynodon*. In: SEMINARIO DE PASTURAS Y SUPLEMENTACION ESTRATEGICAS EN GANADO BOVINO, 3, 2001, Assucion. Assucion: Facultad de Ciencias Veterinarias. **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso**. Assunção, Paraguai. Editora Alice, 2001. p. 1-15.

CLAYTON, W.D. et al. World checklist of Poaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, 2016. Published on the internet; <http://wmsp.science.kew.org/>.

CLAYTON, W. D.; HARLAN, J. R. The genus *Cynodon* RICH. in tropical Africa. **Kew Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 185-189, 1970.

COMAI, L.; MAHESHWARI, S.; MARIMUTHU, M. P. A. Plant centromeres. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 36, p. 158-167, 2017.

- CONTRERAS, R. N.; RUTER, J. M.; CONNER, J.; ZENG, Y.; OZIAS-AKINS, P. Confirmation of hybridity using GISH and determination of 18S rDNA copy number using FISH in interspecific F1 hybrids of *Tecoma* (Bignoniaceae). **Genome**, v. 55, n.6, p. 437-445, 2012.
- DANDE, P.; KHAN, A. N. I. S. Evaluation of wound healing potential of *Cynodon dactylon*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 161-164, 2012.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.
- DENG, H.; CAI, Z., XIANG, S.; GUO, Q.; HUANG, W.; LIANG, G. Karyotype analysis of diploid and spontaneously occurring tetraploid blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) using multicolor FISH with repetitive DNA sequences as probes. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 331, 2019.
- DESEL, C.; JANSEN, R.; DEDONG, G.; SCHMIDT, T. Painting of Parental Chromatin in *Beta* Hybrids by Multi-colour Fluorescent *in situ* Hybridization. **Annals of Botany**, v. 89 n. 2, p. 171-181, 2002.
- DE SILVA, P. H. A. U.; SNAYDON, R. W. Chromosome number in *Cynodon dactylon* in relation to ecological conditions. **Annals of Botany**, v. 76, n. 5, p. 535-537, 1995.
- DE WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. Biosystematics of *Cynodon* Rich. (Gramineae). **Taxon**, v. 19, n. 4, p. 565-569, 1970.
- DE WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. South African species of *Cynodon* (Gramineae). **Journal of South African Botany**, v. 37, p. 53-56, 1971.
- DHALIWAL, A. R. S; GUPTA, R. C. Cytological study on three cytotypes of Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) from Haryana and Shiwalik hills. **Internation Journal Basic Applied Biology**, v.5 p. 7-12, 2011.
- DHANAPAL, V.; MAHESWARI, S.; KUMAR, M. S.; VINUSHA, A.; THEJASWEE, V.; VARDHAN, U. V. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of stem of *Cynodon dactylon*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 1995-1998, 2017.
- D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005.
- DONG, M.; DE KROON, H. Plasticity in morphology and biomass allocation in *Cynodon dactylon*, a grass species forming stolons and rhizomes. **Oikos**, v. 70, n. 1, p. 99-106, 1994.
- DORONE, Y. Diploidization of meiosis in autotetraploids. **BioScience Master Review**, v. 6, p. 1-6, 2013.



DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n.1, p. 11-15, 1987.

DOYLE, J. J.; SHERMAN-BROYLES, S. Double trouble: taxonomy and definitions of polyploidy. **New Phytologist**, v. 213, n. 2, p. 487-493, 2017.

ERDTMAN, G. An Introduction to Pollen Analysis. **Chronica Botanica Company, Waltham**, 1943.

FARSANI, T. M.; ETEMADI, N.; SAYED-TABATABAEI, B. E.; TALEBI, M. Assessment of genetic diversity of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) using ISSR markers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 383-392, 2012.

FELDER, M.R. **Chromosome associations in triploid *Cynodon* hybrids**. p. 54. Master. Oklahoma State University, Stillwater, Okla, 1967.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

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

GONG, Z.; XUE, C.; ZHANG, M.; WANG, M. Distribution of rDNA loci and genome differentiation in tetraploid *Cynodon*. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 73, n. 4, p. 459-461, 2013.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 146, n. 3, p. 703-710, 2012.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

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

GULSEN, O.; SEVER-MUTLU, S.; MUTLU, N.; TUNA, M.; KARAGUZEL, O.; SHEARMAN, R. C.; HENG-MOSS, T. M. Polyploidy creates higher diversity among *Cynodon* accessions as assessed by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 7, p. 1309-1319, 2009.

GUO, Y.; WU, Y., ANDERSON, J. A.; MOSS, J. Q.; ZHU, L. Disomic inheritance and segregation distortion of SSR markers in two populations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. var. *dactylon*. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136332, 2015.

GUO, Y.; WU, Y.; ANDERSON, J. A.; MOSS, J. Q.; ZHU, L.; FU, J. SSR Marker Development, Linkage Mapping, and QTL Analysis for Establishment Rate in Common Bermudagrass. **The Plant Genome**, v. 10, n. 1, 2017.

GUPTA, P. K.; SRIVASTAVA, A. K. Natural triploidy in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Caryologia**, v. 23, n. 1, p. 29-35, 1970.

HAN, Y. H.; LI, D. Y.; LI, Y. C.; XUE, Y. G.; HU, Z. L.; SONG, Y. C. Cytogenetic identification of a new hexaploid *Coix aquatica* Cytotype. **Acta Botanica Sinica-**, v. 46, n. 6, p. 724-729, 2004.

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

HARLAN, J. R. *Cynodon* species and their value for grazing and hay. **Herbage Abstract**, v. 40, p. 233–238, 1970.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J.; HUFFINE, W. W.; DEAKIN, J. R. A guide to the species of *Cynodon* (Gramineae). **Bulletin of the Oklahoma Agricultural Experiment Station**. Oklahoma Agric Exp Stat, Stillwater, 1970a.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J.; RAWAL, K. M.; FELDER, M. R.; RICHARDSON, W. L. Cytogenetic Studies in *Cynodon* LC Rich. (Gramineae). **Crop Science**, v. 10, n. 3, p. 288-291, 1970b.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J.; RAWAL, K. M. Geographic distribution of the species of *Cynodon* Rich. (Gramineae). **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 36, n. 2, p. 220-226, 1970.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J.; RICHARDSON, W. L. Hybridization studies with species of *Cynodon* from East Africa and Malagasy. **American Journal of Botany**, v. 56, n. 8, p. 944-950, 1969.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J.; RICHARDSON, W. R.; HUFFINE, W. W.; DEAKIN, J.; GUPTA, S. S.; CARPENA, A. Bio-systematics of the genus *Cynodon* (Gramineae). **Progress Report**, p. 34-34, 1966.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Sources of variation in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Crop Science**, v. 9, n. 6, p. 774-778, 1969.

HARRIS-SHULTZ, K. R.; SCHWARTZ, B. M.; HANNA, W. W.; BRADY, J. A. Development, linkage mapping, and use of microsatellites in bermudagrass. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 6, p. 511-520, 2010.

HASTEROK, R.; DRAPER, J.; JENKINS, G. Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. **Chromosome Research**, v. 12, n. 4, p. 397-403, 2004.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K.; MALIK, H. S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1098-1102, 2001.

- HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, v. 12, n. 5, p. 617-635, 2000.
- HILU, K. W. Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). **Australian Journal of Botany**, v. 52, n. 1, p. 13-22, 2004.
- HOFF, B. J. **The cytology and fertility of bermudagrass, (*Cynodon dactylon* L.) Pers., in Arizona**. p. 77. PhD thesis. University of Arizona, Arizona, 1968.
- HUANG, C.; LIU, G.; BAI, C.; WANG, W.; TANG, J.; YU, D. A study on the morphological diversity of 475 accessions of *Cynodon dactylon*. **Acta Prataculturae Sinica**, v. 21, n. 4, p. 33-42, 2012.
- HUANG, C. Q.; LIU, G. D.; BAI, C. J.; WANG, W. Q.; ZHOU, S. Y.; YU, D. Q. Estimation of genetic variation in *Cynodon dactylon* accessions using the ISSR technique. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 5, p. 993-999, 2010.
- HUNTER, W. S. A karyosystematic investigation in the Gramineae. **Canadian Journal of Research**, v. 11, n. 2, p. 213-241, 1934.
- HURCOMBE, R. A cytological and morphological study of cultivated *Cynodon* species. **Journal South Africa Botanic**, v. 13, p. 107-116, 1947.
- JANK, L.; VALLE, C. D.; RESENDE, R. M. S. Breeding tropical forages. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 27-34, 2011.
- JENCZEWSKI, E.; EBER, F.; GRIMAUD, A.; HUET, S.; LUCAS, M. O.; MONOD, H.; CHEVRE, A. M. PrBn, a major gene controlling homeologous pairing in oilseed rape (*Brassica napus*) haploids. **Genetics**, v. 164, n. 2, p. 645-653, 2003.
- JENKINS, G.; REES, H. Strategies of bivalent formation in allopolyploid plants. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 243, n. 1308, p. 209-214, 1991.
- JEWELL, M.; FRÈRE, C. H.; HARRIS-SHULTZ, K.; ANDERSON, W. F.; GODWIN, I. D.; LAMBRIDES, C. J. Phylogenetic analysis reveals multiple introductions of *Cynodon* species in Australia. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 2, p. 390-396, 2012.
- JIANG, J.; BIRCHLER, J. A.; PARROTT, W. A.; DAWE, R. K. A molecular view of plant centromeres. **Trends in Plant Science**, v. 8, n. 12, p. 570-575, 2003.
- JOHNSTON, R. A. **Cytogenetics of some hexaploid x tetraploid hybrids in *Cynodon***. p. 46. Doctoral dissertation. Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, 1975.

- JONES, G.; SAGITOV, S.; OXELMAN, B. Statistical inference of allopolyploid species networks in the presence of incomplete lineage sorting. **Systematic Biology**, v. 62, n. 3, p. 467-478, 2013.
- JONES, R. N.; HEGARTY, M. Order out of chaos in the hybrid plant nucleus. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, n. 4, p. 376-389, 2009.
- JOUVE, N.; AL, C.; DE BUSTOS, A.; CUADRADO, Á. The Phylogenetic relationships of species and cytotypes in the genus *Hordeum* based on molecular karyotyping. **Current Research on Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2018.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Terceira Edição. Porto Alegre – RS: Editora Artmed, 2009.
- KANG, S. Y.; LEE, G. J.; LIM, K. B.; LEE, H. J.; PARK, I. S.; CHUNG, S. J.; RHEE, H. K. Genetic diversity among Korean bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes characterized by morphological, cytological and molecular approaches. **Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)**, v. 25, n. 2, p. 163-171, 2008.
- KATO, A.; VEGA, J. M.; HAN, F.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 148-154, 2005.
- KHANAL, S.; KIM, C.; AUCKLAND, S. A.; RAINVILLE, L. K.; ADHIKARI, J.; SCHWARTZ, B. M.; PATERSON, A. H. SSR-enriched genetic linkage maps of bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *transvaalensis*), and their comparison with allied plant genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 4, p. 819-839, 2017.
- KOLÁŘ, F.; ČERTNER, M.; SUDA, J.; SCHÖNSWETTER, P.; HUSBAND, B. C. Mixed-ploidy species: progress and opportunities in polyploid research. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 12, p. 1041-1055, 2017.
- KONO, Y.; CHUNG, M. C.; PENG, C. I. Identification of genome constitutions in *Begonia* × *chungii* and its putative parents, *B. longifolia* and *B. palmata*, by genomic *in situ* hybridization (GISH). **Plant Science**, v. 185, p. 156-160, 2012.
- KOO, D. H.; NAM, Y. W.; CHOI, D.; BANG, J. W.; DE JONG, H.; HUR, Y. Molecular cytogenetic mapping of *Cucumis sativus* and *C. melo* using highly repetitive DNA sequences. **Chromosome Research**, v. 18, n. 3, p. 325-336, 2010.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; SULESKI, M.; HEDGES, S. B. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 7, p. 1812-1819, 2017.
- LE COMBER, S. C.; AINOUCHE, M. L.; KOVARIK, A.; LEITCH, A. R. Making a functional diploid: from polysomic to disomic inheritance. **New Phytologist**, v. 186, n. 1, p. 113-122, 2010.

LEITCH, A. R.; MOSGOLLER, W.; SCHWARZACHER, T.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. **Journal of Cell Science**, v. 95, n. 3, p. 335-341, 1990.

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; MOSGÖLLER, W.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. **Chromosoma**, v. 101, n. 4, p. 206-213, 1991.

LEITCH, I. J.; HANSON, L.; LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; CHASE, M. W.; CLARKSON, J. J.; LEITCH, A. R. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). **Annals of Botany**, v. 101, n. 6, p. 805–14, 2008.

LIM, K. B.; YANG, T. J.; HWANG, Y. J.; KIM, J. S.; PARK, J. Y.; KWON, S. J.; KIM, H. I. Characterization of the centromere and peri-centromere retrotransposons in *Brassica rapa* and their distribution in related *Brassica* species. **The Plant Journal**, v. 49, n. 2, p. 173-183, 2007.

LIU, L. Q.; GU, Z. J. Genomic *in situ* hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae). **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 554-559, 2011.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: Design, Analysis, and Application**. Oxford, UK, Editor: Blackwell Publishing Ltd Blackwell Pub, 2004.

LYSAK, M. A.; KOCH, M. A. Phylogeny, genome, and karyotype evolution of crucifers (Brassicaceae). In: SCHMIDT, R.; BANCROFT, I. **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**. None edition. New York, NY: Springer, 2011. v. 9. Chapter 1.

MAJKA, J.; MAJKA, M.; KWIATEK, M.; WIŚNIEWSKA, H. Similarities and differences in the nuclear genome organization within Pooideae species revealed by comparative genomic *in situ* hybridization (GISH). **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 2, p. 151-161, 2017.

MALIK, C.P.; TRIPATHI, R. C. Cytological evolution within the *Cynodon dactylon* complex. **Biologisches Zentralblatt**. v. 87, p. 625-627, 1968.

MALLET, J.; BESANSKY, N.; HAHN, M. W. How reticulated are species? **BioEssays**, v. 38, n. 2, p. 140-149, 2016.

MARION, M. **Subtelomeres**. E. J. Louis, & M. M. Becker. Springer, 2014.  
MARKOVA, M.; LENGEROVA, M.; ZLUVOVA, J.; JANOUSEK, B.; VYSKOT, B. Karyological analysis of an interspecific hybrid between the dioecious *Silene latifolia* and the hermaphroditic *Silene viscosa*. **Genome**, v. 49, n. 4, p. 373-379, 2006.

MARKOVA, M.; VYSKOT, B. New horizons of genomic *in situ* hybridization. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 126, n. 4, p. 368-375, 2009.

MASON, A. S.; PIRES, J. C. Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism? **Trends in Genetics**, v. 31, n. 1, p. 5-10, 2015.

- MATOBA, H.; SOEJIMA, A.; HOSHI, Y. Identification of parental genomes and genomic organization in *Aster microcephalus* var. *ovatus*. **Journal of Plant Research**, 120(5), 585-593, 2007.
- MAYROSE, I.; BARKER, M. S.; OTTO, S. P. Probabilistic models of chromosome number evolution and the inference of polyploidy. **Systematic Biology**, v. 59, n. 2, p. 132-144, 2009.
- MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of the genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genetics and Molecular Research**, 14(1), 2176-2188, 2015.
- MOORE, G. Meiosis in allopolyploids—the importance of ‘Teflon’ chromosomes. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 9, p. 456-463, 2002.
- MUCHUT, S. E.; PILATTI, V.; UBERTI-MANASSERO, N.; VEGETTI, A. C.; REINHEIMER, R. Inflorescence diversity in subtribe Eleusininae (Poaceae: Chloridoideae: Cynodonteae). **Flora**, v. 228, p. 50-59, 2017.
- MUCHUT, S. E.; REUTEMANN, A. G.; PILATTI, V.; UBERTI MANASSERO, N. G.; VEGETTI, A. C.; REINHEIMER, R. Uncovering the inflorescence evolution of Eleusininae (Cynodonteae: Chloridoideae: Poaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 1, p. 208-223, 2019.
- MURAT, F.; ARMERO, A.; PONT, C.; KLOPP, C.; SALSE, J. Reconstructing the genome of the most recent common ancestor of flowering plants. **Nature Genetics**, v. 49, n. 4, p. 490, 2017.
- MUTTI, J. S.; BHULLAR, R. K.; GILL, K. S. Evolution of Gene Expression Balance Among Homeologs of Natural Polyploids. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 4, p. 1225-1237, 2017.
- NAGORI, B. P.; SOLANKI, R. *Cynodon dactylon* (L.) Pers.: a valuable medicinal plant. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, p. 508-14, 2011.
- NASCIMENTO, M. P. S. C. B.; NASCIMENTO, H. T. S.; LEAL, J. A. **Comportamento de Cultivares de *Cynodon* no Piauí**. Teresina: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 3 p., 2002 (Comunicado Técnico, 146).
- NASIRI, A.; SAEIDI, H.; RAHIMINEJAD, M. R. Morphological Variation and Taxonomic Conclusion of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. In Iran. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 11, n. 2, p. 62, 2012.
- NIETO FELINER, G.; ÁLVAREZ, I.; FUERTES-AGUILAR, J.; HEUERTZ, M.; MARQUES, I.; MOHARREK, F.; VILLA-MACHÍO, I. Is homoploid hybrid speciation that rare? An empiricist's view. **Heredity**, v. 118, p. 513-516, 2017.

- NOOR, M. A.; GRAMS, K. L.; BERTUCCI, L. A.; REILAND, J. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 12084-12088, 2001.
- OAKLEY, L. J. Botánica y sistemática de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 19, p. 3-10, 1999.
- OSTEVIK, K. L.; SAMUK, K.; RIESEBERG, L. H. Ancestral reconstruction of sunflower karyotypes reveals dramatic chromosomal evolution. **BioRxiv**, 2019.
- PAŠTOVÁ, L.; BELYAYEV, A.; MAHELKA, V. Molecular cytogenetic characterisation of *Elytrigia* × *mucronata*, a natural hybrid of *E. intermedia* and *E. repens* (Triticeae, Poaceae). **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 230, 2019.
- PAULA, P. M.; SOBRINHO, C. F. S.; TECHIO, V. H. Genomic Constitution and Relationship in *Urochloa* (Poaceae) Species and Hybrids. **Crop Science**, v. 57, n. 5, p. 2605-2616, 2017.
- PENDINEN, G.; SPOONER, D. M.; JIANG, J.; GAVRILENKO, T. Genomic *in situ* hybridization reveals both auto- and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species. **Genome**, v. 55, n. 6, p. 407-415, 2012.
- PEREIRA, C. S. A.; RÁB, P.; COLLARES-PEREIRA, M. J. Chromosomes of Iberian Leuciscinae (Cyprinidae) revisited: evidence of genome restructuring in homoploid hybrids using dual-color FISH and CGH. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2-3, p. 143-152, 2013.
- PERUZZI, L. “x” is not a bias, but a number with real biological significance. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 147, n. 4, p. 1238-1241, 2013.
- PERUZZI, L.; EROĞLU, H. E. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? **Comparative Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 1, 2013.
- PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; ARRIETA, Y. H. A molecular phylogeny and classification of the Eleusininae with a new genus, *Micrachne* (Poaceae: Chloridoideae: Cynodonteae). **Taxon**, v. 64, n. 3, p. 445-467, 2015.
- PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; JOHNSON, G. A classification of the Chloridoideae (Poaceae) based on multi-gene phylogenetic trees. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, n. 2, p. 580-598, 2010.
- PITA, S.; PANZERA, F.; SÁNCHEZ, A.; PANZERA, Y.; PALOMEQUE, T.; LORITE, P. Distribution and evolution of repeated sequences in genomes of *Triatominae* (Hemiptera-Reduviidae) inferred from genomic *in situ* hybridization. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114298, 2014.
- PRESGRAVES, D. C. The molecular evolutionary basis of species formation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 3, p. 175, 2010.

- POWELL, J. B.; FORBES, I.; BURTON, G. W. A *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Bermudagrass) Clone with Five Accessory Chromosomes. **Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 267-268, 1968.
- RAINA, S. N.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. **Methods in Cell Science**, v. 23, n. 1-3, p. 83-104, 2001.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, n. 1, p. 589-639, 2002.
- RIESEBERG, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, p. 351-358, 2001.
- ROCHA, M. J.; CHIAVEGATTO, R. B.; DAMASCENO, A. G.; ROCHA, L. C.; SOBRINHO, F. S.; TECHIO, V. H. Comparative meiosis and cytogenomic analysis in euploid and aneuploid hybrids of *Urochloa* P. Beauv. **Chromosome Research**, v. 27, n.4, p. 333-344, 2019.
- ROCHECOUSTE, E. Studies on the biotypes of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. I Botanical investigations. **Weed Research**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 1962.
- SACHDEVA, S. K.; BHATIA, M. S. Chemotaxonomic studies in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. complex. I. Data on free amino acids, soluble sugars, acid invertase activity and total proteins. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B. Part2, Plant Sciences**, v. 88, n. 3, p. 189-193, 1979.
- SALINA, E. A.; NUMEROVA, O. M.; OZKAN, H.; FELDMAN, M. Alterations in subtelomeric tandem repeats during early stages of allopolyploidy in wheat. **Genome**, v. 47, n. 5, p. 860-867, 2004.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SCHUBERT, I.; FRANSZ, P. F.; FUCHS, J.; DE JONG, J. H. Chromosome painting in plants. **Methods in Cell Science**, v. 23, n. 1-3, p. 57-69, 2001.
- SCHUMER, M.; ROSENTHAL, G. G.; ANDOLFATTO, P. How common is homoploid hybrid speciation? **Evolution**, v. 68, n. 6, p. 1553-1560, 2014.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.
- SEPSI, A.; MOLNÁR, I.; SZALAY, D.; MOLNÁR-LÁNG, M. Characterization of a leaf rust-resistant wheat - *Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1, using sequential multicolor GISH and FISH. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 6, p. 825-834, 2008.



SHARMA, S.; RAINA, S. N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 15-26, 2005.

SHE, C.; LIU, J.; DIAO, Y.; HU, Z.; SONG, Y. The distribution of repetitive DNAs along chromosomes in plants revealed by self-genomic *in situ* hybridization. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 5, p. 437-448, 2007.

SILVA, D. M.; SANTOS, Y. D.; BENITES, F. R. G.; TECHIO, V. H. Microsporogenesis, viability and morphology of pollen grain in accessions of *Cynodon* L. C. Rich. (Poaceae). **South African Journal of Botany**, v. 118, p. 206-207, 2018.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Genomic *in situ* hybridization in plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2953-65, 2013.

SINGHAL, V. K.; KUMARI, V.; KUMAR, P. Cytomorphological diversity in some selected members of Poaceae from Parvati Valley in Kullu district of Himachal Pradesh, India. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 6, p. 1385-1408, 2014.

SINGH, S. K.; KESARI, A. N.; GUPTA, R. K.; JAISWAL, D.; WATAL, G. Assessment of antidiabetic potential of *Cynodon dactylon* extract in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 174-179, 2007.

SJ, M. K.; JANAKIRAMAN, A. K. Preliminary Phytochemical Screening, In Vitro and In Vivo Antioxidant Activities of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **International Journal of ChemTech Research**, v. 11, n. 03, p. 210-218, 2018.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 9, p. 348-352, 1999.

SORAYA, H.; MOLOUDIZARGARI, M.; AGHAJANSHAKERI, S.; JAVAHERYPOUR, S.; MOKARIZADEH, A.; HAMEDEYAZDAN, S.; GARJANI, A. Angiogenic effect of the aqueous extract of *Cynodon dactylon* on human umbilical vein endothelial cells and granulation tissue in rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 10, 2015.

SORENG, R. J.; PETERSON, P. M.; ROMASCHENKO, K.; DAVIDSE, G.; ZULOAGA, F. O.; JUDZIEWICZ, E. J.; MORRONE, O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 117-37. 2015.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. First Edition. London: Edward Arnold, 1971.

SU, H.; LIU, Y.; LIU, C.; SHI, Q.; HUANG, Y.; HAN, F. Centromere satellite repeats have undergone rapid changes in polyploid wheat subgenomes. **The Plant Cell**, v. 31, n. 9, p. 2035-2051, 2019.

SUTTON, T.; WHITFORD, R.; BAUMANN, U.; DONG, C.; ABLE, J. A.; LANGRIDGE, P. The Ph2 pairing homoeologous locus of wheat (*Triticum aestivum*):

identification of candidate meiotic genes using a comparative genetics approach. **The Plant Journal**, v. 36, n. 4, p. 443-456, 2003.

TALIAFERRO, C. M. Diversity and vulnerability of bermuda turfgrass species. **Crop Science**, v. 35, n. 2, p. 327-332, 1995.

TALIAFERRO, C. M.; ROUQUETTE, F. M.; MISLEVY, P. Bermudagrass and stargrass. **Warm-season (C4) Grasses**, n. 45, p. 417-475, 2004.

TAN, C.; WU, Y.; TALIAFERRO, C. M.; BELL, G. E.; MARTIN, D. L.; SMITH, M. W. Development and characterization of genomic SSR markers in *Cynodon transvaalensis* Burt-Davy. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 4, p. 523-531, 2014.

TANG, F.; CHEN, F.; CHEN, S.; WANG, X. E.; ZHAO, H. Molecular cytogenetic identification and relationship of the artificial intergeneric hybrid between *Dendranthema indica* and *Crossostephium chinense* by GISH. **Plant Systematics and Evolution**, v. 289, n. 1-2, p. 91-99, 2010.

TANG, F.; WANG, H.; CHEN, S.; CHEN, F.; LIU, Z.; FANG, W. Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. **Scientia Horticulturae**. v. 132, p. 1-6, 2011

TATE, J. A.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy in plants. In: GREGORY, T. R. **The Evolution of the Genome**. San Diego: Elsevier Academic Press, Chapter 7, 2005.

THE HERBARIUM CATALOGUE, ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW. Published on the Internet <http://www.kew.org/herbcat> [accessed on 15 November 2019].

TUFAIL, A.; AHMAD, F.; HAMEED, M.; AHMAD, R. Growth performance and stomatal behavior in relation to ecotypic adaptations in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 4, p. 1395-1403, 2017.

VAN DE WOUW, M.; MOHAMMED, J.; JORGE, M. A.; HANSON, J. Agro-morphological characterisation of a collection of *Cynodon*. **TG: Tropical Grasslands**, v. 43, n. 3, p. 151, 2009.

VITALES, D.; ÁLVAREZ, I.; GARCIA, S.; HIDALGO, O.; FELINER, G. N.; PELLICER, J.; GARNATJE, T. Genome size variation at constant chromosome number is not correlated with repetitive DNA dynamism in *Anacyclus* (Asteraceae). **Annals of Botany**, 2019.

VRIESENDORP, B. **Phylogenetworks: Exploring reticulate evolution and its consequences for phylogenetic reconstruction**. p. 184. PhD. Thesis. Wageningen University, Wageningen, 2007.

WANG, H.; VIEIRA, F. G.; CRAWFORD, J. E.; CHU, C.; NIELSEN, R. Asian wild rice is a hybrid swarm with extensive gene flow and feralization from domesticated rice. **Genome Research**, v. 27, n. 6, p. 1029-1038, 2017.

WENDEL, J. F. Genome evolution in polyploids. In: DOYLE, J. J; GAUT, B. S. **Plant Molecular Evolution**. Dordrecht: Springer, 2000, p. 225-249.

WOLNY, E.; HASTEROK, R. Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. **Annals of Botany**, v. 104, p. 873–881, 2009.

WU, R.S.; QIU, E. H.; ZHU, J. J. *Cynodon dactylon* (L) Pers (Poaceae) root extract induces apoptotic cell death via the cyclin D1 pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells in vitro and in vivo. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 4, p. 897-903, 2017.

WU, Y. *Cynodon*. In: KOLE, C. **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Millets and Grasses**. Stillwater: USA: Institute of Nutraceutical Research, 2011, Chapter 4.

WU, Y. Q.; TALIAFERRO, C. M.; BAI, G. H.; ANDERSON, M. P. AFLP analysis of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. var. *dactylon* genetic variation. **Genome**, v. 47, n. 4, p. 689-696, 2004.

WU, Y. Q.; TALIAFERRO, C. M.; BAI, G. H.; MARTIN, D. L.; ANDERSON, J. A.; ANDERSON, M. P.; EDWARDS, R. M. Genetic analyses of Chinese *Cynodon* accessions by flow cytometry and AFLP markers. **Crop Science**, v. 46, p. 917–926, 2006.

WU, Y. Q.; TALIAFERRO, C. M.; BAI, G. H.; ANDERSON, M. P. Genetic diversity of *Cynodon transvaalensis* Burt-Davy and its relatedness to hexaploid *C. dactylon* (L.) Pers. as indicated by AFLP markers. **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 848-853, 2005.

WU, Y. Q; TALIAFERRO, C. M. Bermudagrass. In: SINGH, R. J. **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Forage Crops**. Boca Raton: CRC Press, 2009. v. 5, p. 229–273.

XIONG, Z. Y.; TAN, G. X.; HE, G. Y.; HE, G. C.; SONG, Y. C. Cytogenetic comparisons between A and G genomes in *Oryza* using genomic *in situ* hybridization. **Cell Research**, v. 16, n. 3, p. 260, 2006.

ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype asymmetry. **Taxon**, v. 35, n. 3, p. 526-530, 1986.

ZHANG, J.; WANG, M.; GUO, Z.; GUAN, Y.; LIU, J.; YAN, X.; GUO, Y. Genetic Diversity and Population Structure of Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] Along Latitudinal Gradients and the Relationship with Polyploidy Level. **Diversity**, v. 11, n. 8, p. 135, 2019.

ZHANG, Y.; CHENG, C.; LI, J.; YANG, S.; WANG, Y.; LI, Z.; LOU, Q. Chromosomal structures and repetitive sequences divergence in *Cucumis* species revealed by comparative cytogenetic mapping. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 730, 2015.

ZHAO, Y.; DU, H.; WANG, Z.; HUANG, B. Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C4 perennial grass species, *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. **Physiologia Plantarum**, v. 141, n. 1, p. 40-55, 2011.