



ISABELLA DE CAMPOS MORAES

**CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS
INTERPLOIDES E ANEUPLOIDE DO COMPLEXO
*BRIZANTHA (UROCHLOA P. BEAUV.)***

**LAVRAS – MG
2022**

ISABELLA DE CAMPOS MORAES

**CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS INTERPLOIDES E
ANEUPLOIDE DO COMPLEXO *BRIZANTHA* (*UROCHLOA* P. BEAUV.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Prof^ª Dr^ª Vânia Helena Techio
Orientadora

**LAVRAS – MG
2022**

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

Moraes, Isabella de Campos.

Citogenética de híbridos interespecíficos interploides e
aneuploide do complexo *brizantha* (*Urochloa* P. Beauv.) / Isabella
de Campos Moraes. - 2022.

76 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.
Bibliografia.

1. *Brachiaria*. 2. Cromossomos. 3. Meiose. I. Techio, Vânia
Helena. II. Título.

ISABELLA DE CAMPOS MORAES

CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS INTERPLOIDES E ANEUPLOIDE DO COMPLEXO *BRIZANTHA* (*UROCHLOA P. BEAUV.*)

CYTOGENETICS OF INTERSPECIFIC HYBRIDS INTERPLOID AND ANEUPLOID OF THE *BRIZANTHA* COMPLEX (*UROCHLOA P. BEAUV.*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 agosto de 2022.

Dra. Cristina Maria Pinto De Paula	UFMG
Prof. Dr. Gonçalo Santos Da Silva	UESC
Profa. Dra. Magdalena Vaio Scvortzoff	Universidad de la República - Uruguai
Profa. Dra. Margarete Magalhães De Souza	UESC

Profª Drª Vânia Helena Techio
Orientadora

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder saúde e perseverança para concretizar mais essa etapa em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, não somente pela oportunidade de realizar toda minha formação acadêmica em um ambiente sólido e de qualidade, mas que também foi um lugar muito importante para o meu crescimento pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos. E aos outros órgãos de fomento, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro em projetos de pesquisa.

Ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas e aos professores que nele atuam pelo compartilhamento dos conhecimentos e ensinamentos.

Aos técnicos e funcionários do DBI, em especial ao Felipe e à Iara, por tornarem nosso trabalho possível.

À professora Vânia, pela orientação, confiança e dedicação. Também sou muito grata pela oportunidade de estar em sala de aula sob outra ótica, lecionando pela primeira vez.

Aos membros da banca, Cristina, Giovana, Gonçalo, Magdalena, Margarete e Welison, obrigada por aceitarem o convite e contribuírem com o trabalho.

Aos colegas do programa, em especial aos amigos do Laboratório de Citogenética, por todos os momentos e conhecimentos compartilhados. Apesar dos últimos anos terem sido difíceis e de menor convivência, vocês são excepcionais e me ajudaram muito. Um agradecimento especial à Yasmim, com quem compartilhei tantos momentos e se tornou uma grande amiga. Também agradeço ao Pedro, pelo auxílio na execução do projeto. E agradeço à professora Lisete, Gaby e Cris, que foram fundamentais no início da minha trajetória acadêmica.

Às amigas que a Biologia me presenteou e que se fazem presentes mesmo com o tempo e distância: Thaísa, Nat, Gi e Thaís.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas, obrigada por torcerem por mim e entenderem minha ausência em diversos momentos.

Aos meus pais, Marcelo e Márcia, por quem não tenho palavras para expressar todo meu amor e gratidão. Vocês são minha inspiração e orgulho infinitos.

Aos meus irmãos, Caio e Giovanna, meus melhores amigos da vida. Agradeço pela amizade, conselhos e todo incentivo. Vocês são maravilhosos e eu amo vocês!

Ao meu noivo e parceiro de vida, Camilo, por me apoiar e incentivar sempre.

Por fim, obrigada a todas, todos e todes que participaram dessa trajetória!

RESUMO

Algumas espécies do gênero *Urochloa* são amplamente conhecidas pelo seu potencial forrageiro. Programas de melhoramento estão em constante busca pelo desenvolvimento de novas cultivares e a realização de cruzamentos interespecíficos está entre as suas principais estratégias. No complexo *brizantha*, os cruzamentos interespecíficos envolvem principalmente tetraploides artificiais de *Urochloa ruziziensis*, como genitores femininos, e apomíticos de *Urochloa brizantha* ou *Urochloa decumbens*, como genitores masculinos. Muitas vezes esses cruzamentos são realizados em blocos de policruzamentos e sem a emasculação prévia das plantas, de forma que a certificação dos híbridos e identificação dos doadores de pólen pode ser difícil e demorada. Além disso, avaliar o complemento cromossômico e a meiose dos híbridos é importante, pois pode influenciar não apenas o seu desenvolvimento, mas também o sucesso das gerações subsequentes. Diante disso, esse estudo teve por objetivo avaliar híbridos do complexo *brizantha*, a partir de três abordagens: i) identificar os doadores de pólen de cada híbrido; ii) caracterizar o complemento cromossômico somático; e iii) avaliar a meiose e viabilidade do pólen, com enfoque no pareamento dos cromossomos. No primeiro estudo, os genitores foram identificados por meio de marcadores microssatélites e dois híbridos foram identificados como interploides ($2n = 40$ e 41 cromossomos) e um aneuploide ($2n = 36+1$). O tamanho do genoma e número de sítios de DNA ribossomal (rDNA) também foi determinado para todos os genótipos, com variações para ambas as características entre parentais e híbridos. O segundo estudo identificou configurações univalentes e multivalentes nas diacinese dos três híbridos, embora a formação de bivalentes tenha sido mais frequente. A hibridização *in situ* genômica (GISH) no híbrido 7F/153 (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* 5x) identificou pareamentos intragenômicos e intergenômicos envolvendo os genomas B/B^1 e B^2 . As anormalidades meióticas predominantes envolveram erros na orientação e segregação cromossômica, que podem levar à formação de gametas aneuploides. A GISH também contribuiu para identificar um conjunto de nove cromossomos B^2 no complemento do parental *Urochloa brizantha* 5x ($2n = 45$), revelando sua origem a partir da hibridação entre um gameta não reduzido de um tetraploide e um gameta reduzido do diploide *U. ruziziensis* (B^2B^2), e validando a transmissão de quatro cromossomos B^2 e dezoito cromossomos B/B^1 para o híbrido. Os resultados podem contribuir com programas de melhoramento do gênero e trazem novas perspectivas sobre a constituição e herança cromossômica em cruzamentos interploides ou com mesmo nível de ploidia.

Palavras-chave: *Brachiaria*. Marcadores moleculares. Hibridização *in situ*. Meiose. Constituição genômica.

ABSTRACT

Some species of the genus *Urochloa* are widely known for their foraging potential. Breeding programs are always aimed at developing new cultivars and one of the main strategies is interspecific crosses. In the *brizantha* complex, interspecific crosses mainly involve artificial tetraploid of *U. ruziziensis*, as female parents, and apomictic ones of *U. brizantha* or *U. decumbens*, as male parents. Often these crosses are carried out in blocks of polycrosses and without previous emasculation of the plants, so that the certification of hybrids and identification of pollen donors can be difficult. In addition, evaluating the chromosomal complement and meiosis of hybrids is important, as it can influence not only their development, but also the success of subsequent generations. Therefore, this study aimed to evaluate hybrids of the *brizantha* complex, from three approaches: i) identify the pollen donors of each hybrid; ii) characterize the somatic chromosomal complement; and iii) to evaluate meiosis and pollen viability, focusing on chromosome pairing. In the first study, the male parents were identified using microsatellite markers and two hybrids were identified as interploid ($2n = 40$ and 41 chromosomes) and one aneuploid ($2n = 36+1$). Genome size and number of ribosomal DNA sites were also determined for all genotypes, with variations found for both traits between parents and hybrids. The second study identified univalent and multivalent configurations in the diakinesis of the three hybrids, although the bivalent pairing was more frequent. Genomic *in situ* hybridization (GISH) in the interploid hybrid 7F/153 (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* 5x) identified intragenomic and intergenomic pairings involving the B/B¹ and B² genomes. The predominant meiotic abnormalities involved errors in chromosome orientation and segregation, which can lead to the formation of aneuploid gametes. The GISH also contributed to identify a set of nine B² chromosomes in the complement of *Urochloa brizantha* 5x ($2n = 45$), revealing its origin from unreduced gamete of a tetraploid and reduced gamete of diploid *U. ruziziensis* (B²B²), and validating the transmission of four B² chromosomes and eighteen B/B¹ chromosomes to the hybrid. The results will contribute to breeding programs of the genus and offer new perspectives on chromosomal constitution and inheritance in interploid crosses or with the same ploidy level.

Keywords: *Brachiaria*. Molecular markers. In situ hybridization. Meiosis. Genomic constitution.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	8
1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Características gerais e importância econômica do gênero <i>Urochloa</i>	10
2.2	Estudos citogenéticos em <i>Urochloa</i>	13
2.3	Hibridação interploide no melhoramento de plantas	16
	REFERÊNCIAS	18
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	25
	ARTIGO 1 - Hibridação interploide no Complexo ‘brizantha’: identificação e caracterização citogenética	25
1	INTRODUÇÃO	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
3	RESULTADOS	33
4	DISCUSSÃO	37
5	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	49
	ARTIGO 2 - Pareamento cromossômico em híbrido interploide de <i>Urochloa</i> : novas considerações sobre afinidade e constituição genômica.....	51
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	56
3	RESULTADOS	58
4	DISCUSSÃO	65
5	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	76

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Urochloa P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) é um gênero que engloba forrageiras amplamente cultivadas em regiões tropicais e subtropicais (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). *Urochloa brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich.) RD Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster e *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C. M. Evrard) Crins estão entre as principais espécies de importância do gênero (FERREIRA et al., 2021) e formam o complexo agâmico *brizantha*, que abrange representantes diploides e poliploides com barreiras reprodutivas limitadas pela apomixia e nível de ploidia (VALLE; SAVIDAN, 1996; CARRILLO et al., 2010).

No complexo *brizantha*, uma importante estratégia de melhoramento envolve a realização de cruzamentos interespecíficos, pois possibilita explorar a variabilidade genética de genótipos apomíticos de *U. brizantha* e *U. decumbens*, (VALLE; MILES, 2001). Para tal, utiliza-se, como genitor feminino, genótipos sexuais de *U. ruziziensis* poliploidizados artificialmente com colchicina (SWENNE; LOUANT; DUJARDIN, 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014). Na maioria das vezes, esses cruzamentos não são controlados e ocorrem em blocos de policruzamentos, sem emasculação prévia das plantas (VALLE; MILES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009), de forma que certificar a hibridação e identificar o doador de pólen pode ser uma tarefa difícil. Nesse sentido, os marcadores microsatélites (SSRs – *Simple Sequence Repeats*) funcionam como uma alternativa valiosa para estudos de certificação de híbridos e genotipagem (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996; KALIA et al., 2011).

Ao considerar que os híbridos formados podem ser apomíticos ou sexuais, e que o modo de reprodução influenciará no destino de uso de cada genótipo (VALLE; MILES, 2001), a identificação precoce do modo de reprodução é desejada e pode ser alcançada com o uso de marcadores específicos da apomixia, como o marcador p779/p780, desenvolvido inicialmente em *Pennisetum* para a região genômica específica da aposporia (ASGR-BBML) (AKIYAMA et al., 2011), e eficiente em diagnosticar o modo reprodutivo em um painel diverso contendo espécies e híbridos de *Urochloa* (WORTHINGTON et al., 2016; 2019).

Os dados citogenéticos são também importantes em todas as etapas de melhoramento, uma vez que a poliploidia e ampla variação cromossômica estão presentes mesmo dentro do

complexo *brizantha* (PENTEADO et al., 2000; VALLE; PAGLIARINI, 2009; TOMASZEWSKA et al., 2021). Com $x=9$ como número básico, *U. ruziziensis* possui apenas representantes diploides, além dos tetraploides artificiais, enquanto *U. decumbens* apresenta citótipos diploides, tetraploides e pentaploides e *U. brizantha* varia de diploide a hexaploide (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Diferentes híbridos interespecíficos do complexo *brizantha* apresentaram diferenças no tamanho do genoma e no número de sítios de DNA ribossomal (rDNA) 35S e 5S (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017). Além disso, híbridos aneuploides com $2n = 36+1$ e $2n = 36+2$ foram relatados em cruzamentos envolvendo *U. ruziziensis* ($4x$) e *U. decumbens* ou *U. brizantha* (ambas $4x$) (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; MORAES et al., 2019; ROCHA et al., 2019).

Nos estudos da meiose dos híbridos de *Urochloa*, os autores identificaram configurações de pareamento em multivalentes, evidenciando a homologia dos parentais (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2005; FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2007; ADAMOWSKI; PAGLIARINI; VALLE, 2008). A ocorrência de pareamento intergenômico em um híbrido aneuploide (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) identificada através da GISH (*genomic in situ hybridization*) e variação nas taxas de anormalidades meióticas e viabilidade polínica observadas em diferentes aneuploides e euploides (ROCHA et al., 2019), além da complexidade genômica presente no complexo *brizantha* (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; CORRÊA et al., 2020; TOMASZEWSKA et al., 2021), reforçam a necessidade de monitorar o pareamento e progresso da divisão meiótica nos híbridos.

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: i) certificar a hibridação e identificar o genitor masculino de três híbridos do complexo *brizantha* via marcadores SSRs; ii) determinar o modo de reprodução de parentais e híbridos através do marcador p779/p780; iii) caracterizar o complemento cromossômico por meio de contagens cromossômicas, número e posição dos sítios de rDNA 35S e 5S e tamanho do genoma nuclear; e iv) analisar o pareamento cromossômico e progresso da divisão meiótica por meiose convencional, com foco no comportamento dos cromossomos e respectivos genomas por meio da GISH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais e importância econômica do gênero *Urochloa*

Urochloa é um gênero pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Paniceae (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). A taxonomia deste gênero possui um histórico longo e controverso. Um número significativo de espécies que agora estão incluídas em *Urochloa*, anteriormente era pertencente ao gênero *Brachiaria*. Descrita pela primeira vez por Trinius, em 1834, *Brachiaria* foi considerada como uma subdivisão do gênero *Panicum*. Posteriormente foi elevada para a categoria de gênero por Grisebush, em 1853. Entretanto, vários autores questionaram a validade de classificá-la como gênero e realocaram quase todas as espécies que constituem o grupo para o gênero *Urochloa* (NGUYEN, 1966; WEBSTER, 1987; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VELDKAMP, 1996; 2004; TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005; SALARIATO et al., 2010).

O CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) possui uma das maiores coleções mundiais de culturas importantes, com um banco de germoplasma que abrange quase 1700 acessos de gramíneas, no qual o gênero *Urochloa* possui papel representativo, constituindo cerca de 38% da coleção (CIAT, 2019). O número de espécies que compõe o gênero também é relativamente grande, abrangendo aproximadamente 86 espécies (PLANTS OF THE WORLD ONLINE - POWO, 2022), encontradas em grande concentração na África, região considerada como seu centro de origem (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996; RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

Anuais ou perenes, as plantas são, em geral, caracterizadas por serem robustas, de hábito cespitoso, com colmos inicialmente prostrados que também podem produzir afilos predominantemente eretos (SEIFFERT, 1984). Além disso, as espécies de *Urochloa*, juntamente com as espécies de *Eriochloa* e *Panicum*, compartilham a via fotossintética C4 com a utilização da enzima PEP-CK (Fosfoenol Piruvato Carboxiquinase) (CLAYTON; RENVOIZE, 1986).

Urochloa engloba importantes forrageiras tropicais, estando entre as mais cultivadas na América Latina, Austrália e Ásia (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996; JANK et al., 2014; SIMEÃO et al., 2021). No Brasil, a primeira introdução como forrageira aconteceu em 1952 pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN) e outras espécies foram introduzidas entre os anos de 1960 e 1970 (SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971). Devido ao alto

rendimento, bom conteúdo nutricional e maior adaptabilidade a diversos nichos ecológicos (MILES; MAASS; VALLE, 1996), o gênero rapidamente ganhou espaço e tornou-se o mais cultivado no país (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

A demanda global por produtos agropecuários só tende a aumentar ao longo do tempo, assim como a necessidade de adoção de estratégias visando uma produção mais sustentável (JANK et al., 2021). No que diz respeito às pastagens, uma das estratégias de sustentabilidade envolve o uso e manejo de forrageiras melhoradas (JANK et al., 2021). No Brasil, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) conduz desde a década de 1980 programas de melhoramento de *Urochloa* visando a melhoria na qualidade e o aumento na produtividade das pastagens, através da avaliação e seleção de genótipos superiores, além de cruzamentos intra e interespecíficos (VALLE; PAGLIARINI, 2009; FERREIRA et al., 2021). Os programas, bem como a maioria dos estudos, envolvem basicamente as espécies que possuem maior importância no país, que são: *U. decumbens*, *U. brizantha*, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (sin. *Brachiaria humidicola* Rendle) e *U. ruziziensis* (FERREIRA et al., 2021).

A cultivar australiana Basilisk de *U. decumbens* é considerada a primeira forrageira plantada em grande escala no Brasil (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006), consequência da boa adaptação a solos ácidos, facilidade no manejo e, principalmente, produtividade de forragem de boa qualidade durante todo o ano (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). Entretanto, tal cultivar é suscetível a cigarrinhas e ao fungo *Pithomyces chartarum* (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006), característica que cedeu lugar para o plantio de cultivares resistentes, como *U. brizantha* cv. Marandu.

Disponibilizada em 1984 pela Embrapa Gado de Corte e Embrapa Cerrados, a cultivar Marandu (*U. brizantha*) tornou-se a forrageira mais plantada no Brasil (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006). Além da resistência às cigarrinhas, característica que contribuiu muito para seu amplo cultivo, a cultivar apresenta bom valor nutritivo, excelente produção de sementes e boa resposta a adubação (ZIMMER et al., 1998). Posteriormente, outras cultivares de *U. brizantha* foram lançadas, como as cultivares BRS Piatã (VALLE et al., 2007) e Xaraés (VALLE et al., 2004), e constituem importantes alternativas para a diversificação de pastagens.

Urochloa humidicola é uma espécie amplamente utilizada em áreas de alagamento temporário e possui boa adaptação a solos de baixa fertilidade, aceitabilidade por bovinos e equinos e tolerância a algumas pragas, entre elas às cigarrinhas (KELLER-GREIN; MAASS;

HANSON, 1996). Além disso, a espécie tem despertado interesse mundial em razão da capacidade de inibição de nitrificação especialmente alta (BYRNES et al., 2017). A nitrificação é um processo natural que causa a conversão de nitrogênio em óxido nitroso (N₂O), um gás do efeito estufa 300 vezes mais potente que o CO₂. Os estudos apontam que, além de reduzir as emissões de gases do efeito estufa, a inibição da nitrificação pode ainda trazer benefícios adicionais, como a menor necessidade de fertilizantes nitrogenados e a conservação da paisagem (CHIRINDA et al., 2019).

Urochloa ruziziensis possui bom valor nutritivo e rápido estabelecimento de pastagem (VALLE; PAGLIARINI, 2009), mas o grande destaque da espécie é o modo de reprodução totalmente sexual, possibilitando explorar a variabilidade genética de genótipos apomíticos compatíveis (VALLE; MILES, 2001). Essa espécie faz parte do complexo agâmico *brizantha*, composto também por *U. brizantha* e *U. decumbens*. Um complexo agâmico contém indivíduos diploides e poliploides, no qual as barreiras reprodutivas são limitadas pela apomixia e nível de ploidia (VALLE; SAVIDAN, 1996; CARRILLO et al., 2010). O sucesso nas hibridações interespecíficas com os apomíticos de *U. brizantha* e *U. decumbens* foi possível ao superar as barreiras de ploidia, como através da duplicação artificial de *U. ruziziensis* com colchicina (SWENNE; LOUANT; DUJARDIN, 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014).

O primeiro híbrido interespecífico de *Urochloa* disponibilizado comercialmente foi a cultivar Mulato (*U. ruziziensis* - 4x x *U. brizantha* cv. Marandu - 4x) (ARGEL et al., 2006). Posteriormente o CIAT lançou a cultivar Mulato II, resultado de três gerações de cruzamento e seleção, iniciadas com o cruzamento de *U. ruziziensis* com *U. decumbens* (ARGEL et al., 2007). Em 2017 a Embrapa, em parceria com a UNIPASTO (Associação para o Fomento à Pesquisa de Forrageiras), produziu a cultivar híbrida BRS RB331 Ipyporã, que é resultado do cruzamento de *U. ruziziensis* com *U. brizantha* (VALLE et al., 2017). Diversos outros híbridos foram produzidos (FERREIRA et al., 2021) e são constantemente avaliados pelos centros de pesquisa da Embrapa e instituições parceiras. Além do desempenho agrônômico, um fator muito importante nas avaliações é a citogenética dos genótipos, tendo em vista que as informações geradas podem subsidiar decisões dos melhoristas, como na escolha de parentais, de híbridos mais estáveis e até mesmo para estimar a variabilidade genética (DAVIDE et al., 2009).

2.2 Estudos citogenéticos em *Urochloa*

Diversos números básicos foram relatados para as espécies de *Urochloa*, com $x=6, 7, 8,$ e 9 (DARLINGTON; WYLIE, 1955; CHRISTOPHER; ABRAHAM, 1976; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006), mas $x=9$ é o que predomina na maioria das espécies. Segundo Valle e Pagliarini (2009), o número cromossômico também pode variar consideravelmente, com genótipos apresentando $2n = 14$ cromossomos até genótipos com $2n = 90$ cromossomos. Para os níveis de ploidia, é descrito variação inter e intraespecífica, com acessos diploides, tetraploides, pentaploides, hexaploides, heptaploides, octaploides, nonaploides e decaploides, e tendência à tetraploidia (PENTEADO et al., 2000; TOMASZEWSKA et al., 2021).

A poliploidia em *Urochloa* está intimamente relacionada com a apomixia, enquanto o modo de reprodução sexual é normalmente associado ao nível diploide (VALLE; PAGLIARINI, 2009). A apomixia descrita para o gênero é do tipo apospórica, com o saco embrionário do tipo *Panicum* contendo quatro núcleos, enquanto que as plantas sexuais apresentam sacos embrionários do tipo *Polygonum*, com oito ou mais núcleos (VALLE; GLIENKE; LEGUISAMON, 1994).

O modo de reprodução apomítico é considerado um fator importante para o sucesso evolutivo de *Urochloa*, tendo em vista a ocorrência de genótipos pentaploides naturais e de ploidia elevada (RISSO-PASCOTTO et al. 2003). Entretanto, a apomixia em *Urochloa* é pseudogâmica, sendo necessário a fecundação dos núcleos polares para o desenvolvimento do endosperma e, conseqüentemente, produção de sementes viáveis (FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2012). Por tanto, um comportamento meiótico regular é extremamente importante, seja em genótipos apomíticos já melhorados (para produção de sementes) ou em parentais e híbridos em fase de melhoramento. A meiose pode fornecer informações relevantes sobre as relações genômicas, ocorrência de instabilidade e irregularidades na divisão e fertilidade reduzida ou formação de gametas aneuploides (DAVIDE et al., 2009). O comportamento meiótico, bem como a ocorrência de irregularidades e a viabilidade do pólen são caracteres bem avaliados em espécies de *Urochloa* (MENDES-BONATO et al., 2002; BOLDRINI et al., 2011; PAGLIARINI et al., 2012; PAULA et al., 2016; MORAIS; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2018) e híbridos interespecíficos (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2005; ADAMOWSKI; PAGLIARINI; VALLE, 2008; FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2012).

Com relação às espécies de maior importância econômica, *U. decumbens* possui genótipos naturalmente diploides e tetraploides, com $2n = 18$ e $2n = 36$ cromossomos (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001) e genomas B^1B^1 (CORRÊA et al., 2020) e $B^1B^1B^2B^2$ (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017), respectivamente. Em uma cultivar tetraploide da espécie, *U. decumbens* cv. Basilisk, foi identificado quatro sítios de rDNA 35S e sete sítios de rDNA 5S. Dois acessos pentaploides também foram relatados na espécie e o seu comportamento meiótico indicou a ocorrência de hibridização natural entre genótipos parentais (RICCI; PAGLIARINI; VALLE, 2010).

Urochloa brizantha apresenta acessos com $2n = 2x = 18$, $2n = 4x = 36$, $2n = 5x = 45$ e $2n = 6x = 54$ (MENDES-BONATO et al., 2002; RISSO-PASCOTTO et al., 2003; PAGLIARINI et al., 2012; NITTHAISONG et al., 2016). Por meio da GISH em c-metáfases, os genomas foram estabelecidos para o nível diploide, como B^1B^1 (CORRÊA et al., 2020), e nível tetraploide, como BBB^1B^1 (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017). Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010) relataram variação no número de sítios de rDNA entre acessos do mesmo nível de ploidia, enquanto Nani et al. (2016) encontraram variação no número de sítios na mesma cultivar (*U. brizantha* cv. Marandu), com a ocorrência de dois a quatro sítios de rDNA 35S e três a seis sítios de 5S. Nielen et al. (2010) determinaram dois sítios de rDNA 35S e dois sítios de 5S em um acesso diploide e quatro sítios de rDNA 35S e seis sítios de 5S em um acesso tetraploide. Nos citótipos pentaploides foram identificados cinco sítios de rDNA 35S e cinco ou oito sítios de rDNA 5S (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; MORAES et al., 2021).

Para *U. humidicola*, Bernini e Marin-Morales (2001) encontraram $2n = 36$, 42 e 54 através de contagens e dados cariotípicos. Com base no comportamento meiótico de acessos da espécie, estudos posteriores identificaram $x=6$ como número básico (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; BOLDRINI et al., 2011). A FISH (*fluorescence in situ hybridization*) em um acesso hexaploide ($2n = 6x = 36$) detectou seis sítios de rDNA 35S e oito sítios de rDNA 5S, com sintenia em dois deles (TOMASZEWSKA et al., 2021). Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010) relataram seis sítios de ambos os rDNA, 35S e 5S, em um acesso com 54 cromossomos, ocorrendo sintenia de sítios em três cromossomos do complemento. A ocorrência natural de um acesso poliploide sexual no germoplasma de *U. humidicola* (H31, $2n = 6x = 36$) possibilita explorar a variabilidade genética de genótipos apomíticos através de hibridação intraespecífica (BOLDRINI et al., 2011).

Urochloa ruziziensis é a única espécie cultivada no Brasil que é exclusivamente diploide e sexual (SOUZA-SOBRINHO; BENITES, 2016), apresentando $2n = 2x = 18$ cromossomos (BENINI; MARIN-MORALES, 2001), genoma B²B² (PAULA, SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017), dois sítios de rDNA 35S e quatro sítios de rDNA 5S (NANI et al., 2016). Para o genótipo duplicado artificialmente “Iracema”, Paula, Souza-Sobrinho e Techio (2017) confirmaram os 36 cromossomos e encontraram quatro e seis sítios de rDNA 35S e 5S, respectivamente. Paula et al. (2016) verificaram a estabilidade meiótica e alta viabilidade polínica em vários tetraploides artificiais de *U. ruziziensis*, validando seu uso em programas de melhoramento.

Os híbridos produzidos nos programas de melhoramento de *Urochloa* também foram amplamente estudados quanto a citogenética, em especial os interespecíficos do complexo *brizantha* (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2005; MENDES-BONATO; PAGLIARINI; VALLE, 2007; FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2007, 2012; ADAMOWSKI; PAGLIARINI; VALLE, 2008; PAULA, SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; ROCHA et al., 2019; MORAES et al., 2019; RAGALZI et al., 2021). Alguns estudos relataram aneuploidia em híbridos resultantes do cruzamento de *U. ruziziensis* (tetraploide artificial) com *U. decumbens* ou *U. brizantha* (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; MORAES et al., 2019; ROCHA et al., 2019). Esses híbridos aneuploides apresentaram $2n = 4x = 36+1$ ou $2n = 4x = 36+2$, alteração no número de sítios de rDNA (PAULA, SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017) e no padrão cariotípico (MORAES et al., 2019) em relação ao esperado considerando a média dos parentais.

Os estudos meióticos em híbridos do complexo *brizantha* também trouxeram importantes informações, principalmente sobre a relação genômica das espécies. A ocorrência frequente de pareamento irregular, com presença de trivalentes, tetravalentes e outros multivalentes, possibilitaram identificar a homologia entre os genomas (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2005; MENDES-BONATO; PAGLIARINI; VALLE, 2007; FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2007, 2012; ADAMOWSKI; PAGLIARINI; VALLE, 2008). Além de evidenciar a afinidade genômica, a ocorrência de multivalentes nos híbridos também fornece indícios de recombinação genética entre os cromossomos dos parentais, sugerindo sucesso na introgressão de genes (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2005; FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2007).

Através da GISH em c-metáfases, Paula, Souza-Sobrinho e Techio, (2017) confirmaram a alopoliploidia segmentar em *Urochloa* e relataram maior afinidade entre os

genomas B e B¹ e entre B¹ e B². Na meiose, a GISH possibilitou identificar pareamento intra, inter e intraintergenômico envolvendo os genomas B¹ e B² em um híbrido aneuploide (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) (ROCHA et al., 2019). Os autores também relataram frequências variáveis de anormalidades meióticas em diferentes híbridos, indicando que a taxa de anormalidades e configurações de pareamento são dependentes do genótipo parental (ROCHA et al., 2019). A taxa de anormalidades meióticas é um fator muito importante que também é avaliado, podendo afetar negativamente a fertilidade dos gametas (ROCHA et al., 2019). Ragalzi et al. (2021) relataram que as anormalidades na meiose dos híbridos frequentemente levaram à formação de produtos meióticos anormais e afetaram a produção de sementes.

2.3 Hibridação interploide no melhoramento de plantas

O cruzamento de genótipos com ploidias diferentes foi usado algumas vezes no melhoramento genético de plantas como uma estratégia para aproveitar o germoplasma, ampliar a variabilidade genética e realizar a introgressão de genes de interesse (WERLEMARK et al., 2009; WEN et al., 2012; LUO et al., 2017; HE et al., 2017; PADMANABAN et al., 2017; TRÄNKNER et al., 2020). Em *Cenchrus*, híbridos hexaploides promissores foram obtidos por duplicação artificial com colchicina de triploides, iniciados com o cruzamento de *Cenchrus purpureum* ($2n = 4x = 28$) com *Cenchrus americanus* ($2n = 2x = 14$) (CAMPOS et al., 2009; REIS et al., 2021).

No trigo os estudos são numerosos e envolvem a hibridação com diferentes espécies que podem fornecer genes úteis ao melhoramento genético. As gerações derivadas de híbridos pentaploides, obtidos a partir do cruzamento de *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$) com *Triticum turgidum* spp. *durum* ($2n = 4x = 28$), apresentam diversas constituições cromossômicas com potencial para melhorar várias características de ambos os parentais (PADMANABAN et al., 2017). A hibridação entre *T. aestivum* e *Elytrigia elongata* ($2n = 10x = 70$) resulta em híbridos que podem ser utilizados na construção de linhas de adição, substituição ou translocação, e são fontes promissoras de resistência a múltiplas doenças do trigo (ZHENG et al., 2014; HE et al., 2017).

Em *Brassica*, a hibridação interespecífica interploide tem sido usada na obtenção de materiais que são utilizados como ponte para a transferência de características desejáveis entre as espécies, como a coloração amarela da semente em *Brassica napus*, iniciada com o

cruzamento entre *Brassica juncea* ($2n = 4x = 36$) e *Brassica oleracea* ($2n = 2x = 18$) (WEN et al., 2012). No melhoramento de morango, Luo et al. (2017) realizaram a hibridação entre octoploide ($2n = 56$) e dodecaploide ($2n = 84$) a fim de obter genótipos com alta resistência ao frio. Na espécie *Hydrangea macrophylla* (hortênsia), a hibridação intraespecífica interploide é considerada uma importante estratégia para gerar variabilidade genética e contribuir para a obtenção de variedades poliploides mais robustas e tolerantes ao estresse (ALEXANDER, 2020; TRÄNKNER et al., 2020). Apesar da hibridação interploide ter sido relatada anteriormente em *Urochloa* (HACKER, 1988; NITTHAISONG et al., 2019), com a realização de cruzamentos entre diploides ($2n = 18$) e tetraploides ($2n = 36$) do complexo *brizantha*, os híbridos triploides foram de difícil recuperação e geralmente apresentaram problemas de fertilidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. de V.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 87, n. 1, p. 33-38, 2008.
- AKIYAMA, Y.; YAMADA-AKIYAMA, H.; EBINA, M. Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. **Grassl. Sci.**, Nova Jersey, v. 56, p. 217-223, 2010.
- AKIYAMA, Y. et al. Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1-16, 2011.
- ALEXANDER, L. Ploidy level influences pollen tube growth and seed viability in interploidy crosses of *Hydrangea macrophylla*. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1-10, 2020.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrida CIAT 36061)**: Gramínea de alta produção e qualidade forrageira para os trópicos. Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2006. 26 p.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato II (*Brachiaria* híbrida CIAT 36087)**: Gramínea de alta qualidade e produção forrageira, resistente às cigarrinhas e adaptada a solos tropicais ácidos. Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2007. 22 p.
- BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2297-2309, November 1987.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios Journal**, Cambridge, v. 104, p. 157-171, January 2001.
- BYRNES, R. C. et al. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria* grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 107, p. 156-163, 2017.
- BOLDRINI, K. R. et al. Meiotic behavior in nonaploid accessions of *Brachiaria humidicola* (Poaceae) and implications for breeding. **Genet. Mol. Res. (GMR)**, v. 10 (1), p. 169-176, 2011.
- CAMPOS, J. M. S. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, v. 128, n. 1, p. 101-104, January 2009.
- CARRILLO, A. R. Q. et al. Apomixis importance for tropical forage grass selection and breeding. Review. **Rev. Mex. Cienc. Pecu.**, v. 1(1), p. 25-42, 2010.

CHIRINDA, N. et al. Adequate vegetative cover decreases nitrous oxide emissions from cattle urine deposited in grazed pastures under rainy season conditions. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, January 2019.

CHRISTOPHER, J.; ABRAHAM, A. Studies on the cytology and phylogeny of south Indian grasses III. Subfamily VI: Panicoideae, tribe (i) the Paniceae. **Cytologia**, Tokyo, v. 41, p. 621-637, February 1976.

CIAT. **Tropical forage diversity**. <https://ciat.cgiar.org/what-we-do/crop-conservation-and-use/tropical-forage-diversity/>, acessado em: 02 de março de 2019.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. Genera *Graminum*: Grasses of the World. **Kew Bull, Addit. Ser.**, v. 13, p. 256-285, 1986.

CORRÊA, C. T. R. et al. GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa* P. Beauv. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 887-896, November 2020.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. 519 p.

DAVIDE, L. C. et al. Citogenética e suas aplicações no melhoramento de plantas. Informe agropecuário, **Belo Horizonte**, v. 30, p. 53-63, 2009.

FERREIRA, R. C. U. et al. An Overview of the Genetics and Genomics of the *Urochloa* Species Most Commonly Used in Pastures. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 770461, 22p., December 2021.

FUZINATTO, V. A.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1107-1117, December 2007.

FUZINATTO, V. A.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior in apomictic *Brachiaria ruziziensis* × *B. brizantha* (Poaceae) progênies. **Sci. Agric.**, v.69, n.6, p.380-385, Nov/Dec 2012.

HE, F. et al. Chromosome pairing in hybrid progeny between *Triticum aestivum* and *Elytrigia elongata*. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. 2161, 10p., December 2017.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Grassland Science**, Japão, v. 55, n. 3, p. 164-170, August 2009.

JANK, L. et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132-1137, March 2014.

JANK, L. et al. **Sustainable Use of Grassland Resources for Improved Livelihoods**. XXIV International Grassland Congress, XI International Rangeland Congress, In International Grassland Congress Proceedings. 13p., October 2021.

KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. Desenvolvimento de Cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil. Planaltina-DF: **Embrapa cerrados**, Agosto 2006. 58 p.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Org.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 16-39.

LUO, G. et al. Creating cold resistant strawberry via interploidy hybridization between octoploid and dodecaploid. **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 1-10, 2017.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae), **Euphytica**, v. 125, p. 419–425, 2002.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic Arrest Compromises Pollen Fertility in an Interspecific Hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 831-837, Set 2007.

MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT (1996) 303 p.

MORAES, I. C. et al. Characterization of aneuploidy in interspecific hybrid between *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & Evrard) Crins and *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 2, p. 1931-1940, February 2019.

MORAES, I. C. et al. Karyotype analysis and mode of reproduction of two species of *Urochloa* P. Beauv. **Crop Science**, v. 61, n. 5, p. 3415-3424, 2021.

MORAIS, L. C.; SOUZA-SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Comparative microsporogenesis between diploid and tetraploid plants of *Brachiaria ruziziensis* and their progenies. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 258-264, 2018.

MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Revisión de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, v.31, p.43-109, 1992.

NANI, T. F. et al. Physical Map of Repetitive DNA Sites in *Brachiaria* spp.: Intravarietal and Interspecific Polymorphisms. **Crop Science**, Madison, v. 56, p. 1-15, May 2016.

NGUYEN, T. Q. Notulae criticae de Gramineis florae vietnamensis. **Novosti. Sist. Vysa. Rast.**, v. 3, p. 10-14, 1996.

NIELEN, S. et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sex. Plant Reprod.**, v. 23, p. 45–51, 2010.

NITTHAISONG, P. et al. Chromosome Number, Genomic Variation, and Molecular Markers to Assess Genetic Diversity of *Brachiaria* Species. **Crop Science**, Madison, v. 56, p. 312–321, 2016.

PADMANABAN, S. et al. Pentaploid wheat hybrids: applications, characterisation, and challenges. **Frontiers in plant science**, v. 8 (article 358), 10p, March 2017.

PAGLIARINI, M. S. et al. Microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) as a selection tool for breeding. **Genet. Mol. Res. (GMR)**, v. 11(2), p. 1309-1318, 2012.

PAULA, C. M. P. et al. Microsporogenesis analysis validates the use of artificially tetraploidized *Brachiaria ruziziensis* in breeding programs. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 3, p. 1-10, September 2016.

PAULA, C. M. P.; SOUZA-SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Genomic Constitution and Relationship in *Urochloa* (Poaceae) Species and Hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 57, p. 2605-2616, August 2017.

PENTEADO, M. I. O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, Mai 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v. 1, n. 7, p. 215-222, July 1996.

POWO (2022). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/> acessado em 11 agosto 2022.

RAGALZI, C. M. et al. Microsporogenesis associated with seed yield in *Urochloa* sexual polyploid hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n.4, 9 p., 2021.

REIS, G. B. et al. Somatic Cell Alterations in Interspecific Hybrids of *Cenchrus purpureum* (Schumach.) and *Cenchrus americanus* (L.) Morrone by Genomic *in Situ* Hybridization. **Cytology and Genetics**, v. 55, n. 2, p. 194-198, April 2021.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Org.). ***Brachiaria*: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 1-15.

RICCI, G. C. L.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Genome elimination during microsporogenesis in two pentaploid accessions of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2364-2371, 2010.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; MENDES-BONATO, A.B. Chromosome number and microsporogenesis in pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breed.**, v.122, p.136-140, 2003.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, v.145, p.155-159, 2005.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Research and Crop Evolution**, Gatersleben, v. 53, p. 7-10, May 2006.

ROCHA, M. J. et al. Comparative meiosis and cytogenomic analysis in euploid and aneuploid hybrids of *Urochloa* P. Beauv. **Chromosome Research**, v. 27, n. 4, p. 333-344, Sept 2019.

SALARIATO, D. L. et al. Molecular phylogeny of the subtribe Melinidinae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 56, p. 355-369, July 2010.

SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 83 p., 1984.

SERRÃO, E. A.; SIMÃO NETO, M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *Brachiaria decumbens* Stapf e *Brachiaria ruziziensis* Germain e Everaed. **Boletim do Instituto de Pesquisa Experimental Agropecuária do Norte**, Belém, v. 1, n. 1, p. 1-31, Nov 1971.

SIMEÃO, R. M. et al. Genomic selection in tropical forage grasses: current status and future applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 12 (article 665195), 22p., April 2021.

SOUZA-SOBRINHO, F.; BENITES, F.R.G. Melhoramento Genético de *Brachiaria ruziziensis*: Histórico e Estratégias. In: DAVIDE, L.C.; BENITES, F.R.G. I Workshop sobre Citogenética e Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Forrageiras. **EMBRAPA**, Juiz de Fora, p. 27-37, Nov 2016.

SWENNE, A.; LOUANT, B. P.; DUJARDIN, M. Induction of Autotetraploid Forms in *Brachiaria ruziziensis* Germain Et Evrad (graminae) By a Colchicine Treatment. **Agronomie Tropicale**, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.

TIMBÓ, A. L. O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.

TOMASZEWSKA, P. et al. Complex polyploid and hybrid species in an apomictic and sexual tropical forage grass group: genomic composition and evolution in *Urochloa* (*Brachiaria*) species. **Annals of Botany**, 21p., December 2021.

TORRES-GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 37, p. 36-44, October 2005.

TRÄNKNER, C. et al. Targeted generation of polyploids in *Hydrangea macrophylla* through cross-based breeding. **BMC genetics**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2020.

VALLE, C. B.; GLIENKE, C.; LEGUISAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, Paris, v. 7, p. 42-43, 1994.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Eds.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 147-163.

VALLE, C. B.; MILES, J. W. Breeding of apomictic species. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J. G.; DRESSELHAUS, T. (eds.) **The flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering**. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DC VI (FAIR), 2001. p. 137-152.

VALLE, C. B. et al. **O Capim-Xaraés (*Brachiaria brizantha* cv. Xaraés) na Diversificação das Pastagens de Braquiária**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, Nov 2004. 36 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Documentos, 149).

VALLE, C. B. et al. *Brachiaria brizantha* cv. Piatã, uma forrageira para a diversificação de pastagens tropicais. **SEED NEWS**, Pelotas, v. 11(2), p. 28-30, 2007.

VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series**. Boca Raton: CRC, 2009. p. 103-151.

VALLE, C. B. et al. **BRS Ipyporã (" belo começo" em guarani): híbrido de *Brachiaria* da Embrapa**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Fev 2017. 18 p. (Comunicado Técnico, 137).

VELDKAMP, J. F. *Brachiaria, Urochloa* (Gramineae-Paniceae) in Malaysia. **Blumea - Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography**, Berlin, v. 41, p. 413-437, 1996.

VELDKAMP, J. F. Miscellaneous Notes on Mainly Southeast Asian *Gramineae*. **Reinwardtia**, Indonésia, v. 12, n. 2, p. 135-140, November 2004.

WEBSTER, R. D. **The Australian Paniceae (Poaceae)**. Stuttgart: J. Cramer, 1987. 322 p.

WEN, J. et al. Characterization of interploid hybrids from crosses between *Brassica juncea* and *B. oleracea* and the production of yellow-seeded *B. napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 19-32, February 2012.

WERLEMARK, G. et al. Studies of intersectional crosses between pentaploid dogrose species (*Rosa* sect. *Caninae* L.) as seed parents and tetraploid garden roses as pollen donors. **Floriculture and ornamental biotechnology**, v. 3, p. 21-27, 2009.

WORTHINGTON, M. et al. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1117-1132, July 2016.

WORTHINGTON, M. et al. Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-18, 2019.

ZHENG, Q. et al. Molecular cytogenetic characterization and stem rust resistance of five wheat– *Thinopyrum ponticum* partial amphiploids. **J. Genet. Genomics**, v. 41, p. 591–595, 2014.

ZIMMER, A. H. et al. **Considerações sobre índices de produtividade da pecuária de corte em Mato Grosso do Sul**. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 53 p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 70).

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - Hibridação interploide no Complexo '*brizantha*': identificação e caracterização citogenética*

*Artigo elaborado de acordo com a Norma NBR 6022 (ABNT, 2018)

RESUMO

A realização de cruzamentos entre genótipos sexuais de *U. ruziziensis* poliploidizados artificialmente e poliploides apomíticos de *U. decumbens* e *U. brizantha* é uma das estratégias do melhoramento de *Urochloa*. Os cruzamentos são realizados em policross, sem a emasculação prévia das plantas, de forma que a certificação dos híbridos e identificação dos doadores de pólen requer o uso de técnicas confiáveis, como os marcadores microssatélites. Informações como modo de reprodução, o número cromossômico e tamanho do genoma nuclear são também importantes na condução do melhoramento. O objetivo do estudo foi identificar os genitores masculinos de três potenciais híbridos com marcadores microssatélites; identificar o modo de reprodução através da amplificação do par de primers p779/p780; realizar contagens cromossômicas e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de DNA ribossomal (rDNA) e estimar o tamanho do genoma por citometria de fluxo. O híbrido 1F/21 é aneuploide, com $2n = 36+1$ cromossomos e 3,61 pg de DNA (valor 2C), resultante do cruzamento de *U. ruziziensis* ($2n = 4x = 36$) com *U. brizantha* cv. Marandu ($2n = 4x = 36$). Os híbridos 7F/153 ($2n = 40$ e $2C = 3,79$ pg) e 10F/v5 ($2n = 41$ e $2C = 3,88$ pg) provém de cruzamentos interploides, envolvendo *U. ruziziensis* ($2n = 4x = 36$) com genótipos pentaploide de *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$). Os três híbridos foram identificados como sexuais. O número dos sítios de rDNA foi determinado para as três famílias (parentais e híbridos) e indica um comportamento e herança dinâmico dessas sequências, embora a posição dos sítios nos cromossomos seja conservada. A identificação de híbridos interploides traz novas perspectivas para o melhoramento de *Urochloa*, com a possibilidade de explorar a variabilidade genética de outros poliploides apomíticos além dos tetraploides. Os resultados são promissores e evidenciam a necessidade de mais estudos sobre hibridação interploide em *Urochloa*.

Palavras-chave: *Brachiaria*. Marcador microssatélite. Tamanho do genoma. FISH. Aneuploidia. Poliploidia. Apomixia.

ABSTRACT

Crossing between artificially polyploidized sexual genotypes of *U. ruziziensis* and apomictic polyploids of *U. decumbens* and *U. brizantha* is one of the strategies for breeding *Urochloa*. The crosses are carried out in polycross, without prior emasculation of the plants, so that the certification of hybrids and identification of pollen donors requires the use of reliable techniques, such as microsatellite markers. Information such as mode of reproduction, chromosome number and nuclear DNA content are also important in conducting breeding. The aim of the study was to identify the male parents of three potential hybrids with microsatellite markers; identify the reproduction mode through the amplification of the p779/p780 primers pair; perform chromosome counts and fluorescent in situ hybridization (FISH) with ribosomal DNA (rDNA) probes and estimate genome size by flow cytometry. The 1F/21 hybrid is aneuploid, with $2n = 36+1$ chromosomes and 3.61 pg of DNA (2C value), resulting from the crossing of *U. ruziziensis* ($2n = 4x = 36$) with *U. brizantha* cv. Marandu ($2n = 4x = 36$). The hybrids 7F/153 ($2n = 40$ and $2C = 3.79$ pg) and 10F/v5 ($2n = 41$ and $2C = 3.88$ pg) are the result of interploid crosses involving *U. ruziziensis* ($2n = 4x = 36$) with pentaploid genotypes of *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$). The three hybrids were identified as sexual. The number of rDNA sites was determined for the three families (parental and hybrid) and indicates a dynamic behavior and inheritance of these sequences, although the position of the sites in the chromosomes is conserved. The identification of interploid hybrids brings new perspectives for the breeding of *Urochloa*, with the possibility of exploring the genetic variability of other apomictic polyploids besides tetraploids. The results are promising and highlight the need for further studies on interploid hybridization in *Urochloa*.

Keywords: *Brachiaria*. Microsatellite marker. Genome size. FISH. Aneuploidy. Polyploidy. Apomixis.

1 INTRODUÇÃO

A maior demanda por produtos agropecuários, esperada pelo constante crescimento populacional, tem sido acompanhada pela procura por sistemas mais sustentáveis. Nesse sentido, pastagens compostas por forrageiras melhoradas e adequadamente manejadas tendem a ser mais eficientes, uma vez que contribuem para o aumento da produtividade com menor uso de área (JANK et al., 2021). O gênero *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) compreende importantes forrageiras tropicais, como *Urochloa brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich.) RD Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster, *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C. M. Evrard) Crins e *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (FERREIRA et al., 2021). O bom rendimento, qualidade nutricional, adaptabilidade a solos de baixa fertilidade e tolerância ao pisoteio são algumas das características que garantiram a essas espécies posição de destaque no setor agropecuário (JANK et al., 2014; FERREIRA et al., 2021)

Programas de melhoramento de *Urochloa*, desenvolvidos desde 1980 em importantes instituições, como o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), têm contribuído com importantes incrementos para os sistemas pastoris. Apesar dos bons resultados, os programas de melhoramento do gênero são relativamente recentes e algumas características das espécies, como poliploidia e apomixia, acabam se tornando desafios adicionais aos melhoristas de *Urochloa* (FERREIRA et al., 2021; SIMEÃO et al., 2021).

Uma estratégia que possibilita explorar a variabilidade genética dos genótipos apomíticos é utilizá-los como doadores de pólen em cruzamentos com genótipos sexuais. Isso tem sido adotado especialmente no complexo agâmico ‘*brizantha*’ ($x = 9$), onde a poliploidização artificial de *U. ruziziensis*, naturalmente diploide e sexual, produziu genótipos tetraploides sexuais ($2n = 4x = 36$) (SWENNE; LOUANT; DUJARDIN, 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014a), possibilitando o cruzamento com aloploidios apomíticos de *U. brizantha* e *U. decumbens* (RISSO-PASCOTTO et al., 2005; MENDES-BONATO; PAGLIARINI; VALLE, 2007).

O primeiro híbrido interespecífico de *Urochloa* disponibilizado foi a cultivar Mulato (CIAT 36061), obtido a partir do cruzamento entre *U. ruziziensis* ($4x$) e *U. brizantha* cv. Marandu ($4x$) (ARGEL et al., 2006). Posteriormente, o CIAT lançou a cultivar Mulato II, resultado de três ciclos de seleção, iniciado com o cruzamento entre *U. ruziziensis* ($4x$) e *U.*

decumbens (4x) (ARGEL et al., 2007). Em 2017, a Embrapa produziu a cultivar híbrida BRS Ipyporã (*U. ruziziensis* 4x x *U. brizantha* 4x) que apresenta, além da resistência às cigarrinhas, um ótimo valor nutritivo (VALLE et al., 2017). Diversos outros híbridos são produzidos e constantemente avaliados pelos centros de pesquisa e instituições parceiras.

No gênero, uma limitação para o melhoramento via hibridação é a identificação efetiva dos híbridos, uma vez que não se faz emasculação prévia ao cruzamento e, portanto, algumas plantas da progênie podem ser resultantes de autofecundação (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Além disso, os cruzamentos, muitas vezes, são realizados por polinização aberta em blocos de policruzamentos (VALLE; MILES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009). A adoção de métodos seguros para a certificação dos híbridos e identificação dos parentais masculinos envolvidos nos cruzamentos beneficiaria a condução do programa de melhoramento.

Os marcadores microssatélites amplificam repetições de sequência simples (SSRs) do DNA e se destacam por serem marcadores altamente polimórficos, com boa reprodutibilidade, abundância relativa e extensa cobertura genômica (POWELL et al., 1996; KALIA et al., 2011). Diversos marcadores microssatélites já foram descritos e avaliados em espécies de *Urochloa* (JUNGMANN, 2009ab; VIGNA et al., 2011ab; SILVA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016; TRIVIÑO et al., 2017), mas ainda não haviam sido usados para a análise de paternidade no complexo '*brizantha*'.

O modo de reprodução da descendência dos cruzamentos também é uma informação importante, pois define o uso do genótipo no programa de melhoramento, seja como uma população sexual para cruzamentos ou como potencial cultivar apomítica (VALLE e MILES, 2001). Recentemente, Worthington et al. (2016, 2019) demonstraram que o par de primers p799/p780, desenvolvido para a região genômica específica da aposporia (ASGR) (AKIYAMA et al., 2011), foi eficiente em diagnosticar o modo reprodutivo de várias espécies e híbridos de *Urochloa*.

Ao considerar a poliploidia e ampla variação no número cromossômico dos genótipos de *Urochloa* (PENTEADO et al., 2000; VALLE; PAGLIARINI, 2009), a citogenética é outro fator muito importante no estudo deste gênero e mostra-se crucial em todas as etapas de melhoramento, inclusive pós hibridação. Recentemente, análises citogenéticas identificaram híbridos aneuploides do cruzamento de *U. ruziziensis* (4x) com *U. decumbens* e *U. brizantha* (ambas 4x) (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; MORAES et al., 2019; ROCHA et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar o parental masculino de três potenciais híbridos de *Urochloa* via marcadores SSRs, além de caracterizar o número cromossômico, quantidade de DNA nuclear e modo de reprodução dos genótipos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

A análises foram realizadas com os genótipos doados pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, constituídos por três potenciais híbridos, seus respectivos genitores femininos e três possíveis doadores de pólen (TABELA 1). Os híbridos foram obtidos por polinização aberta em blocos de policruzamento e, portanto, os genitores masculinos eram desconhecidos.

Clones obtidos por propagação vegetativa de perfilhos de cada genótipo foram mantidos em vasos em casa de vegetação no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG, sob condições ambientais semelhantes (temperatura, umidade, fotoperíodo, irrigação, adubação).

Tabela 1 - Genótipos das espécies e híbridos de *Urochloa* utilizados no estudo.

Identificação	Genótipo	Descrição
1M	<i>U. ruziziensis</i> 4x	genitor feminino
7M	<i>U. ruziziensis</i> 4x	genitor feminino
10M	<i>U. ruziziensis</i> 4x	genitor feminino
1F/21	híbrido	1M x (*)*
7F/153	híbrido	7M x (*)*
10F/v5	híbrido	10M x (*)*
cv. Marandu	<i>U. brizantha</i> 4x	doador de pólen
genótipo 2	<i>U. brizantha</i> 5x	doador de pólen
cv. Xaraés	<i>U. brizantha</i> 5x	doador de pólen

Legenda: *genitor masculino desconhecido

Fonte: Do autor (2022).

2.2 Certificação da paternidade via marcadores SSR

Dezessete marcadores SSRs (TABELA S1) descritos na literatura e que apresentavam transferência certificada para, pelo menos, uma das espécies foram testados (JUNGMANN et al., 2009ab). Para cada reação foi usado 50 ng de DNA genômico, 0,4 μ M de cada primer, 1X de Master mix CellCo (2X) e água para completar o volume final de 25 μ L. O termociclador foi ajustado para uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida por 35 ciclos de amplificação [95 °C por 30 s, temperatura de anelamento específica de cada primer (TABELA S1) por 50 s e 72 °C por 1 min e 20 s] e um passo final de extensão a 72 °C, por 7 min. Os produtos de amplificação foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 3% e, quando necessário, em gel de agarose MetaPhor® 3%, seguindo as recomendações do fabricante (Lonza Rockland, Inc.). O tamanho dos produtos foi determinado por comparação com o Ladder de 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA). Devido a poliploidia de *Urochloa*, adotou-se como critério classificar cada banda SSR como ausente ou presente, similar a um marcador dominante.

2.3 Identificação do modo de reprodução com primer ASGR-BBML p779/p780

Para identificação do modo de reprodução dos genótipos foi usado o par de primers p779/p780, que amplificam a região genômica específica da aposporia (ASGR-BBML) (AKIYAMA et al., 2011). Como controle positivo, as reações de PCR também foram realizadas usando o par de primers ITS-F/ITS-R, desenhado para a região do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico (rDNA) (TABELA S1). As condições de amplificação foram semelhantes às descritas anteriormente e os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%.

2.4 Conteúdo de DNA nuclear

Amostras de tecido foliar jovem de cada genótipo (20-30 mg) foram maceradas com a mesma quantidade de *Pisum sativum* (padrão interno de referência, valor 2C = 9,09 pg) em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado (DOLEŽEL; BINAROVÁ; LUCRETTI, 1989). A suspensão nuclear foi corada com 25 μ L de iodeto de propídeo (1 mg/mL) e, pelo menos, 10.000 núcleos/amostra foram quantificados em citômetro Facscalibur

(Becton Dickinson). Histogramas foram obtidos usando software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.8 (<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/software/Winmdi.htm>). O tamanho médio do genoma foi estimado em pg, considerando 3 repetições/genótipo, e comparados pelo teste Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5% de probabilidade, usando o software Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.5 Preparações cromossômicas e hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para a obtenção de c-metáfases, pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com solução de ciclohexamida (88,9 μ M) e APM (amiprofos-methyl, 4 μ M), por 2 horas, em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, o material foi fixado em solução de metanol: ácido acético (3:1) por 24 horas, em RT e armazenadas em etanol 90%, a -20 °C. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram excisados e submetidos à digestão enzimática em mix contendo celulase Onozuka R10 0,7%, celulase 0,7%, pectoliase 1% e citohelicase 1%, por aproximadamente 1 h e 40 min, a 37 °C. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação de células e secagem ao ar (FUKUI; NAKAYAMA, 1996).

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com sondas para as sequências de rDNA 35S (pTa71) e 5S (primers RICRGAC1/RICRGAC2, TABELA S1), marcadas com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-12-dUTP via *nick translation* e PCR, respectivamente. A preparação cromossômica foi desnaturada em formamida 70% (SSC 2x, NaCl/ Citrato Trissódico) por 1 min e 10 s a 85 °C, seguido de desidratação em série alcoólica (70%, 90% e 100%). A mistura de hibridização (formamida 50%, sulfato de dextran 10%, SSC 2x, 50-100 ng de sonda) foi desnaturada por 8 min, a 95 °C e transferida imediatamente para o gelo. A hibridização ocorreu por 40-48 horas em câmara úmida, a 37 °C. A detecção da sonda foi feita com antidigoxigenina conjugada com rodamina e estreptavidina conjugada com Alexa fluor 488 a 37 °C por 1 h, após lavagens de estringência em tampão SSC 2x a 42 °C.

Os cromossomos foram contrastados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) em meio de montagem Vectashield Antifade (1,5 μ g/mL). Para cada genótipo, pelo menos, 10 metáfases foram avaliadas e capturadas por câmera QImaging Retiga EXi CCD acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60. As imagens foram processadas com auxílio de software para edição de imagens.

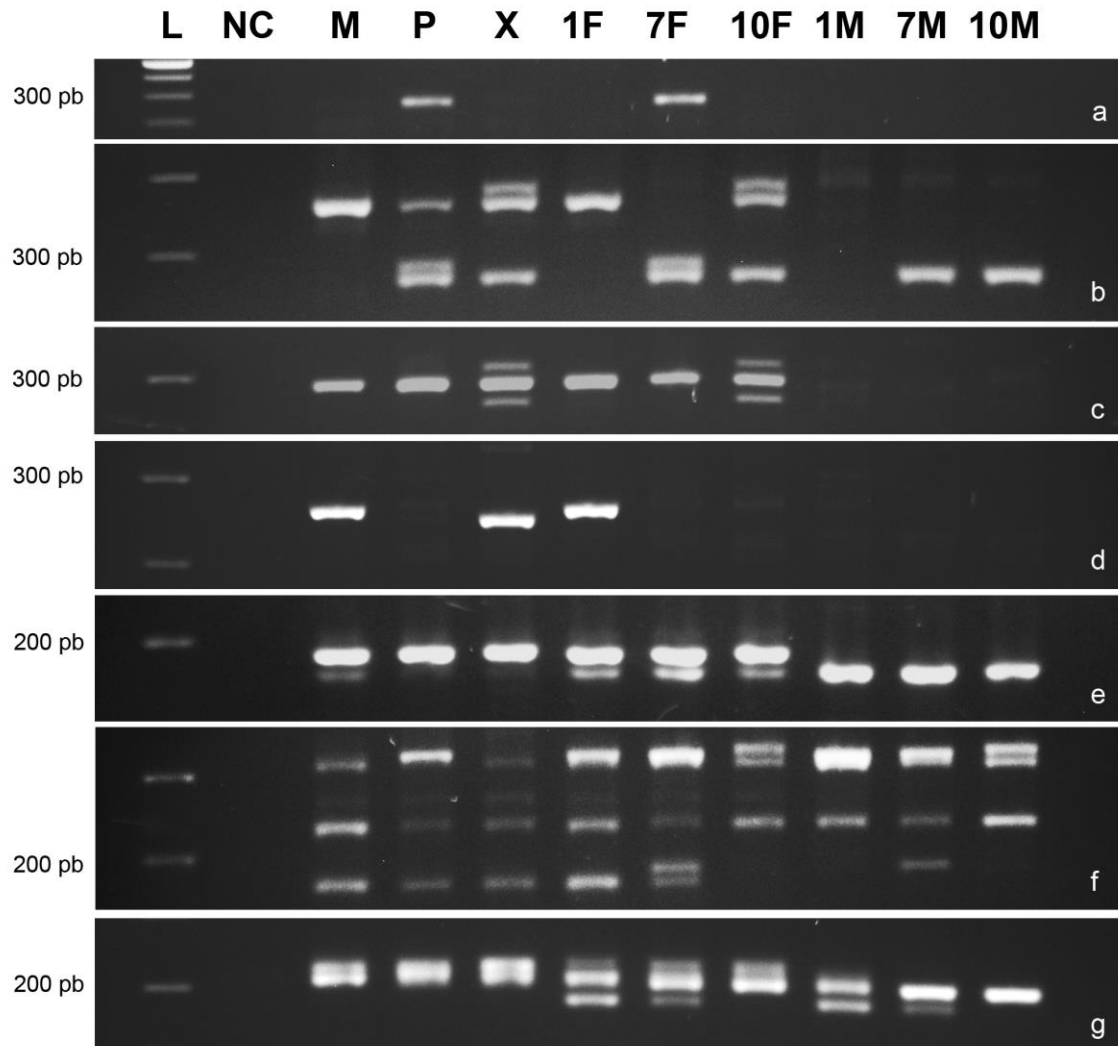
3 RESULTADOS

3.1 Análise de paternidade e diagnóstico do modo de reprodução

Dos dezessete marcadores SSRs testados (TABELA S1), sete geraram polimorfismos e, portanto, foram considerados informativos para o nosso estudo (FIGURA 1). Os primers BhUNICAMP004 (FIGURA 1a) e BhUNICAMP015 (FIGURA 1b) produziram marcas polimórficas no genótipo 2 de *U. brizantha* e no híbrido 7F/153, mas não estavam presentes no genitor materno 7M (*U. ruziziensis*), indicando o respectivo genótipo como o doador de pólen. Os primers BhUNICAMP015 (FIGURA 1b) e BbUNICAMP001 (FIGURA 1c), por sua vez, formaram marcas polimórficas no híbrido 10F/v5 e na cultivar Xaraés (*U. brizantha*), identificando-a como o parental envolvido na formação desse híbrido. A cultivar Marandu de *U. brizantha* foi identificada (FIGURA 1d) como parental masculino do híbrido 1F/21 baseado no padrão de marcas obtidas com o primer BbUNICAMP013 (FIGURA 1d). Os primers BhUNICAMP005, BhUNICAMP018 e BbUNICAMP004, apesar de não produzirem polimorfismos entre os possíveis doadores de pólen, certificaram a condição híbrida dos genótipos 1F/21, 7F/153 e 10F/v5, uma vez que produziram marcas polimórficas entre genitores femininos e masculinos que estavam presentes no descendente (FIGURA 1e-g).

Oito primers (BhUNICAMP003, BbUNICAMP002, BbUNICAMP003, BbUNICAMP005, BbUNICAMP006, BbUNICAMP009, BbUNICAMP010 e BbUNICAMP012) apresentaram boa amplificação, mas não formaram marcas polimórficas conclusivas entre os genótipos envolvidos. Outros dois primers (BhUNICAMP020 e BbUNICAMP011) não amplificaram ou apresentaram amplificação inespecífica.

Figura 1 - Produtos polimórficos amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) com marcadores microsatélites em genótipos de *Urochloa*.

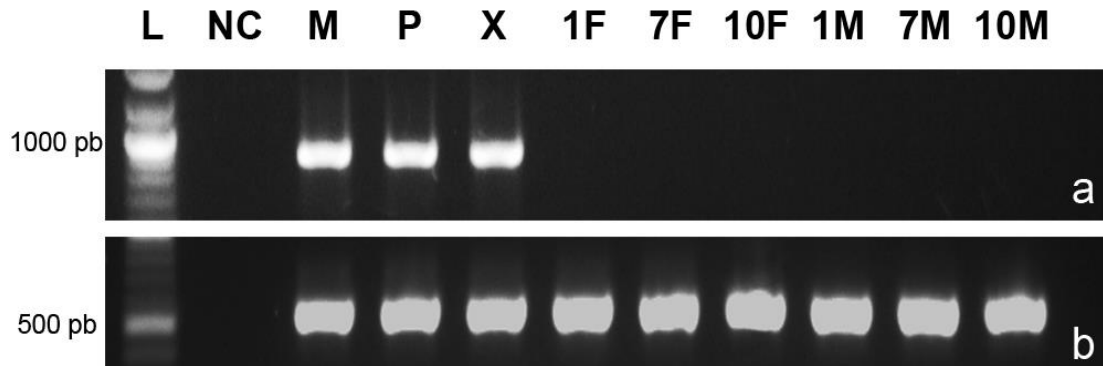


Legenda: L, ladder; NC, controle negativo; M, *U. brizantha* cv. Marandu; P, *U. brizantha* genótipo 2; X, *U. brizantha* cv. Xaraés; 1F, híbrido 1F/21; 7F, híbrido 7F/153; 10F, híbrido 10F/v5; 1M, *U. ruziziensis* 1M; 7M, *U. ruziziensis* 7M; 10M, *U. ruziziensis* 10M.

Fonte: Do autor (2022).

Todos os genótipos amplificaram a região ITS do DNA ribossômico, produzindo um fragmento de aproximadamente 550 pb (FIGURA 2b) e ratificando que os DNAs genômicos estavam aptos para a verificação do marcador da aposporia p779/780. O par de primers p779/p780 produziu uma marca específica nos três genótipos apomíticos de *U. brizantha*, mas não amplificou nos parentais reconhecidamente sexuais de *U. ruziziensis* e também nos híbridos interespecíficos, indicando o modo de reprodução sexual nas F1 (FIGURA 2a).

Figura 2 - Produtos amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos marcadores p779/p780 (a) e ITS (b) em genótipos de *Urochloa*.



Legenda: L, ladder; NC, controle negativo; M, *U. brizantha* cv. Marandu; P, *U. brizantha* genótipo 2; X, *U. brizantha* cv. Xaraés; 1F, híbrido 1F/21; 7F, híbrido 7F/153; 10F, híbrido 10F/v5; 1M, *U. ruziziensis* 1M; 7M, *U. ruziziensis* 7M; 10M, *U. ruziziensis* 10M.

Fonte: Do autor (2022).

3.2 Conteúdo de DNA nuclear, número cromossômico e sítios de DNA ribossômico

Os três genótipos de *U. ruziziensis* tetraploides artificiais ($2n = 4x = 36$ cromossomos), foram alocados no mesmo grupo estatístico para a quantidade de DNA (TABELA 2, FIGURA S1). Os genótipos de *U. brizantha* diferiram para a quantidade de DNA (TABELA 2). As contagens cromossômicas confirmaram $2n = 4x = 36$ cromossomos para a cv. Marandu e $2n = 5x = 45$ para a cv. Xaraés, e identificaram $2n = 5x = 45$ para o genótipo 2. O híbrido 1F/21 foi identificado como aneuploide ($2n = 4x = 36+1$) e diferiu estatisticamente dos demais híbridos, com menor quantidade de DNA. (TABELA 2, FIGURA 3d). Os híbridos interploides 7F/153 e 10/v5 apresentaram $2n = 40$ cromossomos e $2n = 41$ cromossomos, respectivamente.

Tabela 2 - Tamanho do genoma, número cromossômico e número de sítios de DNA ribossomal dos genótipos de *Urochloa*

Genótipo	Valor 2C (pg)*	Valor Cx (pg)	Ploidia	Número de cromossomos (2n)	Sítios de rDNA	
					35s	5s
<i>U. ruziziensis</i> 1M	3,13 ^a	0,78	4x	36	4	8
<i>U. ruziziensis</i> 7M	3,07 ^a	0,77	4x	36	4	8
<i>U. ruziziensis</i> 10M	3,20 ^a	0,80	4x	36	6	8
Híbrido 1F/21	3,61 ^c	0,90	4x	37	5	7
Híbrido 7F/153	3,79 ^d	-	interploide	40	3	6

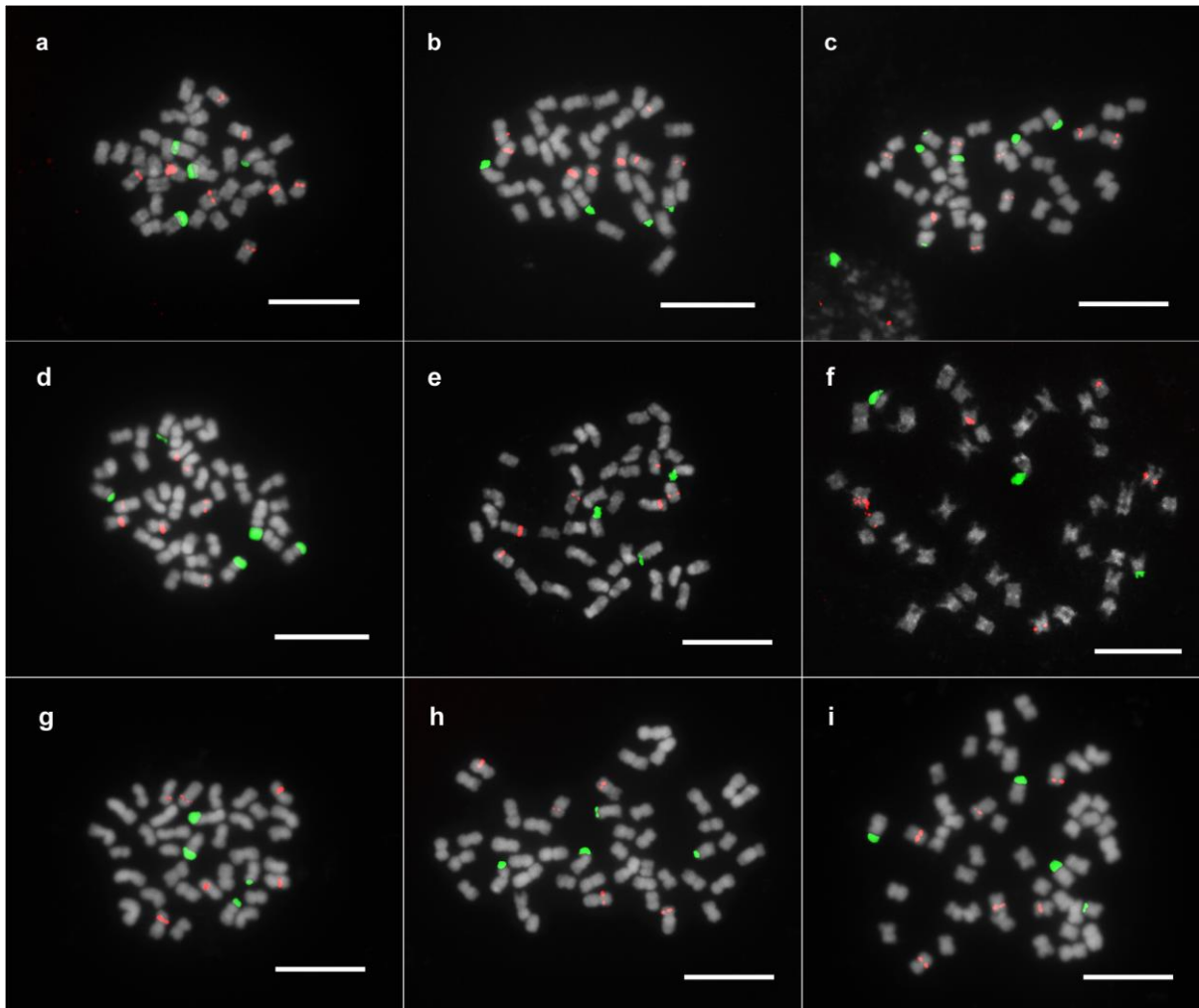
Híbrido 10F/v5	3,88 ^d	-	interploide	41	3	6
<i>U. brizantha</i> cv. Marandu	3,44 ^b	0,86	4x	36	4	6
<i>U. brizantha</i> genótipo 2	4,27 ^e	0,85	5x	45	4	5
<i>U. brizantha</i> cv. Xaraés	4,45 ^f	0,89	5x	45	4	6

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2022).

A FISH para ambas as sondas ribossomais revelaram variações em relação ao número de sítios entre os híbridos e parentais avaliados. *U. ruziziensis* (10M) e os três híbridos divergiram dos demais genótipos para os sítios de rDNA 35S. Em relação aos sítios de rDNA 5S, o número foi igual entre os três genótipos de *U. ruziziensis*, mas variou entre os híbridos e entre os genótipos de *U. brizantha* (TABELA 1 e FIGURA 3). Em contrapartida, a posição dos sítios ribossomais foi conservada no complemento cromossômico de todos os genótipos. Os sítios de rDNA 35S e 5S foram localizados em posição terminal e intersticial/intersticial-proximal, respectivamente (FIGURA 3).

Figura 3 - Localização dos sítios de rDNA 35S (verde) e 5S (vermelho) em cromossomos metafásicos de parentais e híbridos de *Urochloa*.



Legenda: *U. ruziziensis*: a) 1M; b) 7M; c) 10M. Híbridos: d) 1F/21; e) 7F/153; f) 10F/v5. *U. brizantha*: g) cv. Marandu; h) genótipo 2; i) cv. Xaraés; Barra: 10 μ m.

Fonte: Do autor (2022).

4 DISCUSSÃO

4.1 Cruzamentos interploides e as novas possibilidades para o melhoramento de *Urochloa*

Os marcadores SSRs utilizados em nosso estudo foram eficientes em certificar a hibridação e identificar os parentais masculinos envolvidos nos cruzamentos. No melhoramento de *Urochloa*, a identificação dos híbridos geralmente é baseada em diferenças fenotípicas contrastantes dos parentais e que se mostrem de forma intermediária nos híbridos (VALLE; MILES, 2001). Como a quantidade de marcadores morfológicos não é tão grande,

além dessas características muitas vezes não serem muito estáveis, essa tem sido uma tarefa laboriosa e pouco acurada, especialmente entre as espécies do complexo '*brizantha*', que são filogeneticamente próximas (TRIVIÑO et al., 2017; PESSOA-FILHO et al., 2017) e foram alocadas no mesmo grupo taxonômico a partir da análise da morfologia das inflorescências e panículas (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

O melhoramento de *Urochloa* via hibridação requer o uso de métodos seguros para a identificação efetiva dos híbridos. Os marcadores moleculares constituem uma importante ferramenta, pois permitem acessar diretamente o genótipo da planta, não estão sujeitos aos efeitos ambientais e possibilitam análise precoce e rápida dos materiais (KORDROSTAMI; RAHIMI, 2015). Em particular, os microssatélites possuem potencial para definir genótipos únicos, consistindo em excelentes marcadores para estudos de certificação de híbridos e genotipagem (POWELL et al., 1996; KALIA et al., 2011), já empregados em diferentes espécies de importância econômica, como o arroz (SUNDARAM et al., 2008), citrus (OLIVEIRA et al., 2002) e algodão (SELVAKUMAR et al., 2010).

Apesar do número relativamente baixo de marcadores possibilitar a identificação do doador de pólen nos híbridos avaliados, alguns primers podem perder sua assertividade em alguns genótipos. Nesse sentido, é desejável a disponibilidade de um número maior de marcadores SSRs para um dado objetivo. Diversos marcadores microssatélites desenvolvidos para *Urochloa* estão disponíveis na literatura (JUNGMANN, 2009ab; VIGNA et al., 2011ab; SILVA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016; TRIVIÑO et al., 2017) e podem facilitar o trabalho de certificação de híbridos e identificação das combinações parentais desejadas pelos programas de melhoramento. Mesmo apresentando vantagens reconhecidas, o êxito na obtenção de marcas polimórficas não depende somente dos primers SSRs, mas também de ajustes nas suas sequências ou na própria reação de PCR.

O número cromossômico e o conteúdo médio de DNA nuclear estimado para os parentais e híbridos corroboram os resultados obtidos com os marcadores SSRs e evidenciam a ocorrência de cruzamentos envolvendo parentais tetraploides e pentaploides nas formações dos híbridos 7F/153 e 10F/v5. Nossos resultados sugerem a fusão de gametas com 18 cromossomos de *U. ruziziensis* (7M e 10M) e 22 de *U. brizantha* genótipo 2 ou 23 cromossomos de *U. brizantha* cv. Xaraés na formação dos híbridos 7F/153 e 10F/v5, com 40 e 41 cromossomos, respectivamente. Esta suposição é baseada nas informações adquiridas até o momento e confirmada para o híbrido 7F/153 por meio da hibridização *in situ* genômica (GISH) (MORAES et al., dados não publicados - artigo 2). A aplicação da GISH nos outros

híbridos e parentais pode elucidar ainda mais sobre a composição genômica e herança de cromossomos envolvendo espécies do complexo *brizantha*.

A formação de híbridos a partir de cruzamentos interploides também foi relatada em estudos anteriores em *Brassica* (WEN et al., 2012), trigo (PADMANABAN et al., 2017) e morango (LUO et al., 2017). No próprio gênero *Urochloa*, Hacker (1988) relatou a obtenção de um híbrido intraespecífico triploide a partir do cruzamento entre citótipos diploides e tetraploides de *U. decumbens*. Nitthaisong et al. (2019) produziram híbridos triploides ao cruzar *U. ruziziensis* diploide com os tetraploides apomíticos *U. decumbens* e *U. brizantha*.

A confirmação da efetividade dos dois cruzamentos envolvendo pentaploides como parentais masculinos criam possibilidades aos melhoristas de *Urochloa*, que podem explorar a variabilidade genética do complexo ‘*brizantha*’ para além dos tetraploides apomíticos. O germoplasma de *U. brizantha* possui um número significativo de acessos pentaploides e hexaploides (PENTEADO et al., 2000), que poderiam ser explorados em cruzamentos interploides como estratégia para ampliar a variabilidade genética do complexo agâmico. Em *Brassica*, híbridos interespecíficos interploides foram utilizados como ponte para a transferência de características, como a coloração amarela da semente para *Brassica napus* (WEN et al., 2012). Luo et al. (2017) identificaram híbridos de morango para resistência ao frio a partir do cruzamento entre espécies octaploide e dodecaploide. Padmanaban et al. (2017) relataram a formação de híbridos de trigo pentaploides (*Triticum aestivum* 6x x *T. durum* 4x), os quais resultaram em progênie com constituições cromossômicas únicas e com potencial de melhorar várias características importantes.

Além dos híbridos interploides (7F/153 e 10F/v5), nossas análises identificaram aneuploidia no híbrido 1F/21, apesar da sua origem envolver parentais como mesmo nível de ploidia. A detecção de aneuploidias nesse gênero tem sido recorrente e foi relatada em estudos anteriores dentro do complexo ‘*brizantha*’ (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017, 2017; MORAES et al., 2019; ROCHA et al., 2019) e ‘*humidicola*’ (TOMASZEWSKA et al., 2021; DAMASCENO et al. dados não publicados)

Em algumas espécies, a aneuploidia tem sido usada como uma estratégia para o mapeamento genético e formação de linhas de adição ou substituição visando a introgressão de características de interesse (HUMPHREYS; CANTER; THOMAS, 2003; MOLNÁR-LÁNG et al., 2015). Em *Urochloa*, a identificação dos aneuploides é recente e, antes de serem incorporados ao melhoramento, é fundamental o aprofundamento dos estudos citogenéticos e genômicos, avaliação e monitoramento da estabilidade dos híbridos e comparação agrônômica

de performance e produtividade com os híbridos euploides. Também é interessante avaliar a meiose dos parentais, a fim de elucidar os aspectos envolvidos com a formação de gametas aneuploides. O parental do híbrido 7F/153 (*U. brizantha* genótipo 2) produziu gametas balanceados e viáveis, mesmo apresentando anormalidades meióticas (MORAES dados não publicados, artigo 2). Nos híbridos aneuploides avaliados por Paula, Souza-Sobrinho e Techio (2017) e Moraes et al. (2019), *U. ruziziensis* foi identificada como o provável genitor responsável pela trissomia e trissomia dupla observadas.

A determinação do modo de reprodução sexual para os três híbridos interespecíficos é uma informação importante para o programa de melhoramento genético, uma vez que eles podem ser autofecundados ou retrocruzados com os parentais. As progênes apomíticas, por sua vez, podem ser avaliadas como potenciais cultivares (VALLE; MILES, 2001). É fundamental avaliar a meiose e viabilidade polínica dos híbridos, a fim de certificar a fertilidade desses genótipos para futuros cruzamentos. Também é necessário avaliar os caracteres agrônômicos e determinar potenciais melhorias que podem ser incrementadas no germoplasma de *Urochloa*. Por fim, é importante que as progênes subsequentes também sejam avaliadas para o modo de reprodução e citogenética, pois certa instabilidade cromossômica é esperada ao longo das gerações em genótipos sexuais com números cromossômicos aneuploides. Os apomíticos tendem a contornar possíveis problemas decorrentes da aneuploidia, entretanto grãos de pólen viáveis são necessários para a formação de sementes viáveis devido à pseudogamia.

Os marcadores moleculares utilizados no presente estudo representam importantes ferramentas para a certificação híbrida, identificação dos genitores masculinos e diagnóstico do modo reprodutivo de híbridos no melhoramento de *Urochloa*, uma vez que podem viabilizar as avaliações de um maior número de genótipos, em um menor período de tempo e com custo reduzido, características consideradas vantajosas para um programa de melhoramento.

4.2 Número cromossômico dos parentais e sítios de DNA ribossomal

Estudos anteriores já haviam descrito dados cariotípicos sobre as espécies, cultivares e híbridos com relatos sobre o número cromossômico e/ou sítios de rDNA (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NIELEN et al., 2010; NANI et al., 2016; PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017). Entretanto, a

identificação recorrente de híbridos aneuploides, remeteu à necessidade de investigar as características citogenéticas comparativas em nível de família (parentais e respectivos híbridos), visando identificar a herança dos cromossomos extras e avaliar o comportamento e estabilidade desses cromossomos. Outro fator fundamental foi avaliar o efeito dos parentais na composição genética/cromossômica dos híbridos, tendo em vista que outros genótipos de *U. ruziziensis* (parental feminino) foram avaliados por Paula, Souza-Sobrinho e Techio (2017).

O número cromossômico ($2n = 36$ cromossomos) dos genitores femininos (1M, 7M e 10M) corresponde a *U. ruziziensis* tetraploidizada sinteticamente (ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014a). Para *U. brizantha*, vários estudos anteriores relataram a ocorrência da série poliploide, com citótipos diploides, tetraploides, pentaploides e hexaploides (PENTEADO et al., 2000; MENDES-BONATO et al., 2002; RISSO-PASCOTTO et al. 2003; TOMASZEWSKA et al., 2021).

As contagens cromossômicas ($2n = 36$) e tamanho do genoma reavaliados neste estudo para a cultivar Marandu ratificaram as informações obtidas anteriormente para tetraploides de *U. brizantha* (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NIELEN et al., 2010; TIMBÓ et al., 2014b; NANI et al., 2016; NITTHAISONG et al., 2016). O genótipo 2 e a cultivar Xaraés apresentaram número cromossômico compatível com o nível pentaploide (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010). Apesar da tetraploidia ser predominante em *Urochloa*, a pentaploidia foi o segundo nível de ploidia mais frequente (18,5%) identificado em *U. brizantha* em uma amostra de 222 acessos (PENTEADO et al., 2000). Os valores de tamanho do genoma nuclear estimados aqui para ambos os genótipos pentaploides corroboram uma descrição anterior de outro citótipo pentaploide de *U. brizantha* (MORAES et al., 2021).

A FISH de ambas as sondas de DNA ribossomal revelou algumas variações nas espécies avaliadas em comparação com descrições anteriores. Os genótipos de *U. ruziziensis* avaliados em nosso estudo apresentaram dois sítios adicionais de rDNA 5S comparado com o relato de Paula; Souza-Sobrinho e Techio (2017), mas compatível com a duplicação dos quatro sítios de rDNA 5S das plantas diploides (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NANI et al., 2016). O genótipo 10M apresentou um par de sítios de rDNA 35S adicional ao dos outros dois genitores e de outro tetraploide avaliado por Paula, Souza-Sobrinho e Techio (2017). Os seis sítios de rDNA 35S também extrapolam o resultado

geralmente esperado de duplicação dos dois sítios de rDNA 35S identificados nos diploides da espécie (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NANI et al., 2016).

Para a cultivar Marandu, o número de sítios de rDNA está de acordo com o relatado por Nielen et al. (2010) e Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010). No entanto, alguns estudos relatam variação no número de sítios de rDNA intracultivar (NANI et al., 2016) e entre diferentes citótipos tetraploides de *U. brizantha* (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010). Para os pentaploides, o número de sítios de rDNA difere de descrições anteriores, que identificaram cinco sítios de ambos rDNAs na cv. Xarões (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010) e cinco sítios de rDNA 35S e oito sítios de rDNA 5S em outro citótipo pentaploide (MORAES et al., 2021).

A variação de sítios de rDNA tem sido relacionada com a ocorrência de elementos transponíveis próximos ou dispersos nos loci de rDNA, o que aumentaria a possibilidade de rearranjos cromossômicos (RASKINA et al., 2008). Além disso, o caráter repetitivo dos loci de rDNA e sua organização no genoma podem fornecer oportunidades frequentes para eventos de recombinação ectópica, o que pode levar a variações no tamanho do locus, número e distribuição dos sítios (GOFFOVÁ; FAJKUS, 2021).

A aloploidia proposta para os citótipos tetraploides e pentaploides de *U. brizantha* (NIELEN et al., 2010; PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; MORAES et al., 2021) também pode estar relacionada aos frequentes relatos de variação de sítios de rDNA. Com o modo de reprodução apomítico sendo característico dos citótipos poliploides de *U. brizantha*, a apomixia poderia atuar fixando as variações cariotípicas formadas. Macháčková et al. (2022) sequenciaram a região ITS de táxons sexuais e apomíticos de *Taraxacum* e identificaram a ocorrência de poucas variantes nos táxons sexuais, enquanto os táxons apomíticos apresentaram um número significativo de variantes. Adicionalmente, o número de sítios de rDNA 35S dos híbridos difere do que seria esperado considerando o número de sítios dos parentais e demonstra uma herança dinâmica dessas sequências.

O padrão de distribuição dos sítios de rDNA 35S e 5S apresentado pelos genótipos corrobora relatos anteriores que envolvem espécies do complexo *brizantha* (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NIELEN et al., 2010; NANI et al., 2016; PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; MORAES et al., 2021; TOMASZEWSKA et al., 2021). O posicionamento preferencial do rDNA 35S na região terminal dos cromossomos é uma tendência em angiospermas, enquanto os sítios de rDNA 5S tem uma distribuição mais

variável, com relatos frequentes em regiões intersticiais (ROA; GUERRA, 2012; ROA; GUERRA, 2015; GARCIA et al., 2017).

Comparativamente, os genótipos avaliados nesse estudo apresentaram número de locus de rDNA 5S superior ao rDNA 35S, diferindo da relação identificada por Garcia et al. (2017) para a maioria das plantas. Situação semelhante foi observada em *Taraxacum* em que a maioria dos táxons apresentou um locus de rDNA 35S para dois loci de rDNA 5S por complemento monoploide (MACHÁČKOVÁ et al., 2022).

Alguns estudos também indicaram uma tendência nos poliploides de redução no número de sítios por complemento monoploide com o aumento do nível de ploidia (ROA, GUERRA, 2012; GARCIA et al., 2017). Nossos resultados indicam que *U. brizantha* pode apresentar esse padrão, uma vez que os genótipos pentaploides apresentaram o mesmo número de sítios de rDNA 35S e 5S, este último inclusive com redução, comparado com a cultivar tetraploide Marandu. Ao considerar apenas o número de sítios de rDNA 35S por complemento monoploide, *U. brizantha* cv. Marandu apresenta 1 x 35S, enquanto os pentaploides apresentam 0,8 x 35S, ou seja, possuem menos que um sítio de rDNA 35S por complemento monoploide. Estudos futuros envolvendo citótipos de *U. brizantha* com outros níveis de ploidia, como diploides e hexaploides, e mesmo outros genótipos tetraploides e/ou pentaploides podem esclarecer os aspectos relacionados a variação dos sítios de rDNA e possíveis padrões cariotípicos.

5 CONCLUSÕES

Os marcadores microsatélites foram eficientes em determinar os doadores de pólen de 3 cruzamentos e identificaram *U. brizantha* cv. Marandu, *U. brizantha* genótipo 2 e *U. brizantha* cv. Xarões como genitores masculinos do híbrido 1F/21, 7F/153 e 10F/v5, respectivamente.

Os três híbridos avaliados apresentam modo de reprodução sexual. O híbrido 1F/21 apresentou aneuploidia, com $2n = 4x = 36+1$ cromossomos, enquanto os híbridos 7F/153 e 10F/v5 são interploides, resultantes de cruzamentos entre tetraploides e pentaploides, e possuem $2n = 40$ e $2n = 41$ cromossomos, respectivamente.

O número de sítios de rDNA dos parentais e híbridos indicam um comportamento e herança dinâmico, enquanto a posição dos sítios nos cromossomos é conservada dentro do complexo *brizantha*.

REFERÊNCIAS

- AKIYAMA, Y.; YAMADA-AKIYAMA, H.; EBINA, M. Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. **Grassl. Sci.**, Nova Jersey, v. 56, p. 217-223, December 2010.
- AKIYAMA, Y. et al. Evolution of the apomixis transmitting chromosome in *Pennisetum*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 1-16, Oct 2011.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato (*Brachiaria* híbrida CIAT 36061)**: Gramínea de alta produção e qualidade forrageira para os trópicos. Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2006. 26 p.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato II (*Brachiaria* híbrida CIAT 36087)**: Gramínea de alta qualidade e produção forrageira, resistente às cigarrinhas e adaptada a solos tropicais ácidos. Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2007. 22 p.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios Journal**, Cambridge, v. 104, p. 157-171, January 2001.
- DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of Nuclear DNA Content in Plant Cells by Flow Cytometry. **Biologia plantarum**, Praga, v. 31, n. 2, p. 113-120, 1989.
- DOLEŽELOVÁ, M. et al. Physical mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal RNA genes in diploid bananas. **Biologia Plantarum**, v. 41, n. 4, p. 497-505, 1998.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Case Study B5.5 - 'Nutrient pumps' feed cattle, nourish maize. Adaptado de: Save and Grow in practice: maize, rice, wheat. A guide to sustainable cereal production. 2016. 2p.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, Dec 2011.
- FERREIRA, R. C. U et al. Microsatellite loci for *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster and cross-amplification in other *Urochloa* species. **BMC research notes**, v. 9, n. 1, p. 1-11, March 2016.
- FERREIRA, R. C. U. et al. An Overview of the Genetics and Genomics of the *Urochloa* Species Most Commonly Used in Pastures. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 770461, 22p., December 2021.
- FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC Press, 1996. 288p.
- GARCIA, S. et al. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. **The Plant Journal**, v. 89, n. 5, p. 1020-1030, March 2017.

- GOFFOVÁ, I.; FAJKUS, J. The rDNA loci—intersections of replication, transcription, and repair pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1302, 2021.
- HACKER, J. B. Sexuality and hybridization in signal grass, *Brachiaria decumbens*. **Tropical Grasslands**, Australia, v. 22, n. 3, p. 139-144, 1988.
- HUMPHREYS, M. W.; CANTER, P. J.; THOMAS, H. M. Advances in introgression technologies for precision breeding within the *Lolium - Festuca* complex. **Ann. appl. Biol.**, UK, v. 143, p. 1-10, August 2003.
- ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings. **Grassland Science**, Japão, v. 55, n. 3, p. 164-170, August 2009.
- JANK, L. et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132-1137, March 2014.
- JANK, L. et al. **Sustainable Use of Grassland Resources for Improved Livelihoods**. XXIV International Grassland Congress, XI International Rangeland Congress, In International Grassland Congress Proceedings. 13p., October 2021.
- JUNGMANN, L. et al. Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. **Conservation Genetics Resources**, v. 1, n. 1, p. 475-479, October 2009.
- JUNGMANN, L. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stap. **Conservation Genetics**, v. 10, n. 6, p. 1873-1876, 2009.
- KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.
- KORDROSTAMI, M.; RAHIMI, M. Molecular markers in plants: concepts and applications. **Genet. 3rd Millenn**, Tehran, v. 13, p. 4024-4031, 2015.
- LUO, G. et al. Creating cold resistant strawberry via interploidy hybridization between octoploid and dodecaploid. **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 1-10, July 2017.
- MACHÁČKOVÁ, P. et al. New insights into ribosomal DNA variation in apomictic and sexual *Taraxacum* (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 199, n. 4, p. 790-815, August 2022.
- MENDES-BONATO, A. B. et al. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, v. 125, p. 419-425, 2002.
- MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic Arrest Compromises Pollen Fertility in an Interspecific Hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 831-837, Set 2007.

- MOLNÁR-LÁNG, M.; CEOLONI, C.; DOLEŽEL, J. (Eds.). **Alien introgression in wheat: Cytogenetics, molecular biology, and genomics**. Suíça: Springer International Publishing, 2015. 385 p.
- MORAES, I. C. et al. Characterization of aneuploidy in interspecific hybrid between *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & Evrard) Crins and *Urochloa decumbens* (Stapf) RD Webster. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 2, p. 1931-1940, February 2019.
- MORAES, I. C. et al. Karyotype analysis and mode of reproduction of two species of *Urochloa* P. Beauv. **Crop Science**, v. 61, n. 5, p. 3415-3424, April 2021.
- NANI, T. F. et al. Physical Map of Repetitive DNA Sites in *Brachiaria* spp.: Intravarietal and Interspecific Polymorphisms. **Crop Science**, v. 56, p. 1-15, May 2016.
- NIELEN, S. et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sex. Plant Reprod.**, v. 23, p. 45–51, 2010.
- NITTHAISONG, P. et al. Chromosome Number, Genomic Variation, and Molecular Markers to Assess Genetic Diversity of *Brachiaria* Species. **Crop Science**, Madison V. 56, p. 312–321, January–February 2016.
- NITTHAISONG, Pattama et al. Pentaploid apomicts by interspecific hybridization between diploid *Urochloa ruziziensis* and tetraploid apomictic *U. decumbens*. **Crop Science**, v. 59, n. 4, p. 1648-1656, July–August 2019.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytica**, Holanda, v. 128, n. 3, p. 397-403, December 2002.
- PADMANABAN, S. et al. Pentaploid wheat hybrids: applications, characterisation, and challenges. **Frontiers in plant science**, v. 8 (article 358), 10p, March 2017.
- PAULA, C. M. P; SOUZA-SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Genomic Constitution and Relationship in *Urochloa* (Poaceae) Species and Hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 57, p. 2605-2616, August 2017.
- PENTEADO, M. I. O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, Mai 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).
- PESSOA-FILHO, M; MARTINS, A. M.; FERREIRA, M. E. Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2017.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v. 1, n. 7, p. 215-222, July 1996.

RASKINA, O. et al. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 351-357, May 2008.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Org.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 1-15.

RISSO-PASCOTTO, C. et al. Chromosome number and microsporogenesis in pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breed.**, Berlim, v.122, p.136-140, 2003.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, v.145, p.155-159, September 2005.

ROA, F.; GUERRA, Ma. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-13, November 2012.

ROA, F.; GUERRA, M. Non-random distribution of 5S rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 243-249, Oct 2015.

ROCHA, M. J. et al. Comparative meiosis and cytogenomic analysis in euploid and aneuploid hybrids of *Urochloa* P. Beauv. **Chromosome Research**, v. 27, n. 4, p. 333-344, Sept 2019.

SELVAKUMAR, P. et al. Genetic purity analysis of cotton (*Gossypium* spp.) hybrids using SSR markers. **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 358-366, July 2010.

SILVA, P. I. T. et al. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-9, January 2013.

SIMEÃO, R. M. et al. Genomic selection in tropical forage grasses: current status and future applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 12 (article 665195), 22p., April 2021.

SUNDARAM, R. M. et al. Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. **Euphytica**, v. 163, n. 2, p. 215-224, September 2008.

SWENNE, A.; LOUANT, B. P.; DUJARDIN, M. Induction of Autotetraploid Forms in *Brachiaria ruziziensis* Germain Et Evrad (graminae) By a Colchicine Treatment. **Agronomie Tropicale**, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.

TIMBÓ, A. L. O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.a

TIMBÓ, A. L. O. et al. Nuclear DNA content and chromosome number in *Brachiaria* spp. genotypes. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, p. 62-67, jan-mar 2014.b

TOMASZEWSKA, P. et al. Complex polyploid and hybrid species in an apomictic and sexual tropical forage grass group: genomic composition and evolution in *Urochloa* (*Brachiaria*) species. **Annals of Botany**, 21p., December 2021.

TORRES-GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 37, p. 36-44, October 2005.

TRIVIÑO, N. J. et al. Genetic diversity and population structure of *Brachiaria* species and breeding populations. **Crop Science**, v. 57, n. 5, p. 2633-2644, July 2017.

VALLE, C. B.; MILES, J. W. Breeding of apomictic species. In: SAVIDAN, Y.; CARMAN, J. G.; DRESSELHAUS, T. (eds.) **The flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering**. Mexico, D.F.: CIMMYT, IRD, European Commission DC VI (FAIR), 2001. p. 137-152.

VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series**. Boca Raton: CRC, 2009. p. 103-151.

VALLE, C. B. et al. **BRS Ipyporã (" belo começo" em guarani): híbrido de *Brachiaria* da Embrapa**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Fev 2017. 18 p. (Comunicado Técnico, 137).

VIGNA, B. B. Z. et al. Genetic diversity and population structure of the *Brachiaria brizantha* germplasm. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 3, p. 157-169, 2011.a

VIGNA, B. B. Z. et al. New microsatellite markers developed from *Urochloa humidicola* (Poaceae) and cross amplification in different *Urochloa* species. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2011.b

WEN, J. et al. Characterization of interploid hybrids from crosses between *Brassica juncea* and *B. oleracea* and the production of yellow-seeded *B. napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 19-32, February 2012.

WORTHINGTON, M. et al. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1117-1132, July 2016.

WORTHINGTON, M. et al. Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-18, January 2019.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar S1 - Sequência dos primers usados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) (continua)

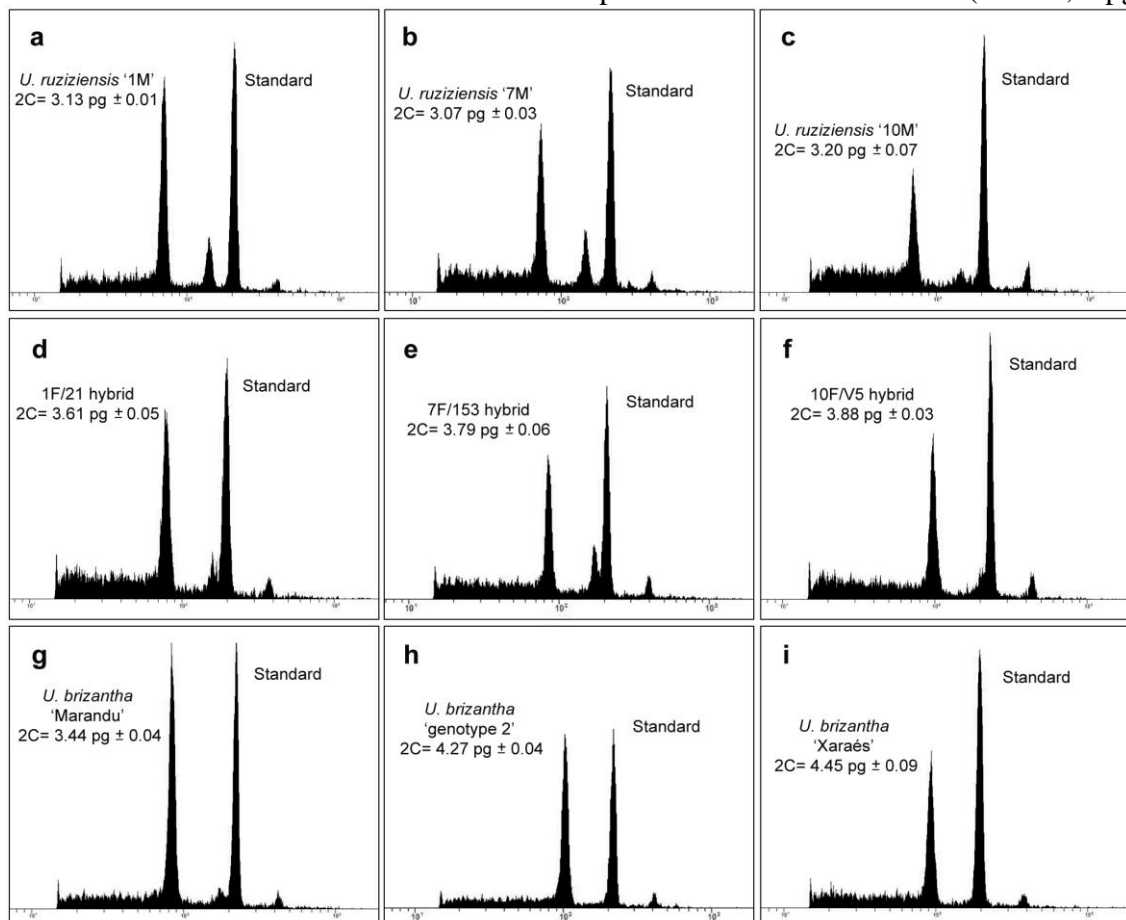
Primer	Sequência do primer (5'-3')	TA (°C)	Referência
BhUNICAMP003	CTGTCAGCATGGTTCAC TAATAA GCATCGAATAAAGCTCAGAAAG	51	Jungmann et al., 2009a
BhUNICAMP004	AGTTTGCTGCCTCTTTGATTC GTGGCGCTACCTTCTTGTG	51	Jungmann et al., 2009a
BhUNICAMP005	CACTGCATCAACTACCCACCAC GTCTGCTTTGCTTGC GTTACCT	52	Jungmann et al., 2009a
BhUNICAMP015	AGGGGAGAACTGTGGTGGTGTC TCGAGTTTTGAGGGTGGGATTG	55	Jungmann et al., 2009a
BhUNICAMP018	TCCATATCCAACAAGGCAACAT GCGCGAGCTGGTGAAGT	52	Jungmann et al., 2009a
BhUNICAMP020	CCGGCCGGTTCACTCGT GGCACTCGGACTCCCATAACTC	52	Jungmann et al., 2009a
BbUNICAMP001	AGCGTGCTGATTCCGACCTT GAAATGGCTATGCGAAATGTGT	52	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP002	TCGCTCGTTTCATTCCTTTCAT CGCACGCTTATACGACAACATT	53	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP003	GCTACAGGCTACGTTGAGAAGA ACAGGTGAGCAGTATGAGTCCA	52	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP004	ACCCCGCTGCATACCCATAAT TTTTTGCCCATCACTCTCTTTG	52	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP005	CGTTATGCGGCGACT AAGAAACTCCATGAAAAACAGA	48	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP006	GGGGCCACTGACCAAAC GCGTAGCTACCCGAATCC	52	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP009	AGGAGAGGGAGGAGGAGAAT GCGAGTTGTTAATGAAGTGAGGA	53	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP010	TCGTTCA GTTGAGTCGTCTTCT GCCATTCCGCCATCATAG	52	Jungmann et al., 2009b
BbUNICAMP011	GCTCGGGAATACAGGCTTGAAA GAAACGCGTCGGGGTGATT	53	Jungmann et al., 2009b

Tabela Suplementar S1 - Sequência dos primers usados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) (conclusão)

BbUNICAMP012	CGCGCATTACAGACTACAGA TAGAGAAGGCAATTGATTAGATAG	48	Jungmann et al., 2009b
BhUNICAMP013	ATGCAGCGGAAACATCTC ACTTCCTCCACTTCCACTCTG	52	Jungmann et al., 2009b
p779/p780	TATGTCACGACAAGAATATG TGTAACCATAACTCTCAGCT	52	Akiyama et al., 2011
ITS-F/ITS-R	CGTGACCCTTAAACAAAACA GGTCGTCTATGAGTCCTAAG	57	Torres González e Morton, 2005
RICRGAC1/RICRGAC2	GATCCCATCAGAACTCCAAG CGGTGCTTTAGTGCTGGTATG	60	Doleželová et al., 1998 (comunicação pessoal com Fukui e Ohmido)

Legenda: (TA) Temperatura de anelamento.
Fonte: Do autor (2022).

Figura Suplementar S1 - Histogramas de citometria de fluxo para a quantificação do DNA nuclear em picogramas dos genótipos de *Urochloa*. Standard: *Pisum sativum* foi usado como padrão interno de referência (2C = 9,09pg).



Fonte: Do autor (2022).

ARTIGO 2 - Pareamento cromossômico em híbrido interploide de *Urochloa*: novas considerações sobre afinidade e constituição genômica *

*Artigo elaborado de acordo com a Norma NBR 6022 (ABNT, 2018)

RESUMO

Estudar a meiose em poliploides é fundamental para acompanhar o comportamento dos cromossomos e respectivos genomas e entender os processos regulatórios da divisão. O interesse no grupo de plantas que compõem o gênero *Urochloa* está na combinação de caracteres complexos como poliploidia, apomixia, formação de complexos agâmicos, e geração de híbridos aneuploides e interploides, que constituem um excelente material para estudos citogenéticos/genômicos e oferecem oportunidades para o melhoramento genético. Os objetivos desse estudo foram: avaliar as configurações de pareamento e anormalidades meióticas em híbridos interespecíficos interploides e aneuploide do complexo *brizantha*, caracterizar o comportamento dos cromossomos/genomas ao longo da divisão e confirmar a constituição cromossômica de um híbrido interploide (7F/153). A meiose convencional foi utilizada para avaliar as configurações de pareamento e anormalidades meióticas. Os híbridos apresentaram anormalidades relacionadas ao pareamento cromossômico com formação de univalentes e multivalentes e, subsequentemente orientações e segregações irregulares. A hibridização *in situ* genômica (GISH) com sonda dos parentais foi aplicada em c-metáfases e meiócitos do híbrido 7F/153 ($2n = 40$) e do parental *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$). Apesar da GISH não possibilitar diferenciar os cromossomos dos genomas B/B¹, os resultados do híbrido 7F/153 mostraram pareamento preferencial em bivalentes entre cromossomos do genoma B² e entre cromossomos dos genomas B/B¹. O pareamento intergenômico envolvendo os genomas B/B¹ e B² só foi maior em associações multivalentes. Os univalentes foram frequentemente identificados como pertencentes ao genoma B² e, alguns deles, apresentaram segregação cromatídica na anáfase I, resultando em variação no número cromossômico nos núcleos, após a primeira divisão. Os micronúcleos avaliados em tétrades também confirmaram a predominância de cromossomos do genoma B², indicando uma tendência de eliminação dos cromossomos deste genoma. O parental *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$) apresentou um conjunto de nove cromossomos B² em seu complemento, sugerindo sua origem a partir da hibridação entre um gameta não reduzido de um tetraploide e um gameta reduzido do diploide *U. ruziziensis*. Apesar do comportamento irregular dos cromossomos B² identificados também na meiose do parental *U. brizantha*, os dados de viabilidade polínica e o complemento cromossômico do híbrido indicam que alguns gametas resultam de segregação regular e herança de quatro cromossomos B² e dezoito cromossomos B/B¹.

Palavras-chave: *Brachiaria*. GISH. Anormalidades na meiose. Univalentes. Aloploidia.

ABSTRACT

Studying meiosis in polyploids is essential to follow the behavior of chromosomes and their genomes and to understand the regulatory processes of division. The interest in the group of plants of the genus *Urochloa* lies in the combination of complex characters such as polyploidy, apomixis, formation of agamic complexes, and formation of aneuploid and interploid hybrids, which constitute an excellent material for cytogenetic/genomic studies and offer opportunities for genetic improvement. The objectives of this study were: to evaluate the pairing configurations and meiotic abnormalities in interploid and aneuploid interspecific hybrids of the *brizantha* complex, to characterize the behavior of chromosomes/genomes during division and to confirm the chromosomal constitution of an interploid hybrid (7F/153). Conventional meiosis was used to assess pairing configurations and meiotic abnormalities. The hybrids showed abnormalities related to chromosome pairing with univalent and multivalent formation and, subsequently, irregular orientation and segregation. Genomic in situ hybridization (GISH) with probes from the parents was applied to c-metaphases and meiocytes of the hybrid 7F/153 ($2n = 40$) and of the parental *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$). Despite GISH not being able to differentiate chromosomes from B/B¹ genomes, the results of the 7F/153 hybrid showed preferential pairing in bivalents between chromosomes of the B² genome and between chromosomes of the B/B¹ genomes. The intergenomic pairing involving the B/B¹ and B² genomes was only greater in multivalent associations. The univalents were frequently identified as belonging to the B² genome, and some of them showed chromatid segregation in anaphase I, resulting in variation in the chromosome number in the nuclei after the first division. The micronuclei in tetrads also confirmed the predominance of chromosomes from the B² genome, indicating a tendency to eliminate chromosomes from this genome. The parental *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$) had a set of nine B² chromosomes in its complement, suggesting its origin from hybridization between an unreduced gamete from a tetraploid and a reduced gamete from a diploid *U. ruziziensis*. Despite the irregular behavior of the B² chromosomes also identified in the meiosis of the parental *U. brizantha*, the pollen viability data and the chromosomal complement of the hybrid indicate that some gametes result from regular segregation and inheritance of four B² chromosomes and eighteen B/B¹ chromosomes.

Keywords: *Brachiaria*. GISH. Abnormalities in meiosis. Univalent. Allopolyploidy.

1 INTRODUÇÃO

A meiose é uma divisão celular especializada envolvida no processo de formação dos gametas. Diversas áreas da biologia têm estudado os mecanismos envolvidos com a divisão meiótica, elucidando muitos aspectos deste processo (para revisão MERCIER et al., 2015; WANG; COPENHAVER, 2018). Em plantas, avanços significativos foram obtidos, especialmente na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (ARMSTRONG et al., 2002; HIGGINS et al., 2005; CHELYSHEVA et al., 2010; OSMAN et al., 2011).

Os modelos desenvolvidos para descrever os processos meióticos baseiam-se principalmente em espécies diploides, pois nos poliploides a ocorrência de interações sinápticas complexas é frequente, resultando, muitas vezes, em erros durante a orientação e segregação dos cromossomos (GRANDONT; JENCZEWSKI; LLOYD, 2013). Apesar de ser altamente regulada e conservada evolutivamente (MERCIER et al., 2015), estudar a meiose em híbridos e poliploides é importante, pois pode fornecer *insights* sobre os mecanismos regulatórios e possíveis restrições da divisão quando mais de dois conjuntos de cromossomos estão presentes. Muitos estudos com essa abordagem foram desenvolvidos em espécies como *Triticum aestivum* (MARTÍN et al., 2014), *Arabidopsis arenosa* (YANT et al., 2013) e *Brassica napus* (GRANDONT et al., 2014; XIONG et al., 2021).

Outro grupo que tem se destacado nos estudos da meiose é *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.), o qual pertence à família Poaceae e engloba algumas espécies forrageiras que apresentam importância para a agropecuária em regiões tropicais e subtropicais (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996; FERREIRA et al., 2021). O interesse nos estudos meióticos em *Urochloa* está relacionado à formação de um complexo agâmico entre as espécies *Urochloa brizantha* (Hocst. ex. A. Rich.) R. D. Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster e *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & Evrard) Crins, que apresentam $x = 9$ como o número básico, com as duas primeiras predominantemente poliploides e apomíticas e a última diploide e sexual. O cruzamento entre essas espécies é limitado pelo modo de reprodução e nível de ploidia (VALLE; SAVIDAN, 1996; CARRILLO et al., 2010), se tornando possível ao superar as barreiras reprodutivas, como a partir da poliploidização artificial de *U. ruziziensis* (SWENNE; LOUANT; DUJARDIN, 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014).

Rocha et al. (2019) relataram que as taxas de anormalidades meióticas e configurações de pareamento em híbridos de *Urochloa* são dependentes dos genótipos parentais. De fato, diversos estudos que analisaram a meiose de híbridos interespecíficos do complexo ‘*brizantha*’ relataram variadas frequências de anormalidades meióticas, muitas delas relacionadas ao pareamento e segregação irregular (RISSO-PASCOTTO et al., 2005; ADAMOWSKI et al., 2008; FUZINATTO et al., 2007;2012; FELISMINO et al., 2010; ROCHA et al., 2019; RAGALZI et al., 2021). A ocorrência de associações multivalentes nos híbridos têm sido relacionada com a homeologia dos genomas parentais (ADAMOWSKI et al., 2008; FUZINATTO et al., 2012; ROCHA et al., 2019).

A similaridade dos genomas que constituem as espécies e híbridos do complexo ‘*brizantha*’ também foi avaliada por hibridização *in situ* genômica (GISH) em cromossomos mitóticos (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; CORRÊA et al., 2020). Os genomas B, B¹ e B² foram propostos e considerados homeólogos, com os alotetraploides *U. brizantha* e *U. decumbens* apresentando genomas BBB¹B¹ e B¹B¹B²B², respectivamente, e o diploide *U. ruziziensis* apresentando constituição B²B² (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017). Os resultados indicaram que o genoma B¹ ocupa posição intermediária em termos de relações filogenéticas, com menor afinidade entre o genoma B e B² (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; CORRÊA et al., 2020).

Recentemente, híbridos interploides, com $2n = 40$ e $2n = 41$ cromossomos (7F/153 e 10F/v5, respectivamente), foram identificados resultantes do cruzamento de *U. ruziziensis* ($2n = 4x = 36$) com genótipos pentaploides de *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$) (MORAES et al., dados não publicados). Esses neopoliploides podem abrir novas possibilidades para o melhoramento genético das espécies que formam o complexo *brizantha*, uma vez que citótipos com nível de ploidia superiores poderiam ser usados como doadores de pólen, explorando e ampliando o germoplasma de *Urochloa*. Além disso, eles são idealmente desejáveis para estudos citogenéticos, pois oferecem novas perspectivas sobre o entendimento da composição e afinidade genômica das espécies parentais e fornecem oportunidades para estudar a meiose em um contexto mais complexo, possibilitando compreender alguns aspectos envolvidos com a adaptação meiótica de neopoliploides e híbridos sintéticos.

Portanto, os objetivos desse estudo foram i) avaliar as configurações de pareamento e anormalidades meióticas em híbridos interespecíficos interploides e aneuploide do complexo *brizantha* via meiose convencional, ii) caracterizar o comportamento dos

cromossomos/genomas na divisão meiótica e confirmar a constituição cromossômica do híbrido interploide 7F/153 por meio da GISH.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As análises foram realizadas em três híbridos interespecíficos detalhados na TABELA 1. Além dos híbridos, os genitores do híbrido 7F/153 (*U. ruziziensis* e *U. brizantha*) foram utilizados na etapa da GISH. O material vegetal foi cedido pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. Os genótipos foram mantidos em vasos em casa de vegetação no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG, sob condições ambientais semelhantes (temperatura, umidade, fotoperíodo, irrigação, substrato e adubação).

Tabela 1 - Híbridos interespecíficos de *Urochloa* avaliados

Identificação	Cruzamento	Número cromossômico ^a
1F/21	<i>U. ruziziensis</i> 1M x <i>U. brizantha</i> cv. Marandu ^a ($2n = 4x = 36, B^2B^2B^2B^{2b}$) ($2n = 4x = 36, BBB^1B^1b$)	$2n = 36+1$
7F/153	<i>U. ruziziensis</i> 7M x <i>U. brizantha</i> genótipo 2 ^a ($2n = 4x = 36, B^2B^2B^2B^{2b}$) ($2n = 5x = 45, \text{genoma indefinido}$)	$2n = 40$
10F/v5	<i>U. ruziziensis</i> 10M x <i>U. brizantha</i> cv. Xaraés ^a ($2n = 4x = 36, B^2B^2B^2B^{2b}$) ($2n = 5x = 45, \text{genoma indefinido}$)	$2n = 41$

Legenda: ^aMORAES et al., dados não publicados; ^bPAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017
Fonte: Do autor (2022).

2.2 Coleta de inflorescências, análise da meiose e viabilidade de pólen

Inflorescências foram coletadas em todos os estágios de desenvolvimento e fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1), por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período, elas foram armazenadas a -20 °C, até o momento de preparo das lâminas.

As anteras foram selecionadas e as lâminas preparadas pela técnica de esmagamento em corante carmim propiônico 1%. Para a viabilidade de pólen, as lâminas foram preparadas

com grãos de pólen coletados após antese sob uma gota de solução de corante (PETERSON et al., 2010). As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Carl Zeiss, Axio Lab A1) com câmera acoplada (AxioCam ICC 1).

O comportamento meiótico foi avaliado em todas as fases da microsporogênese. As configurações de pareamento foram avaliadas em dez diacineses por genótipo. Para determinar a taxa de anormalidades meióticas o comportamento meiótico foi avaliado desde a metáfase I até a tétrade. Para viabilidade de pólen, foram avaliados 200 grãos de pólen por lâmina e cinco repetições, totalizando 1000 grãos de pólen por genótipo. Os grãos de pólen foram considerados viáveis quando apresentaram coloração violeta e sem deformações ou inviáveis quando corados de azul. A porcentagem de pólen viáveis foi obtida em função do número total de grãos de pólen avaliados.

2.3 Hibridização *in situ* genômica (GISH)

As análises da GISH foram realizadas em c-metáfases e células-mãe do grão de pólen (*pollen mother cells*, PMCs) do híbrido 7F/153 e do parental *U. brizantha* genótipo 2. As lâminas de c-metáfases foram preparadas como descrito em Moraes et al. (dados não publicados, artigo 1). Para as lâminas de PMCs, as anteras foram isoladas de inflorescências fixadas em Carnoy, por 24 horas em temperatura ambiente, e submetidas à digestão em mix enzimático (celulase Onozuka R10 0,7%, celulase 0,7%, pectoliase 1% e citohelicase 1%), por 1 h e 10 min, a 37 °C. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e, após uma rápida seleção, foram resfriadas gradualmente a 4 °C e -20 °C. Na sequência, as lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas secadas ao ar.

Os DNAs genômicos (gDNA) dos genitores *U. ruziziensis* 7M e *U. brizantha* pentaploide (genótipo 2) foram extraídos pelo protocolo CTAB e usados como sondas, que foram marcadas com digoxigenina-12-dUTP ou biotina-16-dUTP por reação de *Nick-translation*. A GISH com bloqueio foi utilizada em algumas c-metáfases do híbrido 7F/153 a fim de comprovar os resultados da *double-GISH*. Com esta finalidade, o gDNA cortado do parental *U. brizantha* foi usado como bloqueio na proporção 1:150 (1 ng sonda *U. ruziziensis*: 150 ng bloqueio).

As lâminas foram incubadas em pepsina 10 µg/mL por 20 min a 37 °C, com posterior pós fixação em solução de formaldeído 3,7% (SSC 2x) durante 10 min e desidratação em série alcoólica (70%, 90% e 100%). A preparação cromossômica foi desnaturada em

formamida 70% (SSC 2x) por 1 min e 10 s a 85 °C, seguido de nova desidratação em série alcoólica. A mistura de hibridização (formamida 50%, sulfato de dextran 10%, SSC 2x, 80-100ng de sonda) foi desnaturada por 8 minutos a 95 °C e transferida imediatamente para o gelo por, pelo menos, 5 minutos. A hibridização ocorreu por 44-48 h em câmara úmida a 37 °C. Após lavagens em tampão SSC 2x a 42 °C, a detecção da sonda foi feita com antidigoxigenina conjugada com rodamina e estreptavidina conjugada com alexafluor488, por 1 hora, a 37 °C. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) em Vectashield Antifade Mounting medium (1,5 µg/mL).

As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 60 acoplado a uma câmera QImaging Retiga EXi CCD. As imagens foram processadas em software para edição de imagens. Foram avaliadas dez c-metáfases e vinte diacineses para cada cenário GISH. Além das diacineses, as demais fases da meiose também foram avaliadas para caracterização do progresso da divisão.

3 RESULTADOS

3.1 Meiose convencional e viabilidade polínica de híbridos interespecíficos

Os híbridos exibiram pareamento irregular, ocorrência de univalentes e multivalentes em todas as diacineses avaliadas, mas com maior frequência de bivalentes (TABELA 2, FIGURA 1a-c). As médias das configurações de pareamento determinadas para cada híbrido foram 4,2I+12,7II+1,1III+0,9IV+0,1V (1F/21, 2n = 36); 3,7I+13,9II+1,9III+0,7IV (7F/153, 2n = 40); e 4,4I+12,1II+2,1III+1,1IV+0,3V (10F/v5, 2n = 41). Os univalentes, tri e tetravalentes ocorreram em menor número e os pentavalentes foram observados raramente (TABELA 2). Em consequência dessas configurações, várias anormalidades foram observadas, tais como: cromossomos não orientados ou atrasados na meiose I e II, assincronias, arranjo anormal das fibras do fuso, tétrades com micronúcleos e políades (FIGURA 1d-k). As principais anormalidades estavam relacionadas ao pareamento e segregação irregular dos cromossomos (FIGURA 1a-k). O híbrido 10F/v5 (2n = 41 cromossomos) apresentou a maior frequência de anormalidades e menor taxa de viabilidade do pólen (TABELA 2).

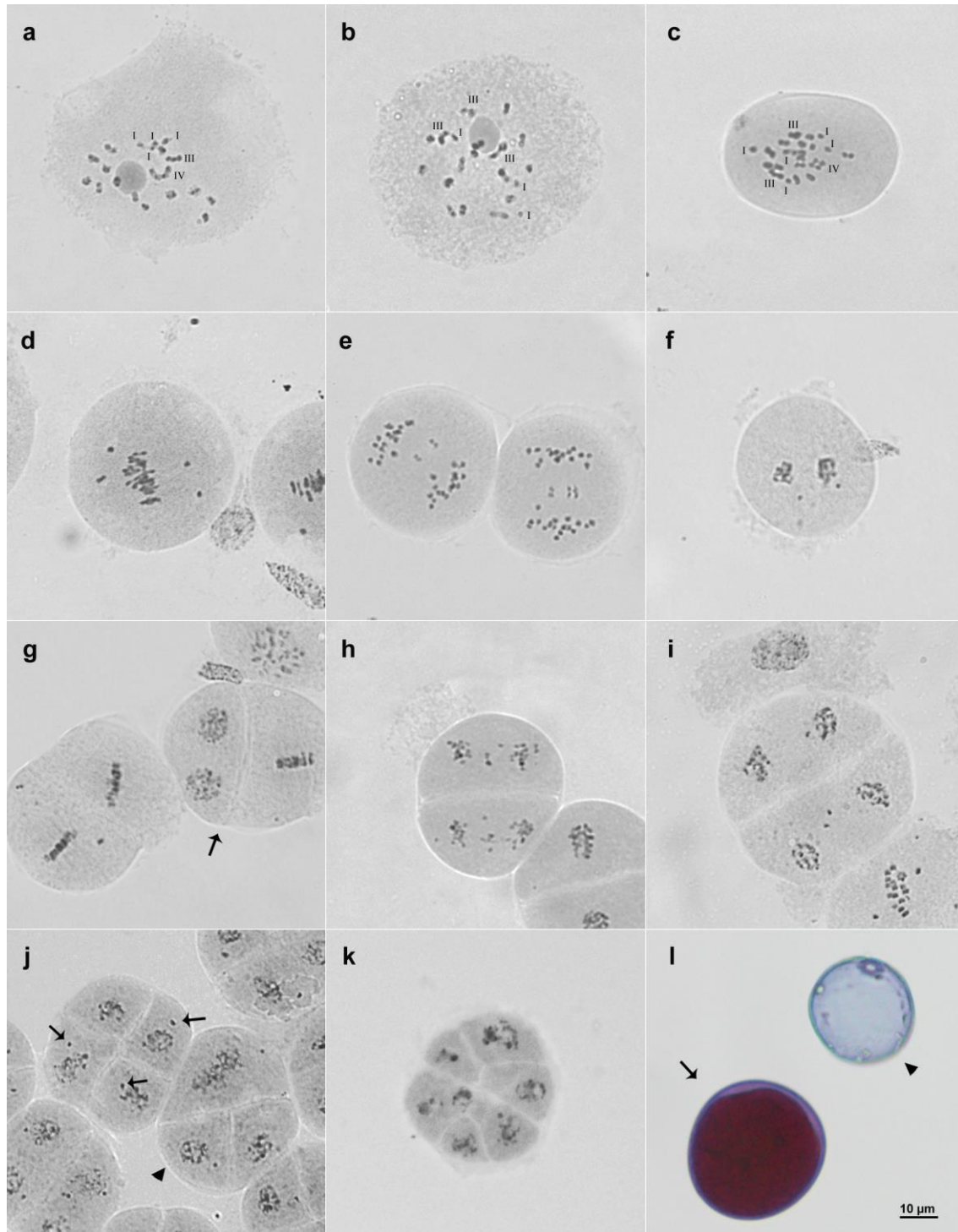
TABELA 2 - Frequências de pareamentos e intervalo de distribuição (em parênteses) em diacineses; frequência de anormalidades e número de células avaliadas (em parênteses) de metáfase I a tétrade; e viabilidade polínica de híbridos interespecíficos de *Urochloa*.

Híbridos	<u>Configuração de pareamento</u>					<u>Anormalidades meióticas</u>							Viabilidade do pólen		
	I	II	III	IV	V	MI	AI	TI	P II	M II	A II	T II		Tétrade	Total
1F/21	22,0%	67,0%	5,7%	4,8%	0,5%	35,11%	71,95%	53,64%	32,81%	75,90%	51,69%	81,74%	76,87%	59,59%	85,4%
	(1-7)	(10-16)	(0-2)	(0-2)	(0-1)	(225)	(82)	(110)	(64)	(166)	(89)	(115)	(134)	(985)	
7F/153	18,3%	68,8%	9,4%	3,5%	0,0%	52,41%	95,93%	55,56%	35,48%	85,25%	90,91%	95,83%	46,49%	57,28%	74,9%
	(2-6)	(12-17)	(0-3)	(0-2)	(0)	(145)	(123)	(45)	(93)	(61)	(44)	(96)	(114)	(721)	
10F/v5	22,1%	60,2%	10,5%	5,5%	1,7%	53,3%	92,4%	54,8%	29,6%	62,0%	96,8%	90,3%	85,9%	69,5%	55,3%
	(1-8)	(6-16)	(1-3)	(0-3)	(0-1)	(120)	(92)	(104)	(98)	(108)	(93)	(93)	(99)	(807)	

Legenda: I, univalente; II, bivalente; III, trivalente; IV, tetravalente; V, pentavalente; M I, metáfase I; A I, anáfase I; T I, telófase I; P II, prófase II; M II, metáfase II; A II, anáfase II; T II, telófase II.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 1 - Configurações de pareamento e anormalidades meióticas observadas em híbridos interespecíficos de *Urochloa*.



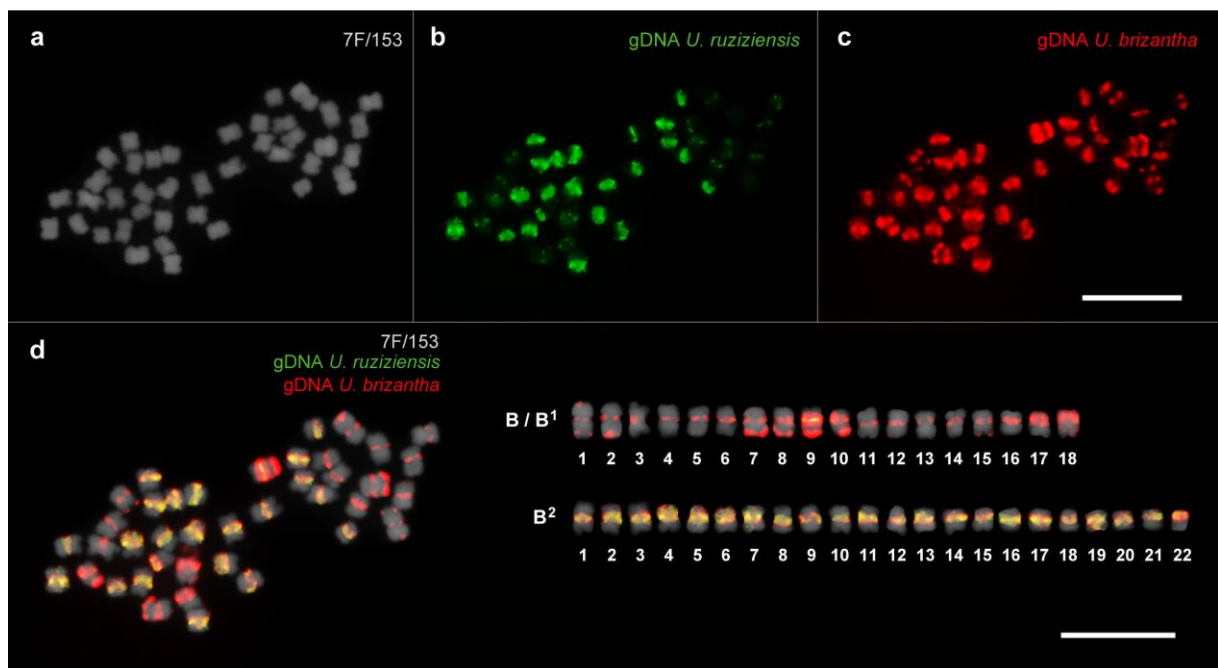
Legenda: **a** Diacinese (híbrido 1F/21). **b** Diacinese (híbrido 7F/153). **c** Diacinese (híbrido 10F/v5). **d** Metáfase I com cromossomos não orientados. **e** Anáfase I com cromossomos atrasados. **f** Telófase I com dois micronúcleos. **g** Metáfase II com cromossomos não orientados e Metáfase II assíncrona (seta). **h** Anáfase II com cromossomos atrasados. **i** Telófase II com cromossomos atrasados. **j** Tétrade com micronúcleos (seta) e tríade com micronúcleo (ponta de seta). **k** políade. **l** Grão de pólen viável (seta) e inviável (ponta de seta).

Fonte: Do autor (2022).

3.2 *Double-GISH* e *GISH* com bloqueio em c-metáfases e meiócitos do híbrido 7F/153

A *GISH* foi aplicada para análise do complemento cromossômico e divisão meiótica do híbrido 7F/153, pois ele apresentou a maior frequência de pareamento em bivalente e maior taxa de viabilidade de pólen entre os dois híbridos interploides. A *double-GISH* em c-metáfases com sondas dos parentais marcou 22 cromossomos com ambas as sondas, identificados como pertencentes ao genoma B² (FIGURA 2). Os 18 cromossomos restantes foram hibridizados apenas com a sonda do parental masculino *U. brizantha* e, provavelmente, correspondem aos genomas B e/ou B¹ (FIGURA 2). A *GISH* usando como sonda o gDNA do genitor feminino e como bloqueio o gDNA do genitor masculino confirmou a ocorrência de 22 cromossomos do genoma B² (FIGURA S1).

Figura 2 - *Double-GISH* em c-metáfase do híbrido interploide 7F/153 (2n = 40 cromossomos).



Legenda: **a** DAPI. **b** gDNA de *U. ruziziensis* 7M. **c** gDNA de *U. brizantha* pentaploide. **d** Sobreposição das sondas genômicas e organização dos cromossomos de acordo com o genoma B/B¹ ou B². Barra: 10 μm.

Fonte: Do autor (2022).

No paquíteno, devido à complexidade e justaposição das configurações, a individualização dos cromossomos é mais difícil. Entretanto, foi possível identificar um alinhamento ou pareamento entre cromossomos homeólogos (FIGURA 3a). Com relação ao total de univalentes observados, 72,3% pertenciam ao genoma B². Nos bivalentes e

trivalentes, as análises genômicas identificaram um pareamento preferencial entre os cromossomos do genoma B² (intragenômico) e entre os cromossomos do genoma B ou B¹, com uma frequência consideravelmente menor de pareamento envolvendo cromossomos do genoma B/B¹ e B² (FIGURA 3 b-c, TABELA 3). O pareamento entre B/B¹ e B² superou as demais associações genômicas somente nas configurações tetravalentes, que consistiram em 3,77% das configurações observadas (FIGURA 3c, TABELA 3). Dentre essas associações tetravalentes intergenômicas envolvendo B², 46,15% foram 2B/B¹+2B², 38,46% foram 1B/B¹+3B² e 15,39% foram 3B/B¹+1B². A ocorrência de pentavalente foi observada uma vez, envolvendo cromossomos do genoma B².

Tabela 3 - Frequência (%) das associações genômicas observadas em diacineses do híbrido interploide 7F/153.

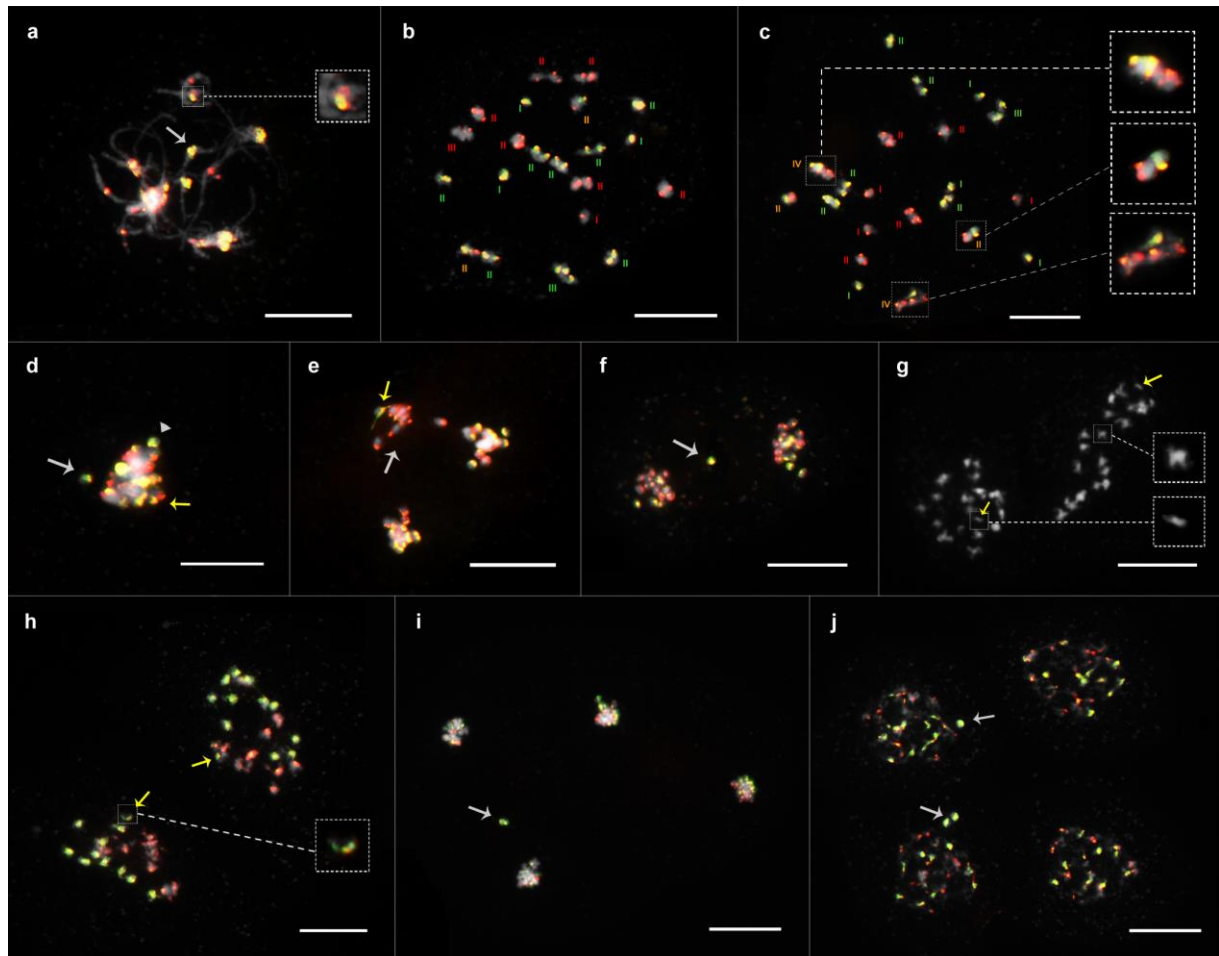
Configuração	Genoma envolvido		
	B/B1*	B2	B/B1* e B2
I	4,52	11,81	-
II	28,39	32,41	9,55
III	4,27	4,77	0,50
IV+	0,00	0,50	3,27
Total	37,18	49,50	13,32

Legenda: I, univalente; II, bivalente; III, trivalente; IV+, tetravalente ou pentavalente;

*B/B1 representam cromossomos B ou B1

Fonte: Do autor (2022).

Figura 3 - *Double-GISH* em PMCs do híbrido interploide 7F/153.



Legenda: **a** Paquíteno com pareamento intragenômico de cromossomos B^2 (seta) e destaque para um pareamento envolvendo B/B^1 e B^2 . **b** Diacinese com $1I(B/B^1) + 3I(B^2) + 6II(B/B^1) + 7II(B^2) + 1III(B/B^1) + 1III(B^2) + 2II(B/B^1 e B^2)$. **c** Diacinese com $3I(B/B^1) + 4I(B^2) + 4II(B/B^1) + 5II(B^2) + 1III(B^2) + 2II(B/B^1 e B^2) + 1IV(2B/B^1 e 2B^2) + 1IV(3B/B^1 e 1B^2)$ com destaque para os pareamentos envolvendo genomas B/B^1 e B^2 . **d** Metáfase I com univalente B^2 não orientado (seta), univalente B^2 orientado na placa (ponta de seta) e bivalente $B/B^1 + B^2$ (seta amarela). **e** Anáfase I com fuso tripolar, bivalentes B^1 atrasados (seta) e univalente B^2 orientado para ambos os polos (seta amarela). **f** Telófase I com cromossomos dos genomas em ambos os pólos e cromossomo B^2 atrasado (seta). **g** Prófase II com 19 e 22 cromossomos nas células-irmãs, indicando a ocorrência de segregação precoce das cromátides-irmãs (setas amarelas), com destaque para um cromossomo com as duas cromátides (superior) e cromossomo que sofreu segregação cromatídica em anáfase I (inferior). **h** Prófase II com 20 cromossomos ($9B/B^1$ e $11B^2$) e 22 cromossomos ($10B/B^1$ e $12B^2$) nas células-irmãs, indicando segregação precoce das cromátides-irmãs (setas amarelas) e destaque para um cromossomo B^2 que sofreu segregação cromatídica em anáfase I. **i** Telófase II com cromossomo B^2 atrasado (seta). **j** Tétrade com micronúcleos B^2 (setas). Barra: 10 μm .

Fonte: Do autor (2022).

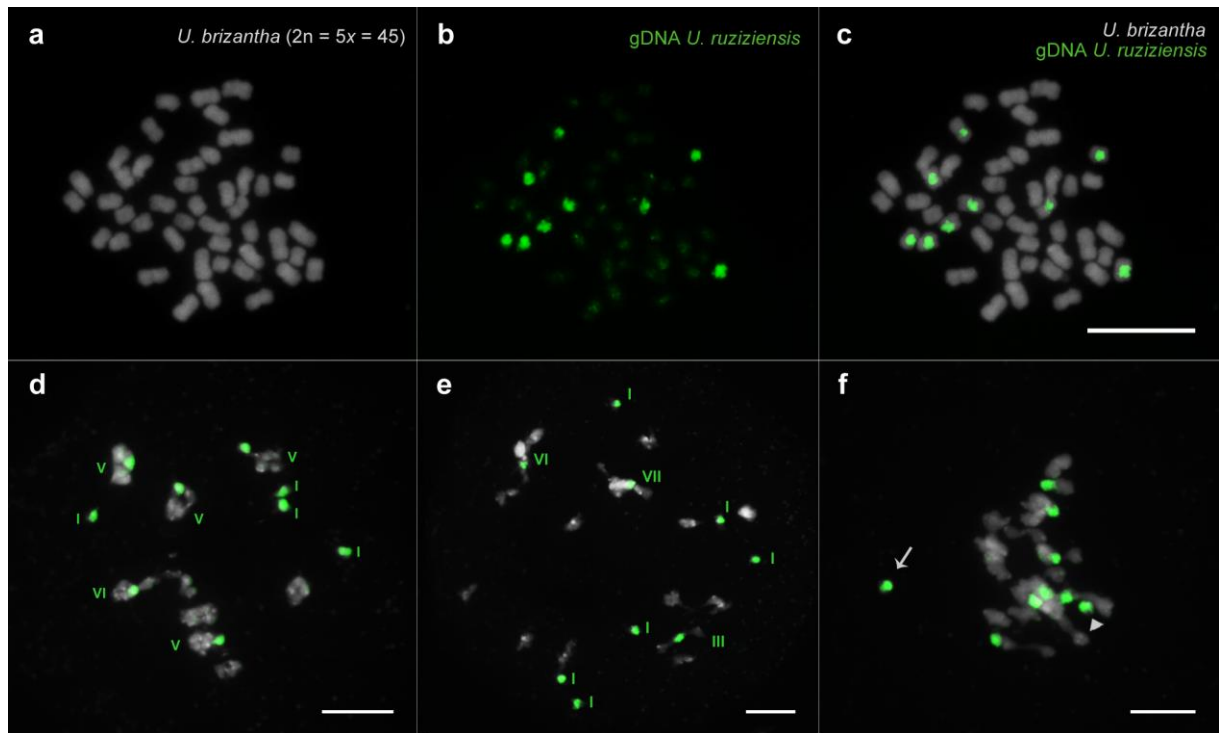
Anormalidades meióticas foram observadas envolvendo cromossomos de todos os genomas nas fases subsequentes (FIGURA 3d-j). Os univalentes B^2 observados em maior frequência nas diacineses (TABELA 3) foram rastreados nas fases posteriores e identificados

como orientados e não orientados na metáfase I (FIGURA 3d). Os bivalentes atrasados na Anáfase I pertenciam frequentemente ao genoma B/B¹, embora, na maioria das vezes, um ou mais cromossomos do genoma B² também foram observados (FIGURA 3e). Cromossomos dos diferentes genomas foram localizados nos dois núcleos das telófases I e prófases II (FIGURA 3f-h). Entretanto, muitos deles apresentaram número cromossômico diferente entre os produtos da primeira divisão, variando entre 18 a 22 cromossomos por núcleo (FIGURA 3g-h). Algumas PMCs em prófase II (FIGURA 3g-h), apresentaram um número maior que o esperado de cromossomos B/B¹ ou B² considerando ambos os núcleos e, em conjunto com a morfologia desses cromossomos, indicam uma provável segregação precoce de cromátides irmãs em anáfase I (FIGURA 3g-h), e validado pela observação de um univalente B² orientado para ambos os pólos em anáfase I (FIGURA 3e). Os micronúcleos observados em telófase II e tétrades pertenciam predominantemente ao genoma B² (FIGURA 3i-j).

3.3 GISH no parental *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$)

A avaliação da GISH em células somáticas e PMCs do parental *U. brizantha* pentaploide com sonda gDNA de *U. ruziziensis* 7M (parental materno) foi fundamental para explicar a observação de quatro cromossomos adicionais do genoma B² no híbrido 7F/153, considerando que a previsão de herança era de 18 cromossomos B² maternos. As análises em c-metáfases ($2n = 5x = 45$) mostraram 9 cromossomos fortemente marcados (FIGURA 4 a-c), indicando a presença de um conjunto de cromossomos do genoma B² nesse genótipo. Nas diacineses, univalentes B² foram frequentemente identificados, com média de 3,6 e intervalo de distribuição de 1 a 6 univalentes B² por célula avaliada (FIGURA 4d-e). Os cromossomos B² também estavam envolvidos em outras configurações de pareamento, principalmente em multivalentes, nos quais cada cromossomo B² foi identificado participando de uma associação diferente, não sendo visualizado pareamento intragenômico B² (FIGURA 4d-e). Os cromossomos não marcados pela sonda frequentemente se pareavam em multivalentes, embora bivalentes também tenham sido identificados (FIGURA 4d-e). Nas metáfases I, foram identificados de 1 a 4 univalentes não orientados por célula, predominantemente pertencentes ao genoma B² (FIGURA 4f). Univalentes orientados na placa também foram identificados (FIGURA 4f). A análise convencional da meiose identificou anormalidades desde a metáfase I até a tétrade (FIGURA S2), com frequência média total de 64% e taxa de viabilidade do pólen de 57.6%.

Figura 4 - GISH em c-metáfases (a-c) e PMCs (d-f) do parental *U. brizantha* ($2n = 5x = 45$).



Legenda: **a** DAPI. **b** sonda de *U. ruziziensis* 7M. **c** Sobreposição. **d** Diacinese com 4I+1III+3IV+4V+1VI. **e** Diacinese com 6I+8II+2III+1IV+1VI+1VII. **f** Metáfase I com univalente não orientado (seta) e um univalente orientado (ponta de seta). Barra: 10 μ m.

Fonte: Do autor (2022).

4 DISCUSSÃO

4.1 Meiose de híbridos interespecíficos interploides e aneuploide do complexo *brizantha*

O comportamento meiótico irregular observado nos híbridos corrobora estudos anteriores envolvendo espécies e híbridos euploides e aneuploides de *Urochloa*, que tipicamente apresentam taxas variáveis de anormalidades, configurações uni e multivalentes nos pareamentos e reduzida viabilidade de pólen (MENDES-BONATO et al., 2002; RISSO-PASCOTTO et al., 2005; ADAMOWSKI et al., 2008; FUZINATTO et al., 2007 e 2012; FELISMINO et al., 2010; PAGLIARINI et al., 2012; ROCHA et al., 2019; RAGALZI et al., 2021). É comum que poliploides recém-formados apresentem instabilidade meiótica (CIFUENTES et al., 2010; ROCHA et al., 2019; XIONG et al., 2021), especialmente os híbridos analisados nesse estudo, provenientes de cruzamentos entre parentais autoploide sintético (sexual) e alopoliploide (apomítico), e que resultaram em formações aneuploide

(1F/21, $2n = 4x = 36+1$) e interploides (7F/153 e 10F/v5, $2n = 40$ e $2n = 42$ cromossomos), de alta complexidade genômica, mas de interesse para estudos genéticos, citogenéticos e de melhoramento.

A maior frequência de bivalentes observada nos três híbridos parece indicar um pareamento preferencial e recombinação envolvendo homólogos em alguns cromossomos, o que pôde ser confirmado para o híbrido 7F/153 com a GISH em PMCs. Entretanto, ao contrário do trigo, que reconhecidamente possui genes que garantem o comportamento tipo diploide (CIFUENTES et al., 2010; HOLLISTER, 2015), o pareamento multivalente em espécies e híbridos de *Urochloa* tem sido frequentemente relatado (FUZINATTO et al., 2007; ADAMOWSKI et al., 2008; PAGLIARINI et al., 2012; ROCHA et al., 2019). Apesar de menos frequentes, multivalentes foram observados e relacionam-se com a homologia dos cromossomos dos genitores, uma vez que as espécies que constituem o complexo *brizantha* são consideradas filogeneticamente próximas e com homologia segmental (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; TRIVIÑO et al., 2017; PESSOA-FILHO et al., 2017; PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017). Esses cromossomos que “falham” em reconhecer seus homólogos podem ter se diferenciado menos ao longo do tempo evolutivo de cada parental, resultando em associações complexas durante a divisão (HOLLISTER, 2015).

Além de revelar a proximidade filogenética entre as espécies, o pareamento multivalente em híbridos de *Urochloa* têm sido um importante indicador de transferência gênica visando o melhoramento genético (RISSO-PASCOTTO et al., 2005; ADAMOWSKI et al., 2008; FELISMINO et al., 2010). As configurações univalentes, determinada em frequência consideravelmente alta em todos os híbridos e identificada predominantemente como do genoma B² no híbrido 7F/153, representam cromossomos que falharam nas interações de pareamento e recombinação homóloga e, como consequências, não asseguram uma correta orientação na metáfase I (SYBENGA, 1992).

Enquanto o pareamento bivalente é relacionado à segregação cromossômica regular e, consequentemente, à fertilidade e estabilidade genética, todas as outras configurações de pareamentos são propensas a rearranjos cromossômicos, perda de genes e segregação irregular, podendo resultar em gametas aneuploides e fertilidade reduzida (GRANDONT; JENCZEWSKI; LLOYD, 2013). Dentre os híbridos avaliados, o interploide 10F/v5 apresentou a menor frequência de pareamento bivalente, maior taxa de anormalidades meióticas e menor taxa de viabilidade polínica. Nossos resultados confirmam que o comportamento meiótico dos híbridos é dependente do genótipo parental, conforme já

relatado por Rocha et al. (2019). Além disso, demonstram que, quando níveis mais altos de ploidia estão envolvidos, a divisão meiótica pode ser mais influenciada pela combinação dos genótipos dos parentais do que pelo nível de ploidia de ambos. Essa afirmação se deve ao fato de que os dois híbridos interploides avaliados apresentaram comportamento meiótico relativamente diferentes, mesmo sendo resultantes de cruzamentos envolvendo tetraploides e pentaploides, com o híbrido 7F/153 apresentando taxas de anormalidades mais semelhantes ao híbrido aneuploide 1F/21, resultante do cruzamento entre tetraploides.

4.2 Análise genômica do complemento cromossômico, pareamento e progresso da divisão meiótica no híbrido interploide 7F/153

A *double*-GISH usando sondas de gDNA dos parentais (*U. ruziziensis* e *U. brizantha*) foi informativa para diferenciar os cromossomos em c-metáfases e PMCs do híbrido 7F/153. A GISH com bloqueio também possibilitou identificar com clareza os cromossomos do genoma B² e pode ser uma alternativa importante para análises genômicas na meiose. O padrão de marcação das sondas preferencialmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas e, em alguns cromossomos, nas regiões terminais, é um padrão típico exibido por marcação de sondas genômicas em espécies de *Urochloa* e tem sido relacionada ao caráter repetitivo dessas regiões (PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; CORRÊA et al., 2020; TOMASZEWSKA et al., 2021). A distribuição de DNA repetitivo ao longo dos cromossomos também foi considerada para explicar a distribuição desigual dos sinais GISH nas gramíneas do gênero *Brachypodium*, que também exibem um padrão de hibridização em regiões centroméricas e pericentroméricas (WOLNY; HASTEROK, 2009).

A diferenciação dos cromossomos possibilitou a análise detalhada das configurações de pareamento e do progresso da divisão no híbrido 7F/153. A maior frequência de pareamento bivalente corroborou observações da meiose convencional. As análises genômicas permitiram identificar uma preferência de pareamento entre cromossomos do genoma B². A maior frequência de pareamento intragenômico de B² também havia sido relatado anteriormente por Rocha et al (2019), ao avaliar a GISH na meiose de um híbrido aneuploide (H963, *U. ruziziensis* x *U. decumbens*) com $2n = 36+2$ cromossomos.

Os genomas B/B¹, evidenciados pela sonda do parental *U. brizantha*, não foram identificados como configurações de pareamento intragenômicos, pois a composição genômica deste citótipo ainda não foi determinada. Se todos os cromossomos identificados

por essa sonda forem do genoma B ou do genoma B¹, o pareamento preferencial também seria intragenômico. Na condição de que os cromossomos pertençam aos genomas B e B¹ (9B e 9B¹), esse pareamento indicaria uma maior afinidade genômica entre os genomas B e B¹ do que com o genoma B². Ao considerar que todos os poliploides naturais do complexo *brizantha* foram identificados, até o momento, como alopoliploides (MENDES-BONATO et al., 2002; NIELEN et al., 2009; PAULA; SOUZA-SOBRINHO; TECHIO, 2017; TOMASZEWSKA et al., 2021), a segunda hipótese parece ter mais relevância. Entretanto, estudos que possibilitem diferenciar esses cromossomos e identificar os respectivos genomas ainda são necessários, tanto para o híbrido interespecífico 7F/153, como também para o genitor masculino (*U. brizantha* pentaploide) e outros híbridos interespecíficos.

Paula, Souza-Sobrinho e Techio (2017) já haviam proposto a relação de afinidade entre os genomas de *Urochloa* como B>B¹>B², mas a preferência de B¹ por B ou B² permanece indefinida. Corrêa et al. (2020) confirmaram a homeologia e aloploidia relatada para as espécies poliploides, além de avaliarem a constituição genômica de citótipos diploides de *U. brizantha* (B¹B¹) e *U. decumbens* (B¹B¹). Enquanto Tomaszewska et al. (2021) elaboraram uma nova proposta de nomenclatura para os genomas de *Urochloa*. Independentemente dessas diferentes designações, os estudos indicam que as espécies do complexo *brizantha* possuem subgenomas compartilhados e, portanto, optamos por manter a nomenclatura já utilizada em outros estudos para fins comparativos.

Os univalentes não orientados em metáfase I, identificados predominantemente como cromossomos B², corroboram a identificação feita por Rocha et al. (2019) no híbrido aneuploide H963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*, 2n = 36+2). Entretanto, para o híbrido 7F/153, a contagem dos cromossomos após a primeira divisão evidenciou variação no número de cromossomos, enquanto o híbrido H963 apresentou uma distribuição equitativa dos cromossomos (ROCHA et al., 2019). Essa variação observada possivelmente está relacionada ao comportamento irregular dos univalentes, que pode resultar em: i) permanecerem atrasados e serem eliminados ainda na primeira divisão; ii) distribuição aleatória para os pólos; ou iii) ocorrer a orientação bipolar dos cinetócoros-irmãos, levando a uma segregação precoce das cromátides irmãs em anáfase I (SYBENGA, 1992). De fato, cromossomos atrasados e micronúcleos em telófase I, bem como univalentes orientados em metáfase I e evidências de segregação precoce das cromátides-irmãs foram identificados nas PMCs do híbrido 7F/153. A eficiência da meiose I é garantida, dentre outros fatores, pela manutenção dos bivalentes até a metáfase I, a fim de assegurar a correta orientação dos homólogos na placa (MERCIER et al.,

2015). A segregação das cromátides-irmãs em anáfase I como consequência da formação univalente é uma anormalidade meiótica amplamente relatada em linhas de adição/substituição de trigo (ARAGÃO-ALCAIDE et al., 1997; LUKASZEWSKI, 2010) e em híbridos interploides de *Brassica* (WEN et al., 2012).

A observação de micronúcleos após a segunda divisão identificados com cromossomos predominantemente do genoma B² é coincidente com a maior frequência de univalentes pertencentes a esse genoma identificados no início da divisão, que resultaram em uma segregação irregular e, conseqüentemente, eliminação cromossômica ou de fragmentos cromossômicos. Esse comportamento irregular não foi exclusivo dos cromossomos do genoma B², uma vez que univalentes e micronúcleos B/B¹ também foram identificados, mas em menor proporção. A instabilidade cromossômica é frequentemente relatada em híbridos F1 interploides (WEN et al., 2012; HE et al., 2017; PADMANABAN et al., 2017). Em *triticum*, a eliminação de cromossomos ocorre durante várias gerações derivadas de interploides F1 e é considerada essencial para resolver o processo de pareamento e dar origem a uma linhagem estável (PADMANABAN et al., 2017). Neste sentido, o monitoramento da meiose nas gerações subsequentes do híbrido 7F/153 poderá contribuir para observar se realmente há uma tendência de eliminação dos cromossomos do genoma B² e identificar as mudanças na constituição e comportamento dos cromossomos que podem resultar em genótipos estáveis e com uso promissor no melhoramento genético.

4.3 Genoma B² presente no complemento do parental *U. brizantha* (2n = 5x = 45)

Os nove cromossomos B² que foram identificados no complemento cromossômico de *U. brizantha* sugerem que a formação desse pentaploide pode ter envolvido a hibridação de um tetraploide supostamente de *U. brizantha* (gameta não reduzido) com um genótipo diploide de *U. ruziziensis* (genoma B²B², gameta reduzido). A proposta deste cruzamento é suportada pelo resultado obtido para o híbrido 7F/153, com 22 cromossomos identificados do genoma B², sendo, portanto, 18 doados pelo parental feminino *U. ruziziensis* e quatro pelo genitor *U. brizantha*, e outros 18 cromossomos (genoma B/B¹) também do parental masculino. Como a GISH não nos possibilitou definir a composição genômica exata dos 18 cromossomos B/B¹, ainda é necessário confirmar a constituição genômica desses cromossomos e conseqüentemente, do parental *U. brizantha* e do híbrido 7F/153.

A fusão de gametas não reduzidos de um genitor tetraploide com gametas reduzidos de um genitor diploide já havia sido proposta anteriormente por Risso-Pascotto et al. (2003) e Mendes et al. (2006) para explicar a pentaploidia em *U. brizantha*. Ao avaliar outro citótipo pentaploide da espécie, recentemente sugerimos uma formação a partir do cruzamento entre um tetraploide e um hexaploide, ambos de gametas reduzidos (MORAES et al., 2021). Essa hipótese baseou-se na morfologia dos cromossomos e distribuição dos sítios de rDNA e, devido aos novos resultados encontrados aqui para esse pentaploide, recomendamos fortemente a aplicação da GISH no genótipo para confirmar ou refutar a proposta anterior.

Ao contrário do que normalmente é visto em poliploides estabelecidos, que geralmente exibem um comportamento tipo diploide, com pareamento bivalente e segregação regular, sugerindo que a diploidização da meiose evolui em poliploides (HOLLISTER, 2015), os poliploides de *Urochloa* frequentemente apresentam pareamento irregular e outras anormalidades meióticas (MENDES-BONATO et al., 2002; RISSO-PASCOTTO et al., 2003; MENDES et al., 2006; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; RICCI et al., 2010; PAGLIARINI et al., 2012). Essa manutenção do comportamento meiótico como um neopoliploide sugere que o modo de reprodução apomítico dessas espécies pode atuar fixando o cariótipo, de modo que os processos de diploidização funcional não evoluem e as anormalidades meióticas continuam frequentes (WORTHINGTON et al., 2016; ROCHA et al., 2019; MACHÁČKOVÁ et al., 2022). Apesar da ocorrência frequente de anormalidades meióticas, uma porcentagem considerável de pólenes viáveis foi identificada no parental *U. brizantha*, e o complemento cromossômico do híbrido 7F/153 sugere que uma porcentagem dos meiócitos segregam regularmente e formam gametas com número de cromossomos e constituição genômica correta/equilibrada.

5 CONCLUSÕES

Os híbridos apresentaram pareamento irregular e taxas de anormalidades meióticas consideráveis, mas com pareamento preferencial em bivalentes e boas taxas de viabilidade polínica.

O híbrido interploide 7F/153 (*U. ruziziensis* 4x x *U. brizantha* 5x) possui 22 cromossomos B² e 18 cromossomos B/B¹. Os cromossomos B² apresentam pareamento intragênomico preferencial, mas também ocorrem significativamente como univalentes. Os cromossomos do genoma B/B¹ também apresentam pareamento bivalente preferencial,

ocorrendo como univalentes em menor proporção. As associações entre os genomas B/B¹ e B² só ocorrem em maiores proporções em associações multivalentes, que são relativamente baixas.

As configurações de univalentes e multivalentes resultam em erros na segregação dos cromossomos, que levam a eliminação cromossômica durante o progresso da divisão, com destaque para a segregação precoce de cromátides-irmãs (em anáfase I) de univalentes.

O parental pentaploide *U. brizantha* apresenta um conjunto de nove cromossomos do genoma B², que ocorrem em configurações univalentes e multivalentes intergenômicos na meiose, tendo transmitido quatro cromossomos B² para o híbrido 7F/153.

REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. de V.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 87, n. 1, p. 33-38, April 2008.
- ARAGÓN-ALCAIDE, L. et al. Centromeric behaviour in wheat with high and low homoeologous chromosomal pairing. **Chromosoma**, v. 106, n. 5, p. 327-333, 1997.
- ARMSTRONG, S. J. et al. Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. **Journal of Cell Science**, v. 115 (18), p. 3645-3655, 2002.
- CARRILLO, A. R. Q. et al. Apomixis importance for tropical forage grass selection and breeding. Review. **Rev. Mex. Cienc. Pec.**, v. 1(1), p. 25-42, 2010.
- CHELYSHEVA, L. et al. An Easy Protocol for Studying Chromatin and Recombination Protein Dynamics during *Arabidopsis thaliana* Meiosis: Immunodetection of Cohesins, Histones and MLH1. **Cytogenet Genome Res**, v. 129, p.143-153, July 2010.
- CIFUENTES, M. et al. Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. **New Phytologist**, v. 186, n. 1, p. 29-36, 2010.
- CORRÊA, C. T. R. et al. GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa* P. Beauv. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, p. 887-896, November 2020.
- FELISMINO, M. F.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior of interspecific hybrids between artificially tetraploidized sexual *Brachiaria ruziziensis* and tetraploid apomictic *B. brizantha* (Poaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 191-197, April 2010.
- FERREIRA, R. C. U. et al. An Overview of the Genetics and Genomics of the *Urochloa* Species Most Commonly Used in Pastures. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 770461, 22p., December 2021.
- FUZINATTO, V. A.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1107-1117, December 2007.
- FUZINATTO, V. A.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior in apomictic *Brachiaria ruziziensis* × *B. brizantha* (Poaceae) progênies. **Sci. Agric.**, v.69, n.6, p.380-385, Nov/Dec 2012.
- GRANDONT, L.; JENCZEWSKI, E.; LLOYD, A. Meiosis and Its Deviations in Polyploid Plants. **Cytogenet Genome Res**, v. 140, p. 171-184, June 2013.
- GRANDONT, L. et al. Homoeologous chromosome sorting and progression of meiotic recombination in *Brassica napus*: ploidy does matter! **The Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1448-1463, April 2014.

- HE, F. et al. Chromosome pairing in hybrid progeny between *Triticum aestivum* and *Elytrigia elongata*. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. 2161, 10p., December 2017.
- HIGGINS, J. D. et al. The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. **GENES & DEVELOPMENT**, v. 19, p. 2488-2500, 2005.
- HOLLISTER, J. D. Polyploidy: adaptation to the genomic environment. **New Phytologist**, v. 205, n. 3, p. 1034-1039, 2015.
- ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings. **Grassland Science**, Japão, v. 55, n. 3, p. 164-170, August 2009.
- KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Org.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 16-39.
- LUKASZEWSKI, A. J. Behavior of centromeres in univalents and centric misdivision in wheat. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 129, n. 1-3, p. 97-109, June 2010.
- MACHÁČKOVÁ, P. et al. New insights into ribosomal DNA variation in apomictic and sexual *Taraxacum* (Asteraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 199, n. 4, p. 790-815, August 2022.
- MARTÍN, A.C. et al. Licensing MLH1 sites for crossover during meiosis. **NATURE COMMUNICATIONS**, v. 5, n. 1, 4580, 5p., Aug 2014.
- MENDES-BONATO, A. B. et al. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae), **Euphytica**, Holanda, v. 125, p. 419-425, 2002.
- MENDES, D. V. et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 150, n. 4, p. 441-446, 2006.
- MERCIER, R. et al. The molecular biology of meiosis in plants. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 297-327, 2015.
- MORAES, I. C. et al. Karyotype analysis and mode of reproduction of two species of *Urochloa* P. Beauv. **Crop Science**, v. 61, n. 5, p. 3415-3424, April 2021.
- NIELEN, S. et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sex. Plant Reprod.**, v. 23, p. 45-51, 2010.
- OSMAN, Kim et al. Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 190, n. 3, p. 523-544, 2011.

PADMANABAN, S. et al. Pentaploid wheat hybrids: applications, characterisation, and challenges. *Frontiers in plant science*, v. 8 (article 358), 10p, March 2017.

PAGLIARINI, M. S. et al. Microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) as a selection tool for breeding. **Genet. Mol. Res. (GMR)**, v. 11(2), p. 1309-1318, 2012.

PAULA, C. M. P; SOUZA-SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Genomic Constitution and Relationship in *Urochloa* (Poaceae) Species and Hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 57, p. 2605-2616, August 2017.

PESSOA-FILHO, M; MARTINS, A. M.; FERREIRA, M. E. Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2017.

PETERSON, R.; SLOVIN, J. P.; CHEN, C. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. **International Journal of Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 66-69, 2010.

RAGALZI, C. M. et al. Microsporogenesis associated with seed yield in *Urochloa* sexual polyploid hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n.4, 9 p., 2021.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Org.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 1-15.

RICCI, G. C. L.; PAGLIARINI, M. S.; DO VALLE, C. B. Genome elimination during microsporogenesis in two pentaploid accessions of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2364-2371, 2010.

RISSO-PASCOTTO, C. et al. Chromosome number and microsporogenesis in pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breed.**, Berlim, v.122, p.136-140, 2003.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, v.145, p.155-159, 2005.

RISSO-PASCOTTO, C; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb.(Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources and crop evolution**, v. 53, n. 1, p. 7-10, 2006.

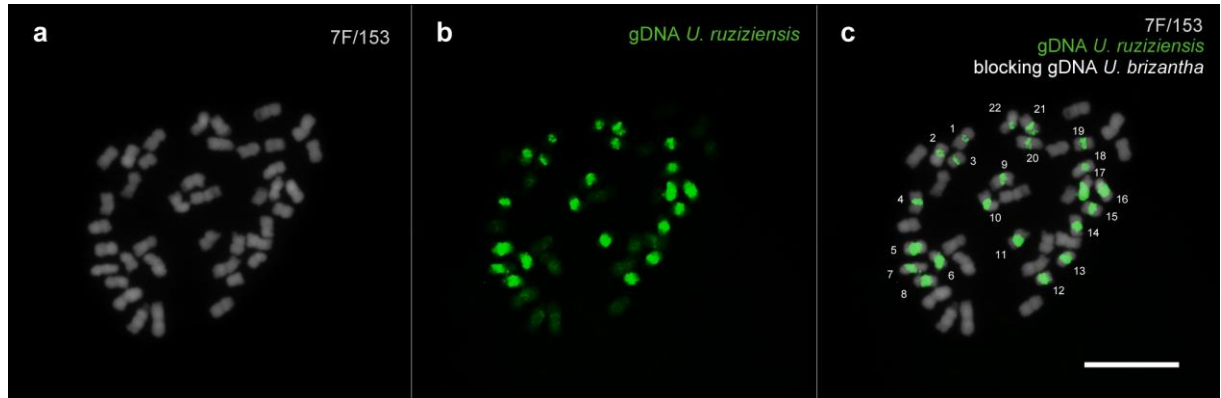
ROCHA, M. J. et al. Comparative meiosis and cytogenomic analysis in euploid and aneuploid hybrids of *Urochloa* P. Beauv. **Chromosome Research**, v. 27, n. 4, p. 333-344, Sept 2019.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. New York: Springer-Verlag, 1992. 469 p.

- SWENNE, A.; LOUANT, B. P.; DUJARDIN, M. Induction of Autotetraploid Forms in *Brachiaria ruziziensis* Germain Et Evrad (graminae) By a Colchicine Treatment. **Agronomie Tropicale**, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.
- TIMBÓ, A. L. O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.
- TOMASZEWSKA, P. et al. Complex polyploid and hybrid species in an apomictic and sexual tropical forage grass group: genomic composition and evolution in *Urochloa* (*Brachiaria*) species. **Annals of Botany**, 21p., December 2021.
- TRIVIÑO, N. J. et al. Genetic diversity and population structure of *Brachiaria* species and breeding populations. **Crop Science**, v. 57, n. 5, p. 2633-2644, July 2017.
- VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Eds.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163.
- WANG, Y.; COPENHAVER, G.P. Meiotic Recombination: Mixing It Up in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 69, p. 577-609, February 2018.
- WEN, J. et al. Characterization of interploid hybrids from crosses between *Brassica juncea* and *B. oleracea* and the production of yellow-seeded *B. napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 1, p. 19-32, February 2012.
- 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, n. 5, p. 873-881, 2009.
- WORTHINGTON, M. et al. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1117-1132, July 2016.
- XIONG, Z. et al. Chromosome inheritance and meiotic stability in allopolyploid *Brassica napus*. **G3**, v. 11, n. 2, p. 1-13, 2021.

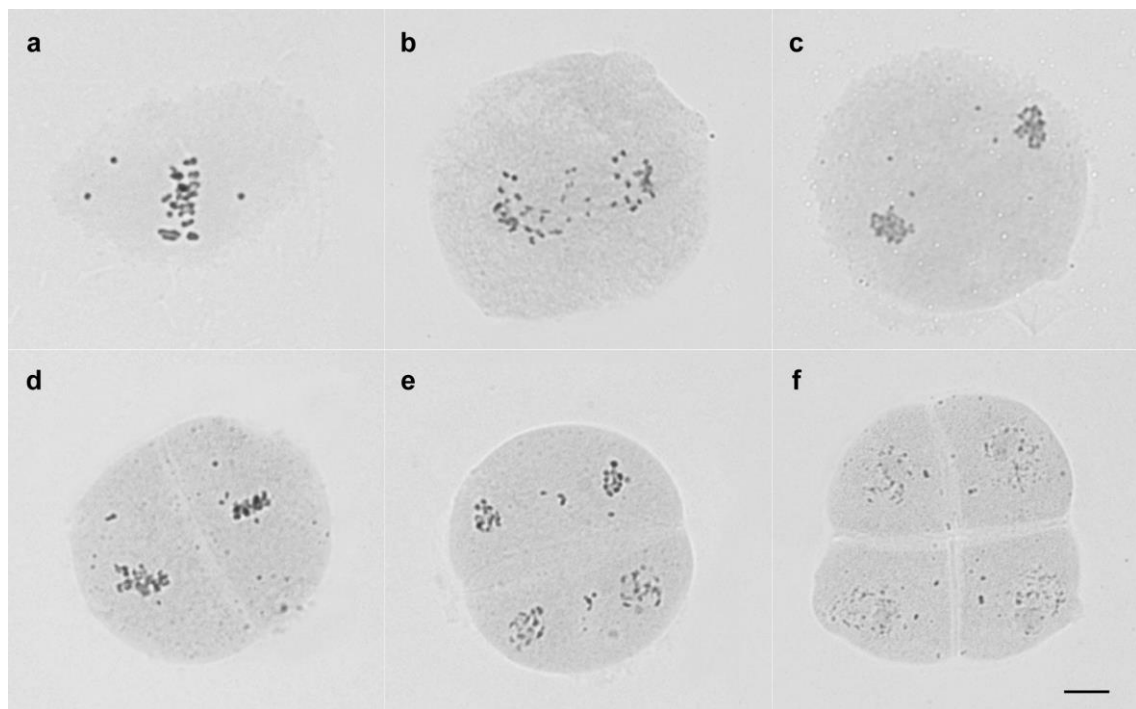
MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1 - GISH com bloqueio (1:150) em c-metáfase do híbrido interploide 7F/153.



Legenda: **a** DAPI. **b** sonda gDNA do parental *U. ruziziensis* (bloqueio gDNA do parental *U. brizantha*). **c** Sobreposição e identificação de 22 cromossomos B² marcados. Barra: 10 μ m.
Fonte: Do autor (2022).

Figura S2 - Anormalidades meióticas do parental *Urochloa brizantha* ($2n = 5x = 45$).



Legenda: **a** Metáfase I com univalentes não orientados. **b** Anáfase I com cromossomos atrasados. **c** Telófase I com micronúcleos. **d** Metáfase II com cromossomos não orientados. **e** Telófase II com cromossomos atrasados. **f** Tétrade com micronúcleos. Barra: 10 μ m.
Fonte: Do autor (2022).