



LUCAS MUÑOZ MENDES

**ANÁLISE CARIOTÍPICA EM ACESSOS DIPLOIDES DE
Urochloa brizantha e *Urochloa decumbens* E POLIPLOIDES DE
Urochloa dictyoneura (POACEAE)**

**LAVRAS-MG
2020**

LUCAS MUÑOZ MENDES

**ANÁLISE CARIOTÍPICA EM ACESSOS DIPLOIDES DE *Urochloa brizantha* e
Urochloa decumbens E POLIPLOIDES DE *Urochloa dictyoneura* (POACEAE)**

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

Prof^a Dr^a Vânia Helena Techio
Orientadora

LAVRAS-MG

2020

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

Mendes, Lucas Muñoz.

Análise cariotípica em acessos diploides de *Urochloa brizantha*
e *Urochloa decumbens* e poliploides de *Urochloa dictyoneura*
(POACEAE) / Lucas Muñoz Mendes. - 2020.

40 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

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

Bibliografia.

1. FISH. 2. Cariótipo. 3. *Brachiaria*. I. Techio, Vânia Helena.
II. Título.

LUCAS MUÑOZ MENDES

**ANÁLISE CARIOTÍPICA EM ACESSOS DIPLOIDES DE *Urochloa brizantha* e
Urochloa decumbens E POLIPLOIDES DE *Urochloa dictyoneura***

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

APROVADA EM 4 de fevereiro de 2020.

Profª Drª Vânia Helena Techio - UFLA

Profª Drª Giovana Augusta Torres - UFLA

Profª Drª Cristina Maria Pinto de Paula - UFMG

Profª Drª Vânia Helena Techio

Orientadora

LAVRAS-MG

2020

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade e estrutura concedida para a realização desse trabalho.

À Embrapa Gado de Corte e aos pesquisadores Cacilda Borges do Valle e Sanzio Carvalho Lima Barrios, pela parceria e disponibilização das plantas.

À professora Dra. Vânia Helena Techio, agradeço pelo aprendizado, dedicação, disponibilidade e atenção. Obrigado pela orientação, que foi essencial para a conclusão dessa etapa.

À todas as amigas e amigos do laboratório de Citogenética Vegetal pela convivência e companheirismo. Em especial à Nathalia, Caio, Marco Túlio, Laiane e Ana Gabriela que contribuíram enormemente e de diversas formas na execução deste trabalho.

Aos meus amigos e amigas de toda a vida Juliano, Fernanda, Tarcísio, Guilherme, Natan, Ana Helena e Karen, que mesmo distantes nunca deixaram de estar presentes.

Aos meus companheiros de ingresso no mestrado Jéfyne, Ana Luísa e Mateus.

Aos meus queridos pai, mãe, irmã e tia por todo amor e apoio, sem o qual eu não poderia executar este trabalho e avançar esta etapa. Obrigado por sempre acreditarem em mim!

RESUMO

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.), pertencente à família Poaceae, compreende aproximadamente 135 espécies e inclui plantas de grande importância econômica utilizadas como forrageiras. A caracterização citogenética do grupo descreve o número cromossômico básico de $x = 6, 7, 8, 9$ e 10 , sendo $x = 9$ o mais comum. Este estudo teve como objetivo caracterizar o cariótipo de acessos diploides de *U. brizantha* (B105) e *U. decumbens* (D04) e acessos poliploides de *U. dictyoneura* (DT158 e DT159), incluindo a morfologia e simetria cromossômicas, conteúdo de DNA e o mapeamento de sequências 5S e 35S de rDNA através da FISH. Os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* possuem $2n = 2x = 18$ cromossomos, fórmula cariotípica $9m$, cariótipo simétrico, e conteúdo de DNA de 1,79 e 1,44 pg, respectivamente. Para *U. brizantha* foram identificados dois sítios de rDNA 5S e 35S. Em *U. decumbens* foram identificados quatro sítios 5S e dois sítios 35S. Os acessos de *U. dictyoneura* possuem $2n = 4x = 24$ cromossomos, fórmula cariotípica $6m$, cariótipos simétricos, conteúdo de DNA de 2,83 e 3,12 pg (DT158 e DT159, respectivamente), oito sítios de rDNA 5S e quatro sítios 35S. A análise dos cariótipos revelou simetria e similaridade entre os cariótipos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* e entre os acessos poliploides de *U. dictyoneura*, corroborando a proposta quanto à sua natureza autopoliploide.

Palavras-chave: FISH. *Brachiaria*. Cariótipo. Citogenética.

ABSTRACT

The genus *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.), belonging to the Poaceae family, comprises approximately 135 species and includes plants of great economic importance used as forages. The cytogenetic characterization of the group describes the basic chromosome number of $x = 6, 7, 8, 9$ and 10 , with $x = 9$ being the most common. This study aimed to characterize the diploid accession karyotype of *U. brizantha* (B105) and *U. decumbens* (D04) and polyploid accessions of *U. dictyoneura* (DT158 and DT159), including chromosomal morphology and symmetry, DNA content and the mapping of 5S and 35S rDNA sequences through FISH. *U. brizantha* and *U. decumbens* diploid accessions have $2n = 2x = 18$ chromosomes, karyotype formula $9m$, symmetric karyotype, 1,79 and 1,44 pg of DNA content, respectively. For *U. brizantha* two rDNA loci 5S and 35S were identified. In *U. decumbens* four 5S sites and two 35S sites were identified. *U. dictyoneura* accessions have $2n = 4x = 24$ chromosomes, karyotypic formula $6m$, symmetric, 2,83 and 3,12 pg (DT158 and DT159, respectively), eight 5S sites and four 35S sites. The karyotype analysis revealed symmetry and similarity between the diploid karyotypes of *U. brizantha* and *U. decumbens* and between *U. dictyoneura* poliploidy accessions, reinforcing the suggestion as to the autopolyploid nature of its genome.

Keywords: FISH. *Brachiaria*. Karyotype. Cytogenetics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Aspectos botânicos, taxonômicos e importância econômica de <i>Urochloa</i>	11
2.2 Caracterização citogenética de <i>Urochloa</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local	19
3.2 Material vegetal	20
3.3 Preparo das lâminas	20
3.4 Hibridização <i>in situ</i> – FISH	20
3.5 Cariótipos e idiogramas	22
3.6 Citometria de fluxo	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Número cromossômico e tamanho do genoma	23
4.2 Análise dos cariótipos	24
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

Urochloa P. Beauv. é um gênero pertencente à família Poaceae com centro de origem no continente africano (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; SALARIATO et al., 2010) e que reúne aproximadamente 135 espécies (STEVENS, 2017). A delimitação taxonômica é controversa com relação ao gênero *Brachiaria*, tendo várias espécies sido realocadas recentemente para *Urochloa* e em outros gêneros de Poaceae (SALARIATO et al., 2010).

No Brasil, o cultivo e utilização dessas forrageiras é intimamente relacionado à produção pecuária, representando o modo mais econômico para a alimentação do gado (ASSIS et al., 2002). Nesse panorama, *Urochloa* se destaca nas regiões tropicais devido ao seu poder de adaptação, agressividade e resiliência, que permitem as plantas desse gênero persistirem mesmo sob condições desfavoráveis (VALLE; PAGLIARINI, 2009)

Devido à sua importância agropecuária, as espécies de *Urochloa* têm sido empregadas em programas de melhoramento genético em cruzamentos inter e intraespecíficos visando desenvolver plantas forrageiras mais produtivas e de alta qualidade. Dentre as estratégias, melhoristas priorizam a avaliação e seleção genótipos que reúnam características desejáveis, tais como resistência aos estresses biótico e abiótico, maior produtividade por área e melhor valor nutricional (ASSIS et al., 2002; VALLE; RESENDE; JANK, 2009).

Cumprindo papel fundamental na caracterização de genótipos para fins de análises evolutivas, taxonômicas e para o melhoramento genético, a citogenética fornece informações essenciais sobre o genoma das espécies, tais como número cromossômico, nível de ploidia, conteúdo de DNA, comportamento meiótico e viabilidade polínica. Estudos citogenéticos abrangentes como análises cariotípicas são fundamentais para se estabelecer as relações entre os cariótipos das espécies e fornecer bases para discussões a respeito dos prováveis mecanismos envolvidos na evolução cromossômica do grupo (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001).

Em *Urochloa*, estudos citogenéticos relataram o número básico cromossômico de $x= 5, 7, 8, 9, 12$ (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987) e $x=6$ (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006) sendo $x=9$ o mais frequente entre espécies do gênero (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010).

Destes estudos, observou-se que o gênero apresenta a maioria das espécies poliploides e apomíticas, com destaque para *U. brizantha* (Hoschst. Ex A. Rich) R.D. Webster ($2n=2x=18$; $2n=4x=36$; $2n=5x=45$; $2n=6x=54$) *U. decumbens* (Stapf) R.D Webster ($2n=2x=18$; $2n=4x=36$) e *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, ($2n=4x=36$; $2n=6x=54$). Dentre as diploides e com modo de reprodução sexual, *U. ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga ($2n=2x=18$) é a mais estudada. Essa espécie tem sido utilizada, após a poliploidização artificial, em cruzamentos interespecíficos com *U. brizantha* que originou o híbrido Mulato I e no cruzamento triespecífico [(*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) x (*U. brizantha*)] que gerou o híbrido Mulato II (SOUZA SOBRINHO, 2009).

Outras contagens cromossômicas, análises meióticas e anatômicas identificaram também acessos diploides e sexuais de *U. brizantha* e *U. decumbens* no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Esses genótipos também possuem potencial para serem usados no programa de melhoramento, porém ainda carecem de estudos mais aprofundados (NIELEN et al., 2010; RICCI et al., 2011).

Outra espécie que vem recebendo atenção é *U. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf, uma forrageira importante utilizada em regiões úmidas e sub-úmidas dos trópicos, sendo bem adaptada a solos ácidos, mal drenados e de baixa fertilidade (LASCANO; EUCLIDES, 1996) e que apresenta tolerância à ação das cigarrinhas-das-pastagens (KELLER-GREIN et al., 1996). Originalmente, foi descrito seu número cromossômico como $2n=6x=42$, entretanto, no estudo das configurações meióticas, Risso-Pascotto et al. (2006) observaram pela primeira vez a existência de número básico $x=6$ em *Urochloa*. As autoras observaram comportamento autotetraploide em cinco acessos de *U. dictyoneura*, com $2n=4x=24$ cromossomos, revelando uma grande limitação na inclusão desses acessos em programas de melhoramento para cruzamentos com espécies com número básico $x=9$ e $x=7$. Por ser relativamente próxima à *U. humidicola* ($2n = 4x = 36$; $2n = 6x = 54$; $2n = 8x = 72$), outra espécie comercialmente importante, a hibridização entre as duas pode, eventualmente, ser possível com o uso de um acesso hexaploide sexual de *U. dictyoneura* (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Em *Urochloa*, a maioria dos estudos citogenéticos envolve análises meióticas e se concentram nas espécies poliploides e seus híbridos. As análises citogenéticas moleculares empregando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para a diferenciação dos cariótipos também estão restritos às espécies *U. brizantha* (4x), *U. decumbens* (4x) e *U. ruziziensis* (2x) e evidenciaram diferenças nos números de sítios de rDNA 5S e 45S/35S

(AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NIELEN et al., 2010; NANI et al., 2016).

Para os genótipos diploides, há necessidade de um maior detalhamento de seus complementos cromossômicos, sendo esse conhecimento útil para estudos evolutivos, taxonômicos e para fins de melhoramento genético. Análises recentes obtidas por meio da técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH) por Corrêa et al., (2020) revelaram alta homologia entre os genomas de *U. brizantha* e *U. decumbens*, sugerindo baixo tempo de divergência entre elas. Os autores utilizaram sondas genômicas de genótipos diploides dessas duas espécies nos cromossomos dos citótipos tetraploides, produzindo padrões de marcação similares. Com base nesses resultados, foi proposta a composição genômica de B¹B¹ e B¹'B¹' para os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*, respectivamente, sendo ambas apontadas como doadoras do genoma B¹ (ou B¹') encontradas nos tetraploides (BBB¹B¹ e B¹B¹B²B², respectivamente).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi ampliar as informações sobre o cariótipo dos acessos diploides de *U. brizantha*, *U. decumbens* e poliploides de *U. dictyoneura*, incluindo a morfologia cromossômica e o mapeamento das sequências de rDNA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos, taxonômicos e importância econômica de *Urochloa*

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (que inclui algumas espécies de *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) pertence à tribo Paniceae, subfamília Panicoideae e família Poaceae. Sua situação taxonômica envolve controvérsias devido ao compartilhamento de diversas características morfológicas, anatômicas e fisiológicas com o gênero *Brachiaria*, tornando sutis suas delimitações como grupos isolados (CLAYTON; RENVOIZE, 1986; MORRONE; ZULOAGA, 1992).

Urochloa foi descrito como gênero por Palisot de Beauvois (1812), baseada em apenas uma espécie, *U. panicoides* P. Beauv. Posteriormente, diversos autores (Hughes, 1923; Stapf, 1920; Henrard, 1941) utilizaram caracteres morfológicos como a posição abaxial da espiguetta para transferir diversas espécies de *Panicum* para *Urochloa* (TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005). Espécies de *Urochloa* foram descritas como anuais ou

perenes, com inflorescências racemosas e espiguetas dispostas individualmente ou em pares, mas com gluma oposta à ráquis, em posição abaxial (CLAYTON; RENVOIZE, 1986).

Brachiaria foi descrito, inicialmente, por Trinius (1826) como um grupo pertencente à *Panicum* L. Grisebach, posteriormente em 1853, elevou *Brachiaria* ao nível de gênero (SALARIATO et al., 2009) e em 1903, Nash definiu como características diagnósticas do grupo a orientação das espiguetas e posição da gluma inferior (MORRONE; ZULOAGA, 1992). As espécies de *Brachiaria* foram descritas como gramíneas anuais ou perenes com inflorescências em forma de espiguetas, dispostas em racemos unilaterais ao longo de uma ráquis central filiforme. As espiguetas são sésseis ou pediceladas, individuais ou em pares, com gluma inferior adjacente à ráquis, em posição adaxial (CLAYTON; RENVOIZE, 1986).

A confiabilidade dos caracteres utilizados como limites taxonômicos entre *Brachiaria* e *Urochloa*, baseados principalmente na orientação de suas espiguetas foi questionada por diversos autores. Um dos argumentos é que a diferença na orientação das espiguetas (adaxial, com gluma inferior adjacente à ráquis em *Brachiaria*; abaxial, com gluma inferior oposta à ráquis em *Urochloa*) é uma característica dificilmente diferenciada quando as espiguetas se apresentam em pares, sendo apenas válida para espiguetas individuais em ramos primários (MORRONE; ZULOAGA, 1992). Além disso, foi demonstrado, através de filogenias moleculares utilizando região ITS (TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005) e genes cloroplastidiais (SALARIATO et al., 2010), que os dois gêneros não se consolidam como clados distintos, apresentando relações de parentesco mais complexas e diferentes do que revelavam as caracterizações baseadas em elementos morfológicos e anatômicos.

Como resultado, em abordagens mais recentes baseadas em características morfológicas, *Brachiaria* é restrita à apenas três espécies, *B. eruciformis* (Mez & K. Schwmm) H. Scholz, *B. malacodes* (Mez & K. Schwnn) H. Scholz e *B. schoenfelderi* C.E. Hubb. & Schweick, com o restante das espécies sendo transferidas para *Urochloa*, aumentando drasticamente o número de representantes do gênero (SALARIATO et al., 2009). Atualmente, *Urochloa* compreende cerca de 135 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (STEVENS, 2017).

Em nível interespecífico também há controvérsias e equívocos quanto a correta distinção das espécies. Durante a classificação de espécies de *Urochloa* realizado por Renvoize et al. (1996), foi encontrada dificuldades na distinção entre *U. brizantha* e *U. decumbens*, sendo sugerida a reidentificação de *U. decumbens* cv. Basilisk como *U. brizantha*. Contudo, Triviño et al. (2017), em estudo de diversidade genética e estrutura

populacional baseado em microssatélites, determinaram que a cultivar Basilisk é de fato mais próxima dos outros acessos tetraploides de *U. decumbens*.

Mass (1996) atribuiu a mistura de materiais genéticos – germoplasmas - como a causa para a confusão a respeito da identidade dos acessos. *U. dictyoneura* cv. Llanero é, de fato, *U. humidicola*, e a maior parte da *U. humidicola* comercializada nos trópicos se refere, na verdade, a *U. humidicola* cultivar Tully (VALLE; PAGLIARINI, 2009)

A chegada do gênero no Brasil ocorreu em 1952, com a introdução de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster. Porém apenas a partir de 1965, ocorreu seu estabelecimento em grande escala, após as importações de *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga, *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster e de uma grande quantidade de sementes, se espalhando pelas regiões Centro-Oeste e Sudeste do país, e principalmente na Amazônia. Nos anos 70 houve um grande aumento das áreas cultivadas de pastagens com as plantas do gênero *Urochloa*, principalmente com as espécies que obtiveram boa adaptação aos solos e clima brasileiros, como *U. decumbens*, *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002).

Atualmente, as espécies de *Urochloa* mais utilizadas para a formação de forragens no Brasil, em ordem decrescente, são: *U. decumbens*, *U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. ruziziensis*, *U. dictyoneura* (Fig. & De Not.) Veldkamp, *U. mutica* (Forssk) T.Q. Nguyen e *U. arrecta* (Hack. Ex T. Durand & Schinz) Morrone & Zuloaga (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002).

O cultivo de pastagens é a base para a criação de bovinos para corte e produção de leite. A pecuária está entre as atividades mais rentáveis do Brasil, movimentando, em 2016, R\$400 bilhões, o que representa cerca de 30% do PIB do agronegócio e 7% do PIB nacional. O Brasil se consolida como o segundo maior produtor de carne bovina do mundo, contando com 209,13 milhões de cabeças de gado, ocupando 167 milhões de hectares (ABIEC, 2016).

O tipo de forrageira a ser utilizado na alimentação do gado possui profundo impacto no seu crescimento, sendo que a escolha da espécie ideal deve equilibrar fatores como conteúdo protéico, quantidade de massa seca e palatabilidade. A capacidade de adaptação da espécie ao ambiente em que se deseja cultivá-la também deve ser considerada, incluindo elementos como a tolerância à seca, frio e resistência à doenças e pragas (VALLE; RESENDE; JANK, 2009). As espécies forrageiras mais comumente utilizadas no Brasil pertencem aos gêneros *Panicum* (capim-colonião), *Pennisetum* (capim-elefante), *Melinis* (capim-gordura), *Hyparrhenia* (capim-jaraguá) e, principalmente, *Urochloa*, que

representava, em 2006, 85% das áreas de pastagens do país (IBGE, 2006).

Apesar de mais de três décadas de uma bem sucedida adaptação e uso extensivo de *Urochloa* em pastagens, suas cultivares apresentam limitações agrônômicas individuais: *U. decumbens* cv. Basilisk apresenta susceptibilidade à cigarrinha-das-pastagens (*Mahanarva spectabilis*) e, em algumas ocasiões, pode ser hospedeira do fungo *Phytophthora chartarum*, que quando ingerido por tempo prolongado pode causar prejuízos ao gado; *U. brizantha* cv. Marandu é resistente à cigarrinha-das-pastagens, e muitas vezes utilizada em substituição à *U. decumbens*, no entanto é pouco adaptada a solos pobres, ácidos e mal drenados, além de ser susceptível ao fungo *Rhizoctonia*; *U. humidicola* se adapta bem em solos pobres e mal drenados, porém apresenta baixa resistência à seca e, apesar de tolerante à cigarrinha-das-pastagens, não é resistente à ela; *U. dictyoneura* apresenta excelente adaptação à solos ácidos e de baixa fertilidade, porém produz forragem com qualidade inferior às demais espécies e ainda é pouco cultivada no Brasil (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002; VALLE; RESENDE; JANK, 2009).

Diante disso surgiu a demanda por um programa de melhoramento que reunisse as características desejáveis das diversas espécies e cultivares do gênero para as condições edafoclimáticas brasileiras, tais como a adaptação a solos ácidos, produtividade elevada, bom valor nutricional e resistência à cigarrinha e fungos (MILES et al., 2004). Nesse contexto, a Embrapa Gado de Corte – Campo Grande, MS e Gado de Leite – Juiz de Fora MG vem conduzindo programas de melhoramento focando a produção de híbridos interespecíficos com as principais espécies de *Urochloa* (VALLE; RESENDE; JANK, 2009).

Entre os fatores a serem considerados em programas de melhoramento genético, a citogenética se mostra como uma ferramenta fundamental, pois possibilita determinar o nível de ploidia, evidenciar anormalidades meióticas que gerem gametas inviáveis, elucidar problemas de fecundação e de produção de sementes em híbridos, apontando os genitores compatíveis (VALLE; RESENDE; JANK, 2009).

O modo de reprodução das espécies se trata de outra informação importante a ser considerada quando se pretende realizar cruzamentos em um programa de melhoramento genético. *Urochloa* é um gênero predominantemente poliploide e apomítico. A apomixia é uma forma de reprodução assexuada com geração de sementes e está associada à poliploidia. Esse modo de reprodução garante a manutenção do vigor híbrido em conjunto com todas as vantagens da propagação por sementes (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

A realização de cruzamentos artificiais com plantas sexuais é uma maneira de

explorar as características desejáveis que se apresentem nos indivíduos apomíticos, e para tal é necessário que se iguale o nível de ploidia dos genitores, o que pode ser realizado através da haploidização das espécies apomíticas tetraploides ou duplicação do número cromossômico das espécies diploides sexuais (PEREIRA et al., 2012). Em *Urochloa*, já foi realizada a duplicação cromossômica da espécie *U. ruziziensis* ($2n=18$), que é a única entre as cultivadas no Brasil que é diploide e exclusivamente sexual, permitindo a realização dos cruzamentos e a geração de variabilidade e viabilizando a seleção. Em *U. ruziziensis*, a duplicação cromossômica foi obtida por meio da imersão de sementes germinadas em solução de colchicina, resultando em plantas autotetraploides artificiais (SWENNE; LOUANT; DUJARDIN, 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014) com produção de grãos de pólen viáveis (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017). Alguns cruzamentos, provenientes dessa estratégia de melhoramento, também já foram obtidos no gênero com o lançamento dos híbridos Mulato I (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandu) e Mulato II [(*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) x *U. brizantha*] (SOUZA SOBRINHO, 2009).

Além disso, existem identificados acessos diploides e sexuais de *U. brizantha* e *U. decumbens* no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Assim, esses genótipos possuem potencial para serem trabalhados em programas de melhoramento, visando a poliploidização (PINHEIRO, 2000).

2.2 Caracterização citogenética de *Urochloa*

A citogenética fornece informações básicas essenciais e dispõe de várias ferramentas para auxiliar na distinção entre grupos que não podem ser facilmente reconhecidos por sua morfologia (DOBIGNY et al., 2004) sendo as mais clássicas: número, tamanho e morfologia dos cromossomos, presença de constrições secundárias, tamanho do genoma e os padrões de distribuição da heterocromatina (GUERRA, 2012).

Apesar de ser o parâmetro mais simples do cariótipo, o número cromossômico é o dado citotaxonomico mais conhecido para quase todas as famílias vegetais. Constitui a maneira mais simples, rápida e barata para se obter informações preliminares sobre o genoma de uma espécie (GUERRA, 2008) sendo eficaz para ampliar o entendimento sobre as relações genéticas entre as espécies e a maneira em que elas divergem umas das outras (GUERRA, 2012).

Em *Urochloa*, estudos citogenéticos mostram predominantemente $x=9$ como

número básico cromossômico (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; SPIES et al., 1991; VALLE; SINGH; MILLER, 1987), existindo relatos dos números cromossômicos $x=5, 6, 7, 8, 10$ e 12 (SHARMA; SHARMA, 1979; SHARMA; KOUR, 1980; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006).

Os números cromossômicos das espécies descritos na literatura foram revisados por Valle e Pagliarini (2009) e foram encontradas espécies variando de $2n=14$ a $2n=90$, com variação intraespecífica e diferentes níveis de ploidia, com tendência à tetraploidia. As espécies com maior importância econômica apresentam: *U. brizantha* ($2n=2x=18$, $2n=4x=36$, $2n=5x=45$ ou $2n=6x=54$), *U. decumbens* ($2n=2x=18$, $2n=4x=36$ ou $2n=5x=45$), *U. ruziziensis* ($2n=2x=18$) e *U. humidicola* ($2n=4x=36$ ou $2n=6x=54$).

Em 2010, Ishigaki et al. estimaram o tamanho do genoma, por meio da citometria de fluxo, de cinco cultivares de quatro espécies de *Urochloa*: *U. ruziziensis*, *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. humidicola*, para avaliar sua utilização em cruzamentos. A variação nos valores de C foi observada entre as cultivares, aumentando conforme o aumento da ploidia. A diploide sexual *U. ruziziensis* apresentou o menor valor de C (0,62 pg), seguida das poliploides apomíticas (*U. brizantha* tetraploide 1,43 pg; *U. decumbens* tetraploide 1,66 pg; *U. brizantha* pentaploide 1,78 pg e *U. humidicola* hexaploide 1,99 pg). Os resultados encontrados pelos autores geraram informações necessárias para futuramente se investigar as relações evolutivas entre essas espécies, indicando que o tamanho do genoma depende do nível de ploidia e modo de reprodução.

Apesar da existência de hibridação entre as espécies *U. decumbens*, *U. ruziziensis* e *U. brizantha*, ainda existem poucas informações sobre as relações de parentesco e diferenças genômicas entre as espécies de *Urochloa*. Análises morfológicas discriminantes foram realizadas para verificar a proximidade entre as espécies de *Urochloa*. Em um estudo baseado na morfologia floral, Renvoize et al. (1996) classificaram 83 espécies do gênero em nove grupos diferentes e o padrão de agrupamento observado alocou *U. decumbens*, *U. ruziziensis* e *U. brizantha* em um mesmo grupo taxonômico, enquanto *U. dictyoneura* e *U. humidicola* foram atribuídas a um grupo distinto, indicando relações genéticas mais próximas entre elas. Posteriormente, tal padrão de parentesco foi corroborado a partir de estudos citogenéticos (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017) ao elucidarem a identificação e relação genômica por meio de técnicas de hibridização genômica *in situ* fluorescente (GISH).

Paula et al. (2017) propuseram a constituição genômica de B^2B^2 , $B^1B^1B^2B^2$ e BBB^1B^1 para *U. ruziziensis* ($2x$), *U. decumbens* ($4x$), e *U. brizantha* ($4x$), respectivamente,

sendo os genomas B, B¹ e B² considerados homeólogos com menos afinidade entre os genomas B e B². Posteriormente, no estudo de Corrêa et al. (2020) foram investigadas as interações genômicas entre as espécies diploides *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* e as relações de ancestralidade com os citótipos tetraploides.

Entre as diploides, a hibridização completa do DNA genômico de *U. brizantha* 2x em todos cromossomos de *U. decumbens* 2x indicou que as duas espécies possuem alto grau de homologia entre seus genomas. Entretanto, a GISH recíproca revelou 65.43% de homologia, sugerindo que *U. brizantha* 2x possui uma maior diversidade de sequências repetitivas (CORRÊA et al., 2020) Uma vez que a maior porção do DNA de plantas (e eucariotos em geral) é formada por blocos de sequências repetitivas e que em Poaceae essas sequências podem compor até 85% do genoma (FLAVELL et al., 1993; LING et al., 2013; SCHNABLE et al., 2009), a diferenciação em grande escala do genoma (passível de ser observada em nível cromossômico) entre táxons distintos necessariamente envolve variação na frequência das várias classes de repeats (BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015; LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012). Nesse contexto, é possível que *U. brizantha* 2x possua a maior parte dos repeats que estão presentes em larga escala em *U. decumbens* 2x, mas tenha uma variedade maior que não está representada no genoma deste (CORRÊA et al., 2020).

Os resultados obtidos por Corrêa et al. (2020) mostraram também a alta homologia cromossômica do DNA genômico dos acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* nos cromossomos de *U. brizantha* e *U. decumbens* tetraploides e entre si respectivamente. Apesar da afinidade sutilmente maior dos acessos tetraploides com o genoma de *U. brizantha* 2x, não se exclui a possibilidade da participação do DNA genômico de *U. decumbens* 2x na doação de um dos genomas das tetraploides *U. brizantha* e *U. decumbens*. Dessa forma, foi proposta a composição genômica de B¹B¹ e B¹B¹' para os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*, revelando baixo tempo de divergência entre elas, sendo ambas apontadas como doadoras no processo de alopoloidização dos acessos tetraploides.

Ambiel et al. (2008) encontraram similaridade genética entre acessos de germoplasma e cultivares comerciais de espécies de *Urochloa* através de marcadores RAPD. Neste estudo foram gerados três agrupamentos distintos, o primeiro contendo todas os acessos de *U. ruziziensis*, seguido por um grupo formado por todos os acessos de *U. decumbens* e três acessos de *U. brizantha* e um terceiro grupo que incluía acessos comerciais de *U. brizantha* e a cultivar comercial *U. decumbens* cv. Basilisk. O índice de

variabilidade genética entre as espécies foi considerado baixo, sendo inferior a valores determinados em algumas espécies autógamas.

Em 2017, Triviño et al. investigaram a diversidade genética e a estrutura populacional das espécies de *Urochloa*. Os resultados demonstraram uma próxima relação entre as importantes espécies comerciais *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, sendo *U. decumbens* mais proximamente relacionada a *U. ruziziensis*. Também foi identificada a próxima relação entre *U. dictyoneura* e *U. humidicola*.

Técnicas citomoleculares que apresentam um maior grau de detalhamento dos cromossomos são primordiais para se avaliar taxóons que possuem cariótipos muito similares, permitindo desta forma a detecção de variação entre os genomas. Assim, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido amplamente empregada para detectar sequências específicas de DNA, em núcleos interfásicos ou cromossomos metafásicos (BARTLETT, 2008). As sequências mais utilizadas como sondas em estudos citogenéticos são os genes ribossomais e o DNA telomérico (ROA; GUERRA, 2015). A região onde se encontra alocado o rDNA 45S/35S (18S- 5.8S-26S) é chamada de região organizadora do nucléolo (RON), devido à sua associação com a produção de rRNAs durante a intérfase (LYSAK; LEXER, 2006). Os genes de rDNA 45S/35S, que são correspondentes às RONs, estão localizados geralmente nas extremidades dos braços curtos cromossomais e associados à constrições secundárias (ROA; GUERRA, 2012), enquanto os genes de rDNA 5S são comumente intersticiais (LYSAK; LEXER, 2006).

O mapeamento físico de rDNA em cromossomos espécies de *Urochloa* foi possível com o emprego da FISH. Em 2010 foi realizado por Nielen et al., a localização das sequências de rDNA 5S e 45S, associada à cariotipagem convencional, em um acesso sexual diploide e um acesso apomítico tetraploide de *U. brizantha*. Os resultados mostraram que o acesso diploide apresentou número cromossômico $2n=18$, com fórmula cariotípica $3M+5SM+1T$. No acesso tetraploide foi observado $2n=4x=36$ e fórmula cariotípica $8M+1SM$. Nesse estudo, o número de sítios de rDNA 5S não correspondeu à ploidia dos acessos, visto que os autores esperavam o dobro do número de sítios de rDNA no acesso tetraploide em relação ao acesso diploide. No acesso diploide o sítio de rDNA 5S foi observado na região intersticial de no par cromossômico 8, enquanto no acesso tetraploide, três pares contendo sítio de rDNA 5S foram detectados, não tendo sido possível a atribuição distinta dos pares cromossômicos.

Akiyama et al. (2010) utilizaram diferentes acessos de *U. brizantha* (4x e 5x), *U. ruziziensis* (2x), *U. humidicola* (6x) e do híbrido Mulato (4x – originado do cruzamento de

U. decumbens e *U. ruziziensis*) em um estudo de rDNA com o uso da FISH para observar diferenças no número e morfologia dos sítios de rDNA. Neste trabalho foi observado que a variação do número de sítios de rDNA 45S, (quatro para *U. brizantha* (4x), cinco para *U. brizantha* (5x), seis para *U. humidicola* (6x), dois para *U. ruziziensis* (2x) e quatro para o híbrido Mulato (4x)) correspondeu aos níveis de ploidia em todas as espécies, porém o mesmo não foi observado em relação aos loci de rDNA 5S, pois foram registrados seis e quatro sítios para *U. brizantha* (4x), cinco para *U. brizantha* (5x), seis para *U. humidicola* (6x), quatro para *U. ruziziensis* (2x) e quatro para o híbrido Mulato (4x). Tais resultados indicam a coexistência de diferentes genomas nas espécies que evidenciam a aloploidia (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010).

Nani et al. (2016), caracterizaram o cariótipo de *U. brizantha* (4x), *U. decumbens* (4x) e *U. ruziziensis* (2x), com o mapeamento físico dos sítios de rDNA 5S e 45S. Os resultados revelaram maiores detalhes a respeito dos sítios. Em *U. ruziziensis*, sinais de rDNA 5S foram localizados no braço curto do par cromossômico 2 e no braço longo do par 6. Sítios de rDNA 45S encontraram-se no braço curto do par cromossômico 8, colocalizados com bandas CMA. *U. brizantha* apresentou sítios de rDNA 5S nos pares cromossômicos 8 e 15, ambos no braço longo, sendo tanto ausente quanto presente em estado de hemizigose no último. No par 12, o sinal foi detectado no braço curto. Os sinais de rDNA 45S foram encontrados nos braços curtos dos pares 7 e 13. Em *U. decumbens*, sinais de rDNA 5s foram localizados nos pares 4, 7, 10 e 13, todos nos braços cromossômicos longos, exceto no par 7. No par 4, o sítio estava em hemizigose. Os sinais de rDNA 45S foram detectados no braço curto dos cromossomos 9 e 11, sendo o par 11 heteromórfico em relação ao seu comprimento total e morfologia. Todos os sítios detectados estavam localizados na região intersticial-proximal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética Vegetal, localizado no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Material vegetal

Foram avaliados acessos diploides de *U. brizantha*, *U. decumbens* e acessos poliploides de *U. dictyoneura* (Tabela 1). As plantas são provenientes do Banco de Germoplasma de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte Campo Grande – MS (Coordenadas: latitude: 20° 25'307" S longitude: 54° 43'367" W) e atualmente são mantidas em vasos, em casa de vegetação no Departamento de Biologia da UFLA.

Tabela 1 - Identificação dos acessos de *Urochloa*

Espécie	Acessos	Procedência
<i>U. brizantha</i>	B105	Quênia
<i>U. decumbens</i>	D04	Etiópia
<i>U. dictyoneura</i>	DT 158 e Dt 159	Etiópia

3.3 Preparo das lâminas

Pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com ciclohexamida 12,5 mg L⁻¹, por 2 horas a temperatura ambiente, fixadas em Carnoy (3 etanol : 1 ácido acético) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

As raízes fixadas foram lavadas três vezes em água destilada por cinco minutos e a região meristemática será transferida para solução enzimática contendo celulase “Onozuka R10” (0,7%), celulase Sigma-Aldrich (0,7%), pectoliase Sigma-Aldrich (1%) e citohelicase Sigma-Aldrich (1%) por 1 h e 20 minutos, a 37°C. Após a digestão, os meristemas foram macerados sobre lâmina em solução fixadora usando pinças de ponta ultrafina e finalmente secas ao ar.

A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de luz e aquelas contendo as melhores metáfases, com cromossomos espalhados e sem sobreposição, foram selecionadas para a FISH.

3.4 Hibridização *in situ* – FISH

O mapeamento das regiões de rDNA foi feito nos acessos diploides de *U. brizantha*

e *U. decumbens* e nos acessos poliploides de *U. dictyoneura* por meio da FISH. Foram utilizadas como sondas as seqüências de rDNA 5S (pTa794) e 35S (pTa71; 18S-5.8S-25S), provenientes do genoma de *Triticum aestivum* Linnaeus.

As sondas de rDNA 35S e 5S foram marcadas com biotina e digoxigenina, respectivamente, por meio da reação “nick translation”. Cada reação de marcação teve 1 µg de DNA da sonda, tampão de reação (0.5 M Tris HCl pH 7,5, 50mM MgCl₂), nucleotídeos (dATP, dCTP e dGTP a 0.5 mM cada), nucleotídeo marcado (0.33 mM dTTP + 0.16 mM dUTP marcado com digoxigenina ou biotina), 0.02 U de DNase I e 0.5 U de DNA Polimerase I em um volume final de 25 µL.

As preparações cromossômicas foram rapidamente fixadas em solução de etanol ácido acético na proporção de 3:1 e secas ao ar. Foram aplicados 100 µL de solução formamida 70% em SSC 2x nas lâminas que após cobertas com lamínula 20x40 mm foram colocadas em estufa a 85 °C por 1 min e 10 seg para desnaturação do DNA. Em seguida as lâminas foram imediatamente imersas em álcool etílico 70% gelado e posteriormente em álcool 90% e 100% e secas ao ar. A mistura de hibridização consistirá de 50% formamida, 2xSSC, 10% dextran sulfato, 80 ng/µL de DNA das sondas marcadas de rDNA de 45S e 5S. As sondas foram desnaturadas a 95-98 °C, por 10 min e imediatamente resfriadas em gelo. Foram aplicadas 20 µL da mistura de hibridização às preparações cromossômicas que foram seladas com lamínula. A hibridização foi realizada a 37 °C por 48h, seguida por lavagens sob agitação em 2xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente, em 2xSSC a 42 °C por 10 minutos; 2xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente e TNT por 5 minutos. A detecção das sondas foi feita com os anticorpos anti-digoxigenina conjugado com rodamina e anti- biotina conjugado com FITC, em tampão TNB, por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida. Após remoção da lamínula as lâminas foram lavadas três vezes, 5 minutos cada, em TNT, à temperatura ambiente, sob agitação. Após secagem ao ar as lâminas foram montadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI.

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

3.5 Cariótipos e idiogramas

Os dados morfométricos dos cromossomos das espécies avaliadas foram obtidos a partir da análise de três metáfases. As medições e a montagem do cariótipo foram feitas com o software Drawid (KIROV et al., 2017). Os parâmetros usados foram: tamanho do braço curto (s) e longo (l) dos cromossomos; comprimento total do cromossomo i ($CT_i = l + s$); o comprimento relativo de cada cromossomo ($CR = CT_i/CTLH \times 100$), relação de braços ($RB = l/s$); o índice centromérico ($IC = s/CT_i \times 100$), o comprimento total do lote haploide ($CTLH = \sum CT_i/2$). A nomenclatura usada para descrever a morfologia cromossômica foi feita com base em Levan et al. (1964) e a localização dos sítios de rDNA determinada por Heslop-Harrison and Schwarzacher (2011). A simetria cariotípica foi classificada segundo Stebbins (1971), que avalia as simetrias inter e intracromossomal e Eroglu (2015). Esse último autor propõe o uso da fórmula ($S/A_i = (1 \times M) + (2 \times SM) + (3 \times ST) + (4 \times T)/2n$) que inclui a morfologia cromossômica segundo Levan et al. (1964) e o índice centromérico. Os cariótipos são classificados em totalmente simétrico ($S/A_i = 1.0$), simétrico ($1.0 < S/A_i \leq 2.0$), entre simétrico e assimétrico ($2.0 < S/A_i \leq 3.0$), assimétrico ($3.0 < S/A_i \leq 4.0$) e totalmente assimétrico (4.0) (Eroglu 2015). O processamento das imagens, cariogramas e idiogramas foram feitos com auxílio do software Photoshop CS6®.

3.6 Citometria de fluxo

Para a quantificação do DNA dos acessos de *U. dictyoneura*, três amostras de 20-30 mg de tecido foliar jovem de cada espécie foram maceradas com a mesma quantidade de *Pisum sativum* L. (padrão interno de referência – Quantidade de DNA $2C = 9,09$ pg) em placa de petri contendo 1 mL de tampão $MgSO_4$ gelado para obter a suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). Em seguida, 25 μ L de iodeto de propídio foram adicionados à suspensão. Para cada amostra foram quantificadas pelo menos 10.000 núcleos. A quantificação do DNA dos acessos de *U. brizantha* e *U. decumbens* foi realizada por Corrêa et al. (2020).

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas foram obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.9. O conteúdo de DNA foi estimado em picogramas (pg).

4 RESULTADOS

4.1 Número cromossômico e tamanho do genoma

Para os acessos diploides de *U. brizantha* (B105) (Figura 1-B) e *U. decumbens* (D04) foram confirmados 18 cromossomos (Figura 1-A) e conteúdo de DNA de 1.79 pg e 1.44 pg (Tabela 2), respectivamente. Os acessos tetraploides de *U. dictyoneura* (DT158 e DT159) (Figuras 1-D, 1-C) apresentaram 24 cromossomos e conteúdo de DNA de 2.83 pg e 3.12 pg (Tabela 2), respectivamente.

Figura 1. Metáfases de (A) *U. decumbens* D04 ($2n = 2x = 18$), (B) *U. brizantha* B105 ($2n = 2x = 18$), (C) *U. dictyoneura* DT158 ($2n = 4x = 24$) e (D) *U. dictyoneura* DT159 ($2n = 4x = 24$). Em verde: sítios de rDNA 35S; Em vermelho: sítios de rDNA 5S.

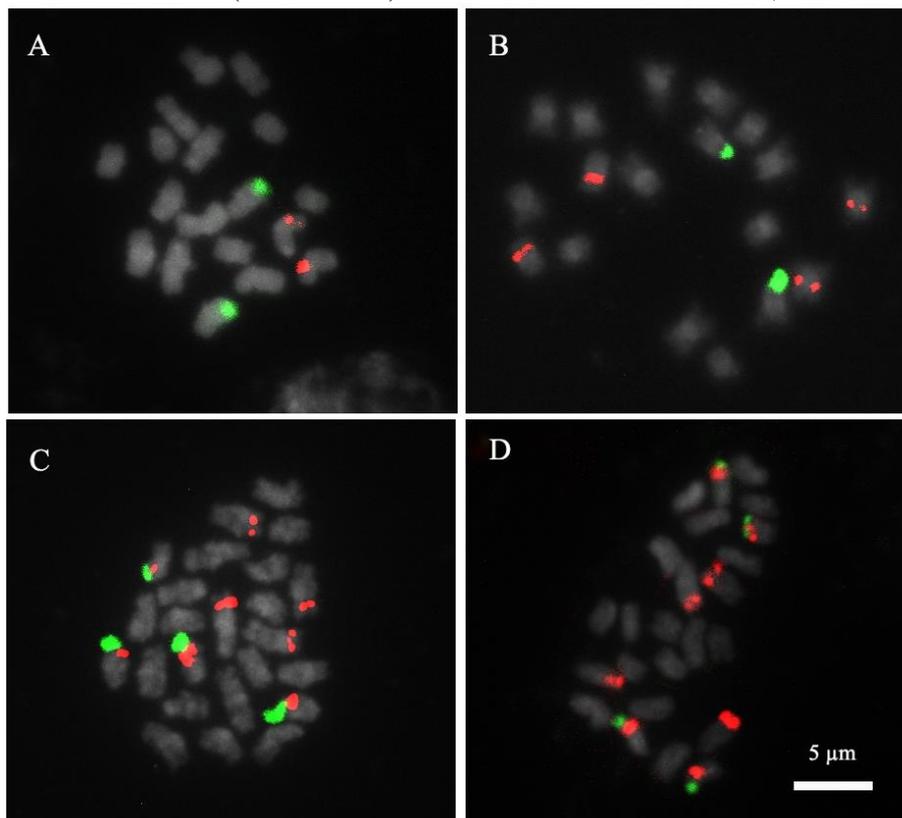


Tabela 2. Conteúdo de DNA e comprimento total do lote haploide (CTLH) em espécies de *Urochloa*.

Acesso	Quantidade de DNA (pg)	Valor C (Mbp C ⁻¹)	Valor Cx (Mbp Cx ⁻¹)	Nível de ploidia	CTLH (μm)
<i>U. decumbens</i> (D04)	1.44 pg*	704	704	2x	25.16
<i>U. brizantha</i> (B105)	1.79 pg*	870	870	2x	26.34
<i>U. dictyoneura</i> (DT158)	2.83 pg	1384	691	4x	39.29
<i>U. dictyoneura</i> (DT159)	3.12 pg	1526	763	4x	30.58

Mbp = Mega pares de bases. Valor C = conteúdo de DNA gamético. Valor Cx = Conteúdo de DNA por genoma. *Corrêa et al. (2020)

4.2 Análise dos cariótipos

A fórmula cariotípica encontrada para as espécies diploides *U. decumbens* e *U. brizantha* foi 9m conforme classificação de Levan (1964) e cariótipos simétricos, pois foram enquadrados na categoria 1A de Stebbins (1971) e no índice $S/A_i = 1$, de acordo com os critérios de Eroglu (2015). Em *U. decumbens*, o comprimento do menor e maior cromossomos representam 8.45% e 13.74% do comprimento total do lote haploide (Tabela 3). Para *U. decumbens* foram identificados quatro sítios de rDNA 5S nos pares cromossômicos 6 e 8, ambos em região intersticial, e dois sítios rDNA 35S na região terminal do par cromossômico 2 (Figura 2-B)

Tabela 3. Morfometria dos cromossomos de *Urochloa decumbens* (acesso D04): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (S), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR) em μm , razão entre braços (RB), índice centromérico (IC) e Comprimento total do lote haploide (CTLH). Morfologia cromossômica determinada segundo Levan et al. (1964). ¹ Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 35S; ² cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S.

Pares	L	S	CTi	CR	RB	IC	Morfologia
1	1.92	1.54	3.46	13.74%	1.25	44.5	m
2	1.78	1.42	3.20	12.71%	1.25	44.4	m ¹
3	1.80	1.28	3.08	12.24%	1.40	41.7	m
4	1.63	1.29	2.92	11.61%	1.27	44.1	m
5	1.62	1.21	2.83	11.25%	1.34	42.3	m
6	1.47	1.26	2.73	10.84%	1.17	46.0	m ²
7	1.39	1.11	2.51	9.96%	1.25	44.4	m
8	1.26	1.06	2.32	9.22%	1.19	45.6	m ²
9	1.12	1.01	2.13	8.45%	1.11	47.3	m

Em *U. brizantha*, o maior par cromossômico representa 13,91% do comprimento total do lote haploide, enquanto o menor par possui uma representatividade de 7,82% (Tabela 4). Foram identificados dois sítios rDNA 5S no par cromossômico 5, em região intersticial, e dois sítios de rDNA 35S na região terminal do par cromossômico 4 (Figura 2-A).

Tabela 4. Morfometria dos cromossomos de *U. brizantha* (acesso B105): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (S), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR) em μm , razão entre braços (RB), índice centromérico (IC) e Comprimento total do lote haploide (CTLH). Morfologia cromossômica determinada segundo Levan et al. (1964). ¹ cromossomos portadores dos sítios de rDNA 35S; ² cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S.

Pares	L	S	CTi	CR	RB	IC	Morfologia
1	2.13	1.53	3.67	13.91%	1.39	41.8	m
2	1.93	1.48	3.42	12.98%	1.30	43.4	m
3	1.93	1.36	3.29	12.48%	1.42	41.3	m
4	1.75	1.45	3.19	12.12%	1.21	45.3	m ¹
5	1.72	1.32	3.04	11.53%	1.30	43.5	m ²
6	1.61	1.25	2.86	10.88%	1.28	43.8	m
7	1.42	1.13	2.55	9.69%	1.26	44.3	m
8	1.26	1.00	2.26	8.59%	1.25	44.4	m
9	1.13	0.93	2.06	7.82%	1.21	45.3	m

Os acessos de *U. dictyoneura* são poliploides com fórmula cariotípica de 6m conforme classificação de Levan (1964), com 24 cromossomos cada e cariótipos simétricos, classificados como 1A, segundo Stebbins (1971) e índice $S/A_i = 1$, conforme parâmetros de Eroglu (2015). Os cariogramas e idiogramas destes acessos foram organizados considerando a autopoliploidia sugerida para a espécie com base nos estudos de meiose (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006) corroborado pelos dados de morfometria cromossômica e pelo número e posição dos sítios de rDNA obtidos nesse estudo. No acesso DT158, o comprimento total do lote haploide é de 39.29 μm , sendo que o maior quarteto cromossômico possui 3.98 μm e o menor, 2.63 μm , representando 10.13% e 6.69% do comprimento total do lote haploide, respectivamente (Tabela 5). Neste acesso foram evidenciados oito sítios de rDNA 5S, no quarteto cromossômico 2, em região intersticial e no quarteto cromossômico 4, em região intersticial, contíguos aos sítios de rDNA 35S, os quais ocupam a posição terminal nos cromossomos (Figura 2-C).

Tabela 5. Morfometria dos cromossomos de *U. dictyoneura* (acesso DT158): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (S), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR) em μm , razão entre braços (RB), índice centromérico (IC) e Comprimento total do lote haploide (CTLH). Morfologia cromossômica determinada segundo Levan et al. (1964). ¹ cromossomos portadores dos sítios de rDNA 35S; ² cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S.

Pares	L	S	CTi	CR	RB	IC	Morfologia
1	2.24	1.74	3.98	10.13%	1.28	43.86	m
2	2.10	1.54	3.64	9.27%	1.37	42.33	m ²
3	1.89	1.48	3.38	8.59%	1.28	43.93	m
4	1.73	1.39	3.11	7.92%	1.24	44.56	m ^{1,2}
5	1.58	1.33	2.91	7.40%	1.19	45.62	m
6	1.43	1.20	2.63	6.69%	1.19	45.69	m

Para o acesso DT159 de *U. dictyoneura*, o comprimento do maior quarteto de cromossomos foi de 3.13 μm , representando 10.04% do comprimento total do lote haploide, e do menor de 2.00 μm , o que equivale a 6.80% do comprimento total do lote haploide (Tabela 6). O número e a posição de sítios de rDNA 35S e 5S são similares ao observado para o acesso DT158 (Figura 2-D).

Em ambos acessos de *U. dictyoneura*, os sítios de rDNA 5S são nitidamente heteromórficos, inclusive entre cromossomos do mesmo quarteto (Figura 2C e 2D)

Tabela 6. Morfometria dos cromossomos de *U. dictyoneura* (acesso DT159): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (S), comprimento total (CTi), comprimento relativo (CR) em μm e razão entre braços (RB), índice centromérico (IC) e Comprimento total do lote haploide (CTLH). Morfologia cromossômica determinada segundo Levan et al. (1964). ¹ Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 35S; ² cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S.

Pares	L	S	CTi	CR	RB	IC	Morfologia
1	1.78	1.29	3.07	10.04%	1.38	41.99	m
2	1.59	1.22	2.80	9.17%	1.31	43.37	m ²
3	1.47	1.17	2.64	8.63%	1.26	44.34	m
4	1.32	1.15	2.46	8.05%	1.15	46.54	m ^{1,2}
5	1.27	0.96	2.24	7.31%	1.32	41.99	m
6	1.14	0.94	2.08	6.80%	1.22	45.04	m

Figura 2. Cariogramas de (A) *U. brizantha* acesso B105 ($2n = 2x = 18$), (B) *U. decumbens* acesso D04 ($2n = 2x = 18$), (C) *U. dictyoneura* acesso DT158 ($2n = 4x = 24$) e (D) *U. dictyoneura* acesso DT159 ($2n = 4x = 24$). Em verde: sítios de rDNA 35S; Em vermelho: sítios de rDNA 5S.

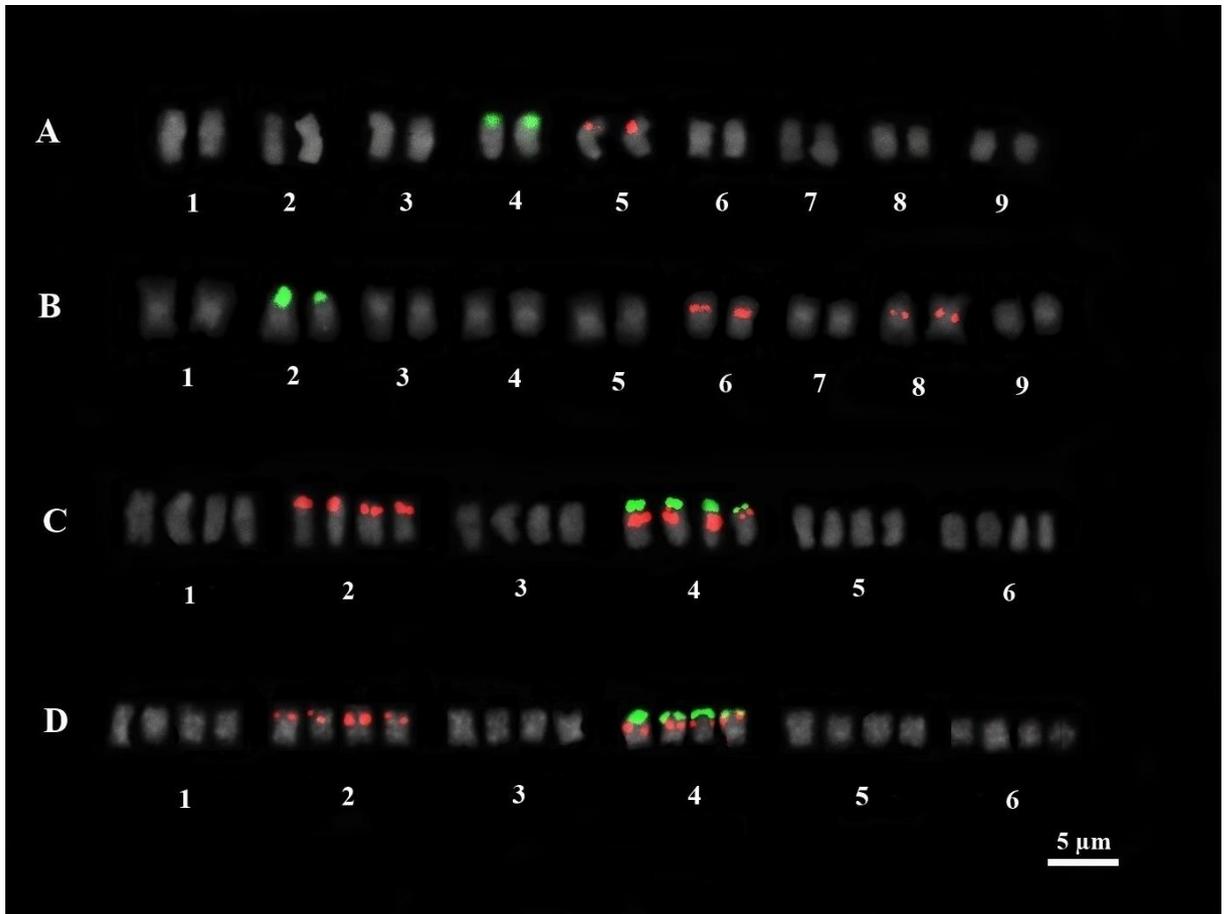
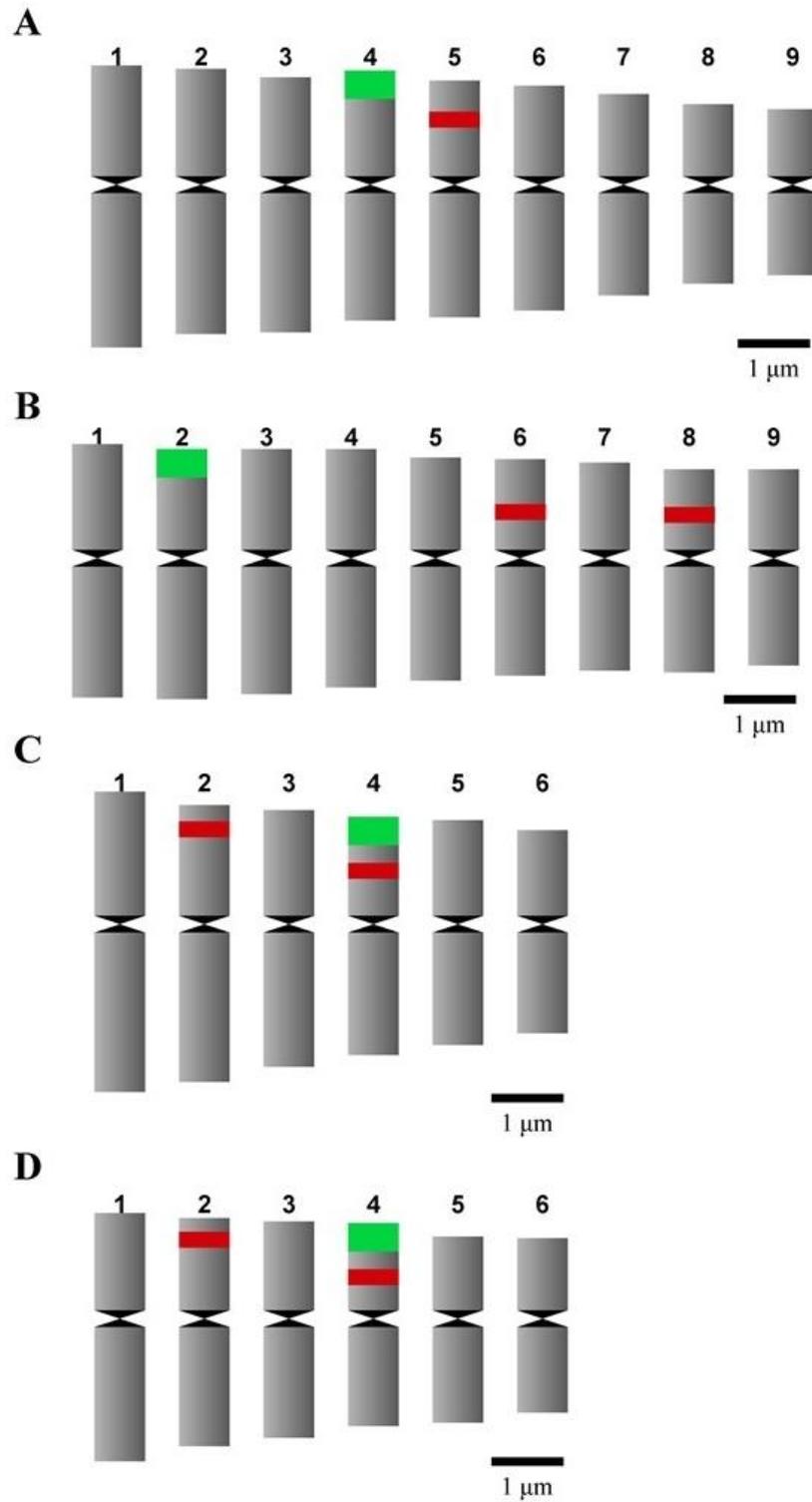


Figura 3. Idiogramas de (A) *U. brizantha* acesso B105 ($2n = 2x = 18$), (B) *U. decumbens* acesso D04 ($2n = 2x = 18$), (C) *U. dictyoneura* acesso DT158 ($2n = 4x = 24$) e (D) *U. dictyoneura* acesso DT159 ($2n = 4x = 24$). Em verde: sítios de rDNA 35S; Em vermelho: sítios de rDNA 5S.



5 DISCUSSÃO

Para os acessos B105 de *Urochloa brizantha* e D04 de *Urochloa decumbens*, o número cromossômico encontrado ($2n = 2x = 18$) corroborou os dados descritos previamente por outros autores (PENTEADO *et al.*, 2000; PINHEIRO, 2000; NIELEN *et al.*, 2010; RICCI *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2019; CORRÊA *et al.*, 2020).

A classificação atribuída a morfologia dos cromossomos de *U. brizantha* 2x coincide com as análises anteriores. Bernini e Marin-Morales (2001) reportaram para acessos tetraploides, todos os cromossomos metacêntricos, exceto um par classificado como submetacêntrico. Nani *et al.* (2016), empregaram 3-mM 8-hidroxiquinoleína, por 5h a -4°C como bloqueador mitótico e analisaram a morfologia cariotípica na cultivar tetraploide Marandu de *U. brizantha*, na qual todos os cromossomos foram classificados como metacêntricos. Contudo, em análises feitas por Nielen *et al.* (2010), também utilizando no pré-tratamento 8-hidroxiquinoleína (2-mM, por 1h em temperatura ambiente e 2h a 4°C), com acessos diploides e tetraploides de *U. brizantha*, os cromossomos do acesso tetraploide *U. brizantha* cv. Marandu foram considerados metacêntricos, com exceção dos pares 3 e 14 que foram classificados como submetacêntricos. No acesso diploide foi relatado cinco pares submetacêntricos, três pares metacêntricos e um par subteloicêntrico. Observando as imagens publicadas pelos autores, percebe-se que os cromossomos analisados estavam em estágios prometafásicos e não foram organizados em ordenamento decrescente de tamanho na montagem dos cariogramas, conferindo características diferentes à descrição cariotípica quando os dados são comparados com outros estudos.

A diferença na classificação dos cromossomos como metacêntricos e submetacêntricos entre as análises é possivelmente causada por variações na condensação dos cromossomos nas metáfases, inerente aos efeitos dos inibidores mitóticos utilizados durante o pré-tratamento. As diferentes substâncias químicas empregadas na obtenção de c-metáfases possuem diferentes propriedades e modos de ação e os cromossomos, levando a diferenças no padrão de condensação e afetando o tamanho dos cromossomos (MORAES *et al.*, 2019). Para diminuir tais efeitos, as metáfases utilizadas no presente estudo foram selecionadas seguindo padrões similares de condensação.

A simetria cariotípica de *U. brizantha* 2x, classificada segundo Stebbins (1971) e Eroglu (2015), assemelha-se às avaliações cariotípicas realizadas anteriormente para

acessos tetraploides (BERNINI E MARIN-MORALES, 2001 e NANI et al., 2016). Os diferentes índices de assimetria cariotípica permitem a comparação e determinação das relações evolutivas entre gêneros, famílias e espécies (EROGLU, 2015).

O número de sítios de rDNA 35S encontrados neste estudo estão de acordo com resultados obtidos por Nielen et al. (2010) em análise de um acesso diploide de *U. brizantha*. Em comparação com os acessos tetraploides, os dados também condizem proporcionalmente com os encontrados por Nielen et al. (2010) e Akiyama et al. (2010) que identificaram quatro sítios de rDNA 35S, em posição terminal. Nani et al. (2016) reportaram que entre dez plantas de *U. brizantha* cv. Marandu (4x) analisadas, cinco apresentaram número constante de sítios entre suas células, sendo uma delas com três e as demais com quatro sítios. As outras apresentaram número de sítios de rDNA35S variando de dois a quatro entre células da mesma planta.

Os resultados obtidos para o número e posição do sítio rDNA 5S também estão de acordo ao encontrado para um acesso diploide de *U. brizantha* por Nielen et al. (2010). Em relação aos acessos tetraploides, o resultado é condizente proporcionalmente ao relatado para um acesso analisado por Akiyama et al. (2010). Contudo, Nani et al. (2016) identificaram a presença predominante de seis sítios rDNA 5S na *U. brizantha* cv. Marandu, também identificados em análise de Akiyama et al. (2010) no mesmo acesso. Os dois autores também reportaram outras variações como quatro e cinco sítios de genes ribossômicos 5S.

Os loci de rDNA, assim como as regiões teloméricas são constituídos de sequências repetitivas que são regiões preferenciais para a ocorrência de fragmentação e rearranjos cromossômicos que afetam a estabilidade genômica (DVORACKOVA, 2015). Ainda de acordo com Rosato et al. (2017) a amplificação e deleção de genes ribossômicos são comuns em diversos grupos de plantas e promovem rearranjos dessas regiões ao longo do tempo evolutivo. Modificações na organização genômica de rDNA podem ocorrer também como resultado de intensa seleção agrônômica, principalmente em acessos de origem artificial. Variações intraespecíficas para os sítios de rDNA não foram observadas nos acessos diploides de *Urochloa* avaliados nesse estudo.

Para *U. decumbens*, os dados referentes à morfologia cromossômica encontrados neste estudo corroboram a pesquisa realizada por Bernini e Marin-Morales (2001) em que reportaram 18 cromossomos, todos metacêntricos também em um acesso diploide. Contudo, em um acesso tetraploide de *U. decumbens* foi relatada a existência heteromorfismo no par 11 em relação ao comprimento total e morfologia cromossômica,

sendo classificados como submetacêntrico (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001). O heteromorfismo também foi observado na cultivar Basilisk de *U. decumbens* analisada por Nani et al., (2016). Esses autores relacionaram a variação morfológica do par cromossômico 11 à ocorrência de uma constrição terciária no braço longo de um dos cromossomos homólogos. No cromossomo menor, os autores sugeriram que tenha ocorrido uma deleção envolvendo a região da constrição terciária. Essa constrição não foi observada no acesso diploide de *U. decumbens* avaliado nesse estudo

A simetria cariotípica encontrada para o acesso D04 de *U. decumbens* corrobora a avaliação realizada por Bernini e Marin-Morales (2001) e Nani et al. (2016) que classificaram os cariótipos dos acessos diploides e tetraploides como simétricos, nas categorias 1A e 2A, respectivamente.

As descrições dos números de sítios de rDNA 35S observadas em *U. decumbens* 2x são proporcionalmente condizentes ao encontrado por Nani et. al (2016) no acesso tetraploide de *U. decumbens* cv. Basilisk, no qual foram observados dois pares de cromossomos com sítios de rDNA 35S. Essa correlação não foi observada para os sítios de rDNA 5S, pois Nani et al. (2016) descreveram quatro pares portadores desse loci, entretanto um deles em estado de hemizigose. Na análise citogenética convencional do acesso diploide D05, Bernini e Marin-Morales (2001) não relataram a presença de satélite nos cromossomos, que é a região onde foram localizados os sítios de rDNA no cariótipo do acesso de *U. decumbens* 2x avaliado nesse estudo. Essa diferença entre os cariótipos pode ser relacionada à dificuldade de identificar os satélites nos cromossomos via coloração convencional e potencializada pela característica dos cromossomos de *Urochloa* de apresentarem condensação tardia das regiões terminais, que constantemente apresentam extensão nas fibras da cromatina, especialmente na região ribossomal 35S, como relatado por Nani et. al (2016), Moraes et al. (2019) e Corrêa et al. (2020).

As análises sobre os genomas de *Urochloa* foram realizadas por Paula et al. (2017) e Corrêa et al. (2020) por meio da hibridização *in situ* genômica (GISH). No estudo de Corrêa et al. (2020), os resultados mostraram hibridização completa do DNA genômico (gDNA) do acesso diploide de *U. brizantha* em todos os cromossomos da diploide *U. decumbens*, indicando que as duas espécies possuem alto grau de homologia entre seus genomas. Entretanto, a GISH recíproca com o gDNA de *U. decumbens* 2x em *U. brizantha* 2x revelou um menor grau de hibridização entre os cromossomos de ambas espécies, sendo sugerido que *U. brizantha* 2x possui uma maior diversidade de sequências repetitivas que *U. decumbens* 2x (CORRÊA et al. 2020). Os padrões de hibridização conduziram à

elucidação das relações genômicas envolvendo as espécies diploides e as identificações dos seus genomas, sendo proposto, por Corrêa et al. (2020), B¹B¹ para *U. brizantha* e B¹B¹ para *U. decumbens*, os quais também apresentam homeologia com o genoma B²B² de *U. ruziziensis* (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017).

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que há também similaridade cariotípica (morfologia cromossômica e simetria), entre ambas espécies, exceto para número e posição de sítios e rDNA. De acordo com Guerra (2012) esses sítios tem sido frequentemente usados como uma ferramenta adicional para estimar a similaridade cariotípica entre as espécies ou para entender a evolução cariotípica nesses grupos. Contudo, existem algumas restrições quanto ao uso dos mesmos para identificar homologias cromossômicas. Em *Urochloa*, por exemplo, esses sítios são reconhecidos por apresentarem alta plasticidade e apresentarem variação intra e interespecífica (Nani et al., 2016). O comportamento variável dos sítios de rDNA é comum e pode ser atribuído a inversões cromossômicas, ampliações, translocações e à atividade de retrotransposons (KSIĄCZYK et al., 2010). Para *Urochloa*, é recomendável maior precaução no emprego de cariótipos baseado exclusivamente no mapeamento dos sítios de rDNA para interpretações taxonômicas e evolutivas.

Para os acessos DT158 e DT159 de *Urochloa dictyoneura*, o número cromossômico encontrado ($2n = 4x = 24$) corroborou os dados descritos previamente em estudos meióticos realizados por Risso-Pascotto et al. (2006) no qual os cinco acessos de *U. dictyoneura* analisados, provenientes da coleção de *Urochloa* do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte, apresentaram $2n = 24$ com configuração típica de tetraploides revelando um novo número básico para o gênero de $x=6$. Foram observadas associações predominantemente em bivalentes, durante a diacinese, sendo relatadas também a formação de uni, tri e tetravalentes. Em um dos acessos analisados, foi identificada a associação dos 24 cromossomos em seis tetravalentes. De acordo com Singh (1993), tais configurações de pareamento são esperadas na associação entre quatro cromossomos homólogos em autotetraploides. Neste contexto, as autoras sugerem que *U. dictyoneura* seja uma espécie autoploide em avançada diploidização de seu cariótipo.

Para ambos acessos de *U. dictyoneura* todos os cromossomos foram classificados como metacêntricos, e a simetria cariotípica, estabelecida segundo critérios de Stebbins (1971) e Eroglu (2015), simétrica para os dois cariótipos. A discrepância existente nos valores do comprimento total do lote haploide entre os acessos pode ser atribuída à diferenças no grau de condensação dos cromossomos.

A localização dos genes ribossomais através da FISH em acessos de *U. dictyoneura* foi realizada pela primeira vez neste estudo. Em ambos os acessos as sequências de rDNA foram detectadas nos mesmos pares e posição nos cromossomos, demonstrando, assim como observado através dos dados morfométricos, grande similaridade entre os cariótipos e ratificando a proposta de autoploidia para a espécie. A ocorrência de heteromorfismo observada para os sítios de rDNA 5S deve-se ao fato da organização desses genes em clusters gênicos de unidades repetitivas em tandem, com regiões codificadoras e espaçadoras, sendo a maioria das divergências encontradas entre essas regiões consequência de diferentes tamanhos de regiões espaçadoras contidas nos clusters gênicos (GOTTLOB-MCHUGH et al. 1990). As regiões espaçadoras representam a maior porção das sequências repetitivas, e permanecem transcricionalmente silenciadas o que, em muitas espécies, envolve um grande nível de condensação (NEVES et al., 2005)

O conteúdo de DNA estimado para os dois acessos diploides de *U. brizanta* e *U. decumbens* (870 Mbp C⁻¹ e 704 Mbp C⁻¹ respectivamente) é proporcional ao encontrado para as respectivas cultivares tetraploides Marandu e Basilisk (1404 Mbp C⁻¹ e 1633 Mbp C⁻¹), variando, e com tendência a crescimento, de acordo com o nível de ploidia (ISHIGAKI, 2010; TIMBÓ, 2014). O conteúdo de DNA encontrado nos acessos DT158 e DT159 de *U. dictyoneura* (1384 Mbp C⁻¹ e 1526 Mbp C⁻¹ respectivamente) é similar ao encontrado para outras espécies tetraploides do gênero (ISHIGAKI, 2010; TIMBÓ, 2014a) ratificando a origem tetraploide dos acessos analisados neste estudo.

De acordo com a classificação estabelecida por Leitch et al. (2005), os genomas dos acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* e dos tetraploides de *U. dictyoneura* são considerados pequenos, por possuírem valores inferiores à 3.5pg. A diferença observada no conteúdo de DNA entre as duas espécies diploides avaliadas e também entre os acessos de *U. dictyoneura* pode ser atribuída à proporção de DNA repetitivo contido nos genomas. Regiões com atividades variadas de elementos transponíveis, e conteúdo de DNA repetitivo, são apontadas como principal fator de variação relacionado ao conteúdo de DNA entre espécies próximas (BENNETZEN; MA; DEVOS, 2005).

Estudos meióticos específicos, cariotipagem molecular com outros marcadores e análises com GISH para os acessos analisados neste estudo, e os demais do banco de germoplasma, são recomendáveis para certificar a identificação da autoploidia em *U. dictyoneura*, e identificar os genomas e a origem dos mesmos, assim como determinar o grau de homologia ou homeologia genômica com as demais espécies do gênero.

O cálculo da assimetria cariotípica é um dado conhecido nas análises cariotípicas

sendo possível o emprego de diversas fórmulas. A classificação segundo Eroglu (2015) permite a comparação do cariótipo entre diversos grupos de organismos, utilizando-se de cálculos que divergem dos utilizados na clássica classificação da assimetria cariotípica em plantas feita por Stebbins (1971). Nesta análise, não houve divergência nas classificações dos cariótipos obtidas com os dois parâmetros, demonstrando que ambas podem ser empregadas para análise de similaridade cariotípica em *Urochloa*.

6 CONCLUSÕES

Os acessos diploides de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* apresentaram cariótipos simétricos, com 9 pares de cromossomos metacêntricos.

Houve variação em relação ao número e localização dos sítios de rDNA.

Há similaridade cariotípica entre os acessos de *Urochloa dictyoneura*, incluindo número e localização dos genes ribossomais. Os dados cariotípicos corroboram a origem autopoliploide da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC. **Relatório de Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Associação Brasileira das Industrias Exportadoras de Carne Bovina, p. 1–20, 2016.
- AKIYAMA, Y.; YAMADA-AKIYAMA, H.; EBINA, M. **Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species**. *Grassland Science*, v. 56, n. 4, p. 217–223. Nasushiobara, 2010.
- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. A.; XAVIER, D. F. **As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no País**. Embrapa gado de Leite, p. 3–6. Juíz de Fora, 2002.
- AMBIEL, A. C. et al. **Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD**. *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 30, n. 4, p. 457–464. Viçosa, 2008.
- ASSIS, G. M. L. et al. **Genetic divergence in *Brachiaria* species**. *Crop breeding and applied biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 331–338. Campo Grande, 2002.
- BARTLETT, J. M. S. **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)**. *Blood Reviews*, v. 7, n. 2, p. 127–134. Totowa, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>>.
- BASAPPA, G P; MUNIYAMMA, M; CHINNAPPA, C C. **An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy**. *Canadian Journal of Botany*, v. 65, p. 2297–2309. Calgary, 1987.
- BENNETZEN, J. L.; MA, J.; DEVOS, K. M. **Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants**. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 127–132. Athens, 2005.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. **Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species**. *CYTOBIOS-CAMBRIDGE-*, p. 157-172, 2001.
- BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. **Repetitive DNA in eukaryotic genomes**. *Chromosome Research*, v. 23, n. 3, p. 415–420. Arcona, 2015.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum**. *Grasses of the World*. Development, v. 13, n. 87, p. 389. London, 1986.
- CORRÊA, C. TR et al. **GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa P. Beauv.*** *Molecular biology reports*, p. 1-10, 2020.
- DOBIGNY, G. **Cytogenetics and Cladistics**. *Systematic Biology*, v. 53, n. 3, p. 470–484. Paris, 2004. Disponível em: <<http://sysbio.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1080/10635150490445698>>.
- DOLEZEL, J. **Application of flow cytometry for the study of plant genomes**. *Applied Genetics*, v. 3, n. 38, p. 285–302, 1997.
- DVOŘÁČKOVÁ, M.; FOJTOVÁ, M.; FAJKUS, J. **Chromatin dynamics of plant telomeres and ribosomal genes**. *The Plant Journal*, v. 83, n. 1, p. 18-37, 2015.
- EROĞLU, H. E. **Which chromosomes are subtelo-centric or acrocentric? A new karyotype symmetry/asymmetry index**. *Caryologia*, v. 68, n. 3, p. 239-245, 2015.
- FLAVELL, R. B. et al. **Molecular organization of genes and repeats in the large cereal**

- genomes and implications for the isolation of genes by chromosome walking.** Chromosomes today, p. 199–213. Norwich, 1993.
- GUERRA, M. **Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications.** Cytogenetic and Genome Research, v. 120, n. 3–4, p. 339–350. Pernambuco, 2008.
- GUERRA, M. **Cytotaxonomy: the end of childhood.** Plant Biosystems, v. 146, n. 3, p. 703–710. Pernambuco, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263504.2012.717973>>.
- GOTTLOB-MCHUGH, S. G. et al. **Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants.** Genome, v. 33, n. 4, p. 486-494, 1990.
- HESLOP-HARRISON JSP; SCHWARZACHER T. (2011) **Organization of the plant genome in chromosomes.** Plant J 66:18–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2011.04544.x>
- IBGE. **Censo Agropecuário.** Ministério do Planejamento, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília, 2017.
- ISHIGAKI, G. et al. **Estimation of genome size in *Brachiaria* species.** Grassland Science, v. 56, n. 4, p. 240–242. Miyazaki, 2010.
- ISHIGAKI, G. et al. **Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiplo-shoot clumps and seedlings.** Grassland Science, v. 55, p. 164–170. Miyazaki, 2009.
- KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. **Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement.** Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). p. 16-42. (CIAT publication no. 259), Campo Grande, 1996.
- KIROV, I. et al. **DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing.** Comparative Cytogenetics, v. 11, n. 4, p. 747–757, 2017.
- KSIAZCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKI, Z. **Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratenses*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH.** Jappl Genet. 51 (4), pp. 449-460. 2010.
- LASCANO, C. E.; EUCLIDES, V. P. B. Nutritional quality and animal production of *Brachiaria* pastures. **Biology, agronomy, and improvement.** Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). p. 106-123. (CIAT publication no. 259), Campo Grande, 1996.
- LEITCH, I. J. et al. **Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta).** Annals of Botany, v. 95, n. 1, p. 207–217. Weinheim, 2005.
- LING, H. Q. et al. **Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*.** Nature, v. 496, n. 7443, p. 87–90. London, 2013.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, Manuel A. **The repetitive DNA content of eukaryotic genomes.** Repetitive DNA, v. 7, p. 1–28. Olomouc, 2012.
- LYSAK, M. A.; LEXER, C. **Towards the era of comparative evolutionary genomics in *Brassicaceae*.** Plant Systematics and Evolution, v. 259, n. 2–4, p. 175–198, 2006.

- MAASS, B. L. **Identifying and naming *Brachiaria* species**. CIAT publication; no. 259 (CIAT), 1996.
- MILES, J. W. et al. ***Brachiaria* grasses**. In: Warm-season (C4) grasses. [s.l: s.n.]. p. 1–9, 2004.
- MORAES 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, 2019.
- MORRONE, O.; ZUOLAGA, F. O. **Revisión de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los generos *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae)**. Darwiniana, v. 31, n. 1/4, p. 43–109. San Isidro, 1992.
- NANI, T. F. et al. **Physical map of repetitive DNA sites in *Brachiaria* spp.: Intravarietal and interspecific polymorphisms**. Crop Science, v. 56, n. 4, p. 1769–1783. Madison, 2016.
- NEVES, N. et al. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 104-111, 2005.
- NIELEN, S. et al. **Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha***. Sexual Plant Reproduction, v. 23, n. 1, p. 45–51. Madison, 2010.
- PAULA, C. M. P.; SOUZA SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H.. **Genomic constitution and relationship in *Urochloa* (Poaceae) species and hybrids**. Crop Science, v. 57, n. 5, p. 2605–2616. Madison, 2017.
- PENTEADO, M. I. O. et al. **Determinação de poliploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies de gênero *Brachiaria***. Boletim de Pesquisa Embrapa, v. 11. Campo Grande, 2000.
- PEREIRA, R. C. et al. **Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético**. Ciência Rural, v. 42, n. 7, p. 1278–1285. Campo grande, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700023&lng=pt&tlng=pt>.
- PINHEIRO, A. A. **Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine**. Plant Cell Report, v. 18, n. 3, p. 274–278. London, 2000.
- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. B.; KABUYE, C. H. S. **Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. *Brachiaria*: biology, agronomy and improvement**. [S.l: s.n.], p. 1–15. Madrid, 1996.
- RICCI, G. C. L et al. **Chromosome numbers and meiotic analysis in the pre-breeding of *Brachiaria decumbens* (Poaceae)**. Indian Academy of Sciences, v. 90, n. 2, p. 289–294. Maringá, 2011.
- 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, 53: 7-10. 2006
- ROA, F.; GUERRA, M. **Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications**. BMC evolutionary biology, v. 12, n. 1, p. 225,

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. Campo Grande, 2015. Disponível em:

<<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000440930>>.

ROSATO, M. et al. **High and uneven levels of 45S rDNA site-number variation across wild populations of a diploid plant genus (*Anacyclus*, Asteraceae)**. *PloS one*, v. 12, n. 10, p. e0187131, 2017.

SALARIATO, D. L. et al. **Rupichloa, a new genus segregated from *Urochloa* (Poaceae) based on morphological and molecular data**. *Taxon*, v. 58, n. 2, p. 381–391, 2009.

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*, v. 56, n. 1, p. 355–369. Buenos Aires, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.02.009>>.

SHARMA, A. K.; KOUR, S. **Chromosome number reports LXIX**. *Taxon*, v. 06, n. 5, p. 861–872. New York, 1980.

SHARMA, M. L.; SHARMA, K. **Cytological Studies in the North Indian Grasses**. *Cytologia*, v. 44, p. 861–872. New York, 1979.

SCHNABLE, P. S. et al. **The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics**. *Science*, v. 326, n. 5956, p. 1112–1115. Ames, 2009.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. CRC press, 1993.

SOUZA SOBRINHO, F. **Melhoramento de gramíneas forrageiras na EMBRAPA Gado de Leite**. Simpósio de Forragicultura e Pastagens. [S.l: s.n.]. p. 98–111. Juiz de Fora, 2009.

SPIES, J.J et al. **Basic chromosome numbers and polyploid levels in some South African and Australian grasses (Poaceae)**. *Bothalia*, v. 21, n. 2, p. 163–170. Bloemfontein, 1991.

STEBBINS, G. L. et al. **Chromosomal evolution in higher plants**. *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold Ltda., London, 1971

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 16 outubro de 2018.

SWENNE, A; LOUANT, B. P; DUJARDIN, M. **Induction par la colchicine de formes autotetraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminee)**. *Agronomie Tropicale*, v. 36, p. 114–134. Miyazaki, 1981.

TIMBÓ, A. L. O. et al. **Nuclear DNA content and chromosome number in *Brachiaria* spp. genotypes**. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 45, n. 1, p. 62–67. Campo Grande, 2014.

TORRES GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. **Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae)**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 37, n. 1, p. 36–44. Cali, 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. New York, 2017.

VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S. **Biology, Cytogenetics, and Breeding of *Brachiaria*.** Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. [S.l: s.n.]. v. 2. p. 103–143. New York, 2009.

VALLE, C. B.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. **Melhoramento genético de *Brachiaria*. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil.** [S.l: s.n.]. v. 56. p. 460–472. New York, 2009. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226808013>>.

VALLE, C. B.; SINGH, R. J.; MILLER, D. A. **Pachytene Chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard.** *Plant Breeding*, v. 98, p. 75–78, 1987.

WOLNY, W.; HASTEROK, R. **Comparative cytogenetics analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives.** *Annals of Botany*. 104: 873-881, 2009.