



**ANA GABRIELA DAMASCENO**

**Análise cariotípica de acessos de *Urochloa humidicola* (Rendle)  
Morrone & Zuloaga**

**LAVRAS - MG  
2020**

**ANA GABRIELA DAMASCENO**

**Análise cariotípica de acessos *Urochloa humidicola* (Rendle)  
Morrone & Zuloaga**

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

Dr<sup>a</sup>. 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).**

Damasceno, Ana Gabriela.

Análise cariotípica de acessos *Urochloa humidicola* (Rendle)  
Morrone & Zuloaga / Ana Gabriela Damasceno. - 2020.  
66 p.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

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

Bibliografia.

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

**ANA GABRIELA DAMASCENO**

**Análise cariotípica de acessos *Urochloa humidicola* (Rendle)  
Morrone & Zuloaga**

**Karyotype Analysis of *Urochloa humidicola* (Rendle) accessions Morrone & Zuloaga**

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

APROVADA em 14 de outubro de 2020.

Dr<sup>a</sup> Giovana Augusta Torres- UFLA

Dr<sup>a</sup> Bianca B. Z. Vigna- EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos- SP

Dr<sup>a</sup>. Vânia Helena Techio  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2020**

*A todos os brasileirinhos que não tiveram as mesmas oportunidades como as a mim oferecidas.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida e as demais agências de fomento, como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMIG) pelo apoio financeiro à pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelas oportunidades, suporte e estrutura fornecidas.

À EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande- MS e aos pesquisadores Cacilda Borges do Valle e Sanzio Carvalho Lima Barrios, pela parceria, disponibilização do material de estudo e sobretudo, a atenção.

À Professora Vânia agradeço por toda a dedicação, disponibilidade, paciência e amparo. Sou grata pelo conhecimento, no qual me proporcionou em disciplinas, na dissertação e principalmente como pessoa.

Ao Técnico de Laboratório Felipe, pelo auxílio e dedicação em nos oferecer condições ideais para a execução do trabalho.

À Professora Flávia, coordenadora do Programa de Pós-graduação e a Lilian, secretária do Programa, por todo o suporte, paciência e delicadeza.

À Isadora, bolsista iniciação científica pela ajuda na execução do trabalho, além da paciência e dedicação ao projeto.

Ao Laboratório de Citogenética e aos meus companheiros, colegas ou melhor dizendo amigos do laboratório. Desde que entrei, há três anos atrás me acolheram com carinho e sempre me apoiaram nos projetos e na vida pessoal, com auxílio no laboratório ou com cafés. Muito obrigada.

Ao Alex, Ana Luísa, Isabella, Laiane, Marco Túlio e Yasmim. Não existem palavras para agradecer a vocês. Os conselhos, amizade, auxílio e carinho foram importantes para o projeto e para mim.

Aos meus amigos que me acompanham desde a graduação e aos que a pós-graduação me proporcionou, Andrey, Clara, Daiana, Geraldo, Julia, Juscicleide, Liliana, Letícia, Marina, Robson e em especial a Débora pela amizade e preocupação.

Ao Jean, Shayan, Wesley pela amizade e principalmente ao Matheus, com o Diano e a Liza, pelo carinho e paciência. Vocês me deram suporte para passar esses tempos de pandemia e me ensinaram um pouco mais sobre a vida. O destino é tudo. “Wyrð Bið Ful Aræð”.

À minha Família, principalmente meu pai, minha mãe, meus irmãos Maurício e Ivana que mesmo distante, devido a esse caos pandêmico, nunca deixaram de me apoiar, rezar por mim e amar.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a conclusão desse presente trabalho.

Grata!

*“Mesmo a menor das criaturas, pode mudar o curso do futuro”*  
*J. R. R Tolkien.*



## RESUMO

A espécie *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga pertence à família Poaceae e, como outras espécies do gênero, é utilizada como forrageira em países tropicais. Apesar de sua relevância, estudos citogenéticos na espécie ainda são restritos, exceto avaliações da meiose. Com isso, esse estudo objetivou caracterizar o cariótipo dos acessos apomíticos (H016, H108, H125 e H126) e do acesso sexual (H031) de *Urochloa humidicola*, incluindo morfologia e simetria cromossômicas, conteúdo de DNA nuclear e o mapeamento físico de sequências de rDNA 35 e 5S, por meio da FISH. Todos os acessos avaliados apresentaram cariótipos simétricos. O acesso H016 apresenta  $2n=6x=36$  cromossomos, fórmula cariotípica  $36m$  e quantidade de DNA nuclear de 2,95pg. Nesse acesso, foram identificados cinco sítios de rDNA 35S em posição terminal e nove sítios intersticiais de rDNA 5S, sendo quatro deles sintênicos com o sítio 35S. Os acessos H125 e H126 apresentaram  $2n=7x=42$ , fórmula cariotípica  $42m$  com 3,51 e 4,45 pg de DNA nuclear, respectivamente. Em relação aos sítios DNA ribossomal, em ambos os acessos, foram observados onze sítios intersticiais 5S, sendo sete em sintenia com os sítios terminais de 35S. Por fim, o acesso H108 apresentou  $2n=9x=54$  cromossomos, fórmula cariotípica  $54m$  e conteúdo de DNA, 3,94 pg. Em relação aos sítios ribossomais, sete cromossomos apresentaram sítios de rDNA 35S localizados nas regiões terminais, dos quais cinco sintênicos com o sítio de rDNA 5S e dois 35S e outros três sítios de rDNA 5S, eram intersticiais e um pericentromérico. As contagens cromossômicas e a montagem do cariótipo mostraram que o acesso H031 é um aneuploide com  $2n=6x=36+1$ , fórmula cariotípica  $37m$  e 3,01pg de DNA nuclear. No cariótipo foram identificados 13 sítios de rDNA 5S, em posição intersticial, sendo seis sintênicos com o sítio 35S. Com exceção de um dos sítios de rDNA 35S que foi identificado em posição intersticial, os demais estão localizados terminalmente nos cromossomos. Provavelmente, um dos cromossomos portadores do sítio de rDNA 5S pode ser o cromossomo extra. Exceto o acesso H108, todos os demais apresentaram variação no número sítios ribossomais, entre e dentro de plantas, e em células de um mesmo meristema. Os resultados obtidos corroboram com a proposta de auto-alopoliploidia em *Urochloa humidicola*.

**Palavras- Chave:** *Brachiaria humidicola*; FISH; Cariótipo; Aneuploidia

## ABSTRACT

The species *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga belongs to the family Poaceae and, like other species of the genus, is used as forage in tropical countries. Despite its relevance, cytogenetic studies in the species are still restricted, except meiosis evaluation. This study aimed to characterize the karyotype of apomitic accessions (H016, H108, H125 and H126) and sexual access (H031) of *Urochloa humidicola*, including chromosomal morphology and symmetry, nuclear DNA content and physical mapping of rDNA sequences 35S and 5S, through FISH. All accessions evaluated showed symmetrical karyotypes. The H016 access have  $2n = 6x = 36$  chromosomes, karyotype formula  $36m$  and nuclear DNA amount of 2.95pg. In this access, five 35S rDNA sites in terminal position and nine interstitial 5S rDNA sites were identified, four of which were synthetic with the 35S site. The accessions H125 and H126 presented  $2n = 7x = 42$ , karyotype formula  $42m$  with 3.51 and 4.45 pg of nuclear DNA, respectively. Regarding the ribosomal DNA sites, in both accessions, eleven 5S interstitial sites were observed, seven of which were in synergy with the 35S terminal sites. Finally, the H108 access showed  $2n = 9x = 54$  chromosomes, karyotype formula  $54m$  and DNA content, 3.94 pg. In relation the ribosomal locus, seven chromosomes had 35S rDNA sites located in the terminal regions, of which five were synthetic with the 5S rDNA site and two 35S and three other 5S rDNA sites were interstitial and one pericentric. Chromosomal counts and karyotype assembly showed that the H031 access is an aneuploid with  $2n = 6x = 36 + 1$ ,  $37m$  karyotype formula and 3.01pg of nuclear DNA. In the karyotype, 13 sites of 5S rDNA were identified, in an interstitial position, six of which were synthetic with the 35S site. With the exception of one of the 35S rDNA sites that was identified in an interstitial position, the rest are located terminally on the chromosomes. Probably, one of the chromosomes carrying the 5S rDNA site may be the extra chromosome. Except for H108 access, all the others showed variation in the number of ribosomal sites between and within plants and cells of the same meristem. The results obtained corroborate the proposal for auto-allopolyploidy in *Urochloa humidicola*.

**Keywords:** *Brachiaria humidicola*; FISH; Karyotype; Aneuploidy.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.1 Aspectos taxonômicos, botânicos e econômicos <i>Urochloa</i> P. Beauv. ....	12
2.2 Caracterização Citogenética de espécies de <i>Urochloa</i> P. Beauv.....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Local.....	25
3.2 Material Vegetal.....	25
3.3 Preparações cromossômica .....	25
3.4 Hibridização in situ fluorescente- FISH .....	26
3.5 Cariogramas e Idiogramas.....	27
3.6 Citometria de Fluxo .....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 Número Cromossômico e Tamanho do Genoma .....	29
4.2 Dados cariotípicos dos acessos de <i>U. humidicola</i> .....	30
4.3 Mapeamento dos sítios de rDNA 35S e 5S .....	33
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1 Considerações sobre o número cromossômico e o tamanho dos genomas dos acessos de <i>U. humidicola</i> .....	38
5.2 Análise dos Cariótipos dos acessos de <i>Urochloa humidicola</i> .....	40
5.3 Mapeamento dos sítios de rDNA 5S e 35S de acessos de <i>U. humidicola</i> .....	42
5.4 Considerações sobre a constituição genômica de acessos de <i>U. humidicola</i> .....	43
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Urochloa* P. Beauv. pertence à família Poaceae e apresenta aproximadamente 135 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORRONE; ZULOAGA, 1992, 1993; STEVENS, 2017), sendo grande parte das espécies comercialmente utilizadas de origem Africana (VALLE et al., 2010). Existem controvérsias taxonômicas quanto a classificação de *Urochloa* e *Brachiaria* (Trin.) Grisebach, no qual foi proposto a incorporação da maioria das espécies de *Brachiaria* em *Urochloa*, com base em estudos morfológicos e moleculares (WEBSTER, 1987; MORRONE; ZULOAGA, 1992; 1993; VELDKAMP, 1996; TORRES- GONZÁLES; MORTON, 2005; SALARIATO et al., 2010).

Nos países tropicais como o Brasil, as espécies de *Urochloa* tem sido a base da bovinocultura de corte e de leite, por apresentarem tolerância a solos ácidos e pobres em nutrientes (RAO et al., 1996; MACEDO, 2005). As espécies amplamente utilizadas são *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga e *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (PACIULLO; GOMIDE, 2016).

Devido a importância do gênero para a forragicultura mundial, programas de melhoramento genético envolvendo essas espécies têm sido desenvolvidos em diferentes instituições e países. Um dos objetivos é gerar cultivares com maior qualidade, produtividade e resistência a pragas (VALLE; JANK; RESENDE, 2009; JANK et al., 2014). Para isso é necessário inicialmente avaliações como número cromossômico, nível de ploidia, comportamento meiótico e viabilidade polínica dos possíveis parentais e híbridos então produzidos. Esse é o papel fundamental da citogenética, sendo a base para um programa de melhoramento bem-sucedido (RESENDE; VALLE; JANK, 2008).

Em relação aos conhecimentos citogenéticos em *Urochloa*, observa-se variação do número básico de cromossomos de  $x=6, 7, 8, 9, 10, 11$  e  $12$  (DARLINGTON; WYLIE, 1956; DUJARDIN, 1979; SHARMA; SHARMA, 1979; SHARMA; KOUR, 1980; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VALLE; SAVIDAN, 1996; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006a), predominando  $x=9$  e do número cromossômico variável de  $2n=14$  a  $2n=90$  dentre as espécies do gênero (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Esses conhecimentos provém de vários trabalhos envolvendo análises da meiose (MENDES-BONATO et al., 2002, 2006; RISSO-PASCOTTO et al., 2003, 2006a, 2006b, 2009; RICCI et al., 2011a; BOLDRINI et al., 2006, 2009a, 2009b, 2011a, 2011b) e análise cariotípica por meio de técnicas citogenéticas convencionais (BERNINI; MARIN-

MORALES, 2001; MORAES et al. 2019) e também moleculares, como hibridização *in situ*-FISH e GISH (NIELEN et al., 2010; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NANI et al., 2016; 2018; PAULA et al., 2017; ROCHA et al., 2019; CÔRREA et al., 2020; MENDES et al., dados não publicados) vem sendo realizados em espécies do gênero, predominantemente nas do complexo agâmico: *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, devido a sua importância econômica. Esses estudos visam realizar contagens cromossômicas, determinar níveis de ploidia, identificar alterações cariotípicas e meióticas, estudar a composição e as mudanças genômicas. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma importante técnica de citogenética molecular que tem sido usada principalmente no mapeamento de sondas de DNA para os cromossomos, permitindo assim o estabelecimento de um mapa físico das sequências (JIANG, 2019).

*U. humidicola* possui boa adaptação a áreas com solos inférteis e sujeitas a alagamento temporário (MACHADO et al., 2010; PACIULLO; GOMIDE, 2016) e há uma extensa literatura descrevendo a variação do número básico e do nível de ploidia. Estudos citogenéticos dessa espécie concentram-se principalmente em avaliações da meióticas, as quais descrevem acessos com  $2n=6x=36$  (BOLDRINI et al., 2011b),  $2n=7x=42$  (BOLDRINI et al., 2006; BOLDRINI et al., 2009a) e  $2n=9x=54$  (ADMOWSKI et al., 2007; BOLDRINI et al., 2009b), com número básico  $x=6$ . Outros níveis de ploidia para o mesmo número cromossômico foram associados ao número básico de  $x=7$  para um acesso (H013) de  $2n=6x=42$  (BERNINI; MARIN- MORALES, 2001) e para  $x=9$ , com  $2n=4x=36$  (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001),  $2n=6x=54$  (BERNINI; MARIN- MORALES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010) e  $2n=8x=72$  (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Apesar das análises citogenéticas existentes, a origem da alopoliploide e a estrutura do genoma de *U. humidicola* ainda são inconclusivas (VIGNA et al., 2016a), assim como não se dispõe de uma análise comparativa dos cariótipos de genótipos/acessos com diferentes níveis de ploidia e número básico de cromossomos, com o auxílio de análises citogenéticas moleculares. Diante do exposto, esse estudo objetivou caracterizar o cariótipo de diferentes acessos de *Urochloa humidicola*, por meio do mapeamento dos sítios de rDNA 35S e 5S com o intuito de contribuir para o entendimento da organização genômica e cromossômica da espécie.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos taxonômicos, botânicos e econômicos *Urochloa* P. Beauv.

*Urochloa* P. Beauv. [que inclui espécies de *Brachiaria* (Trin.) Griseb.] é membro da tribo Paniceae, pertencente à família Poaceae e subfamília Panicoideae. Constitui-se de aproximadamente 135 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (MORRONE; ZULOAGA, 1992, 1993; STEVENS, 2017). No Brasil, o gênero é amplamente utilizado devido a boa adaptação a solos ácidos e produção de matéria seca (RAO et al., 1996; MACEDO 2005; RODRIGUES et al., 2014).

Os limites taxonômicos do gênero ainda não estão bem estabelecidos. Há controvérsias entre a classificação de algumas espécies de *Urochloa* P. Beauv. e *Brachiaria* (Trin.) Grisebach. *Urochloa*, descrito em 1812 por Beauvois, contém 12 espécies distribuídas principalmente nas savanas africanas (TORRES- GONZÁLES; MORTON, 2005). *Brachiaria*, por sua vez, foi descrito inicialmente por Trinius (1826) como parte do gênero *Panicum* L. e posteriormente elevado a gênero por Grisebach (1853), com 100 espécies, sendo essas distribuídas globalmente (TORRES- GONZÁLES; MORTON, 2005). Alguns autores apontam que a orientação da espiguetas, principal caráter morfológico utilizado como distinção entre os gêneros, é considerado frágil (WEBSTER, 1987; MORRONE; ZULOAGA, 1992, 1993; VELDKAMP, 1996). Em *Brachiaria*, a orientação da espiguetas é adaxial, com a gluma inferior voltada para a ráquis. Já em *Urochloa* é abaxial, com a gluma inferior oposta a ráquis (MORRONE; ZULOAGA, 1992; CLAYTON; RENZOIVE, 1996). No entanto, em *Brachiaria* essa orientação é encontrada em espiguetas dispostas individualmente, pois quando dispostas em pares e com pedicelos longos tornam-se emparelhadas, apresentando orientação adaxial (MORRONE; ZULOAGA, 1992).

Além disso, a partir de dados obtidos de estudos moleculares com regiões ITS do DNA ribossômico de 22 espécies de *Urochloa* e *Brachiaria* (TORRES- GONZÁLES; MORTON, 2005) foi concluído que ambas, em conjunto com *Eriochloa* Kunth e *Melinis* P. Beauv, formam um grupo monofilético. Em 2010, Salariato e colaboradores, com o objetivo de estabelecer as relações filogenéticas dos táxons dentro da subtribo Melinidinae, que inclui *Urochloa* e *Brachiaria*, utilizou-se de genes cloroplastidiais para reafirmar que não há distinção entre os dois gêneros. Com isso, foi proposta a incorporação da maioria das espécies pertencentes a *Brachiaria* em *Urochloa*, com exceção de *Brachiaria longiflora* Clayton, *Brachiaria pseudodichotoma* Bosser e *Brachiaria serrata* (Thunb) Stapf, devido à fragilidade

em relação ao caráter de distinção morfológico entre essas e os dados moleculares (MORRONE; ZULOAGA 1992, 1993; SALARIATO et al., 2010).

Vale ressaltar que dentro do grupo *Urochloa* existem problemas taxonômicos intraespecíficos. A cultivar Basilisk, por exemplo, difundida como *Urochloa decumbens*, também tem sua descrição recomendada como *Urochloa brizantha*, pois estas espécies são apenas distintas pela forma e arranjo das ráquis e a textura das espiguetas (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). O mesmo tem ocorrido com as espécies *Urochloa humidicola* e *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf., pois ambas são separadas principalmente pelo hábito de crescimento, sendo *U. humidicola* estolonífera e *U. dictyoneura*, cespitosa (RENZOIVE et al., 1996; JUNGSMANN et al., 2010). Além disso, alguns autores citam que a espécie *U. humidicola* já foi incluída como subespécie de *U. dictyoneura* (VELDKAMP, 1996; CATASÚS- GUERRA, 2001; ZULOAGA et al., 2003) e a cultivar Llanero (acesso H125- EGC) de *U. humidicola*, em literaturas mais antigas é descrita em *U. dictyoneura* (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE 1996).

Grande parte das espécies de *Urochloa* usadas comercialmente no país são de origem Africana (VALLE et al., 2010). No Brasil, o gênero foi introduzido oficialmente em 1952, pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte (IPEAN), com a espécie *U. decumbens* (Stapf) R.D. Webster, que inicialmente foi identificada como *U. brizantha* (VALLE et al., 2010). No entanto, foi a partir da década de 1965 que houve uma maior disseminação do gênero, com a introdução de outras espécies, como *U. brizantha* e *Urochloa ruziziensis*, seguido na década de 70 por *Urochloa arrecta* (Hack. ex T. Durand & Schinz) Morrone & Zuloaga e *U. humidicola* (KARIA et al., 2006; VALLE et al., 2010). Dentre essas espécies, as mais utilizadas comercialmente, destacam-se *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. ruziziensis* e *U. humidicola* (PACIULLO; GOMIDE, 2016).

Quanto ao modo de reprodução, o gênero inclui espécies sexuais e apomíticas, sendo esse último do tipo apospórica (CONNER; OZIAS-AKINS, 2017). A apomixia permite a obtenção de indivíduos idênticos a planta mãe via sementes, e ocorre frequentemente em poliploides e raramente em diploides (ASKER, 1979; RICHARDS, 2003; LEÓN-MARTÍNEZ; VIELLE-CALZADA, 2019). *U. ruziziensis* apresenta indivíduos sexuais, diploides e tetraploides obtidos sinteticamente (SWENNE et al., 1981; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1986; ISHIGAKI et al., 2009, 2010; TIMBÓ et al. 2014a, 2014b). Há predominância de tetraploides e acessos apomíticos para *U. decumbens* e *U. brizantha* (MENDES- BONATO et al., 2002; RICCI et al., 2011a). Por sua vez, *U. humidicola* possui em sua maioria indivíduos poliploides apomíticos apospóricos

(JUNGMANN et al., 2010) e somente um acesso sexual hexaploide registrado ( $2n=6x=36$ –acesso H031) (VALLE; GLIENKE, 1991; PENTEADO et al., 2000; BOLDRINI et al., 2011b; VIGNA et al., 2016a). Este acesso tem sido alvo de programas de melhoramento para a obtenção de híbridos intraespecíficos em cruzamentos com o acesso H016 (cv BRS Tupi) e com o CIAT 16888 (H027) (BOLDRINI et al., 2011a; RICCI et al., 2011b; FIGUEIREDO; NUNES; VALLE, 2012; WORTHINGTON et al., 2019). Por se tratar do único acesso sexual identificado da espécie, estudos visando entender a sua origem também vem sendo desenvolvidos (JUNGMANN et al., 2010; VIGNA et al., 2016a; WORTHINGTON et al., 2019).

Algumas das espécies do gênero utilizadas na formação das pastagens apresentam vantagens e desvantagens. *U. brizantha* apresenta boa flexibilidade de uso (PACIULLO; GOMIDE, 2016), boa cobertura e resistência à cigarrinha (MACHADO et al., 2010), mas requer solos férteis (KARIA et al., 2006) e apresenta baixa adaptação a solos mal drenados (MACHADO et al., 2010). *U. decumbens* pode ser cultivada em solos ácidos de baixa fertilidade (MACHADO et al., 2010; PACIULLO; GOMIDE, 2016). Entretanto, as plantas são suscetíveis à cigarrinha-das-pastagens e pode ser hospedeira do fungo *Phytomyces chartarum* que ao ser ingerido por causa problemas de fotossensibilidade (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002; KARIA et al. 2006; PACIULLO; GOMIDE, 2016). *U. ruziziensis* é a espécie com melhor relação folha: colmo (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002; SOUZA-SOBRINHO et al., 2016). Por fim, *U. humidicola* é uma opção de forrageira para ser usada em áreas sujeitas ao alagamento temporário (MACHADO et al., 2010; PACIULLO; GOMIDE, 2016), apresenta bom estabelecimento, boa cobertura, adapta-se a solos de baixa fertilidade e tem domínio sobre plantas invasoras (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002; MACHADO et al., 2010). A principal desvantagem dessa espécie é apresentar menor valor nutritivo que as demais espécies do gênero (PACIULLO; GOMIDE, 2016).

Nas últimas décadas, a demanda por carne e produtos laticínios de origem bovina tem aumentado gradualmente. O rebanho brasileiro representa 171 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2017) e a alimentação do rebanho baseia-se principalmente de sistemas de pastagens (PEREIRA et al., 2018). De acordo com os dados do Censo agropecuário (IBGE, 2017), os estabelecimentos rurais no país compreendem aproximadamente 350 milhões de hectares, no qual 45% estão em forma de pastagens, e dentro desses, 63% são de pastagens cultivadas. Além disso, são esperadas mudanças no uso da terra, visando uma eventual expansão das áreas usadas para lavoura e florestas plantadas, para atender às demandas futuras de alimento, fibras e energia, o que implica em aumentar a produtividade das pastagens (PEREIRA et al.,



2018). Para esse fim, no Brasil tem ocorrido um aumento de programas de melhoramento de forrageiras. Os principais programas de melhoramento em andamento no país estão nos centros da Embrapa (JANK et al., 2014), com pesquisas para desenvolvimento de novas cultivares e é onde estão localizados os principais bancos de germoplasma de forrageiras do país.

O desenvolvimento de cultivares de forrageiras é um processo que exige várias etapas que possibilitam a obtenção de um genótipo superior e possivelmente um candidato a nova cultivar. O processo começa com a disponibilidade do germoplasma e sua caracterização para o modo reprodutivo, nível de ploidia, diversidade genética e busca de genes, entre outros (JANK et al., 2014). Dentre essas informações necessárias para uso nos programas, a citogenética tem se mostrado uma ferramenta fundamental, pois através dela é possível apontar genitores compatíveis, determinando-se o nível de ploidia, evidenciando anormalidade meióticas que possam inviabilizar os gametas, elucidando problemas de fecundação e de produção de sementes em híbridos (RESENDE; VALLE; JANK, 2008).

## **2.2 Caracterização Citogenética de espécies de *Urochloa* P. Beauv.**

Em plantas, o número cromossômicos da espécie pode ser encontrado em múltiplos e em séries de ploidia com um número básico de cromossomos que vai desde de diploides ( $2x$ ) a poliploidias elevadas, como, por exemplo, hexaploide ( $6x$ ), heptaploides ( $7x$ ) e octaploides ( $8x$ ) (ALIX et al., 2017). Em *Urochloa* observa-se uma grande variação do número básico de cromossomos (VALLE et al., 1990) sendo encontrados  $x= 6, 7, 8, 9, 10, 11$  e  $12$  (DARLINGTON; WYLIE, 1956; DUJARDIN, 1979; SHARMA; SHARMA, 1979; SHARMA; KOUR, 1980; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VALLE; SAVIDAN, 1996; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; VALLE; PAGLIARINI, 2009), com predominância de  $x=9$ . Além disso, o gênero apresenta uma grande diversidade de números cromossômicos, indo de  $2n=14$  a  $2n= 90$  (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Em *U. brizantha*, por exemplo, são encontrados representantes com  $2n=2x=18$ ;  $2n=4x=36$ ;  $2n=5x=45$  ou  $2n=6x=54$ . Em *U. decumbens*  $2n=2x=18$  ou  $2n=4x=36$  e *U. ruziziensis*  $2n=2x=18$  (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Em *U. humidicola* há uma extensa literatura relatando a variação na descrição do número básico e do nível de plodia, sendo esse último dependente do número básico proposto. Há descrição de acessos com  $2n=6x=36$  (BOLDRINI et al., 2011b);  $2n=7x= 42$  (BOLDRINI et al., 2006; BOLDRINI et al., 2009a) e  $2n= 9x= 54$  (ADMOWSKI et al., 2007; BOLDRINI et al., 2009b), com número básico  $x=6$ . Com  $x= 7$  foi encontrado  $2n=6x=42$  (BERNINI;

MARIN- MORALES, 2001) e por fim com  $x=9$ , foi descrito  $2n=4x=36$  (BERNINI; MARIN- MORALES, 2001);  $2n=7x=42$  (BOLDRINI et al., 2006)  $2n=6x=54$  (BERNINI; MARIN- MORALES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010); e  $2n=8x=72$  (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Um estudo recente, Worthington e colaboradores (2019) baseado em análise comparativa (sintenia) entre os mapas sintéticos das progênies do cruzamento entre os acessos CIAT 26146 (H031) e CIAT 16888 (H027) e o mapa físico de *Setaria italica* (L.) P. Beauv, espécie essa próxima a *Urochloa* com genoma de referência montado, permitiu indicar o número básico de  $x=6$ . Para essa análise, os autores utilizaram marcadores polimórficos do genoma de *S. italica* para atribuir grupos de ligação aos cromossomos e identificar homólogos entre as duas espécies e de sequências consenso de marcadores de dose única, do genoma parcialmente montado do acesso diploide de *U. ruziziensis* (CIAT 26162), e o de uma progênie de *U. humidicola* (CIAT 26146 x CIAT 16888). Com isso, a comparação entre os mapas dos parentais dessa progênie e o mapa físico de *S. itálica* mostrou seis cromossomos base em *U. humidicola*, sendo isso ratificado pela comparação com os dados de *U. decumbens* e *U. ruziziensis* (WORTHINGTON et al., 2016). Os autores observaram que os cromossomos 3, 5 e 6 de *U. humidicola* tinham um alto grau de sintenia com os cromossomos 3, 8 e 9 de *S. italica*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* e que o menor número básico de *U. humidicola* comparado a *U. decumbens* e *U. ruziziensis* deve-se à fusão de três pares de cromossomos, que correspondem aos cromossomos 1 e 7 de *S. italica* com o 1 de *U. humidicola*, os cromossomos 2 e 4 de *S. italica* referem-se ao 2 de *U. humidicola* e o cromossomo 4 de *U. humidicola* corresponde aos cromossomos 5 e 6 de *S. italica*. Por meio disso, os autores propõem que a sintenia entre o *S. italica*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, como também outras espécies de *Urochloa*  $x = 9$  são originárias de ancestrais de *U. humidicola*. Com base nessas observações, os autores confirmam a descrição de  $x=6$ , já relatada em outros trabalhos citogenéticos (BOLDRINI; PAGLIARINI; VALLE, 2006; ADAMOWSKI et al., 2007; BOLDRINI et al., 2009a, 2009b; BOLDRINI et al., 2011a, 2011b; VIGNA et al., 2016a).

Estudos citogenéticos, sejam eles convencionais ou moleculares, permitem a detecção de possíveis alterações cariotípicas, como o número e a morfologia cromossômica, e fornecem uma visão geral do comportamento desses na mitose e na meiose (CHESTER et al., 2010). Em *Urochloa*, um dos primeiros estudos cariotípicos foi publicado por Bernini e Marin- Morales (2001). Esse estudo avaliou 12 acessos diferentes de cinco espécies do grupo (*U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola*, *U. jubata* (Fig. Et De Not.) Stapf e *U. ruziziensis*). Os autores realizaram contagens cromossômica, avaliaram parâmetros

cromossômicos dos acessos, tais como: comprimento absoluto de cada braço, relação de braços, comprimento relativo, comprimento total do lote haploide e presença de satélites. Por fim, os autores avaliaram o grau de assimetria cariotípica dos acessos, de acordo com o proposto por Zarco (1986). Os autores, relataram a existência de diferenças cariotípicas entre as espécies analisadas, havendo simetria cromossômica entre os acessos da mesma espécie. Em relação a morfologia, a maioria dos cromossomos foi classificado como metacêntricos e submetracêntricos. Entre os acessos/espécies avaliados, os autores descreveram variações no nível de ploidia de diploide a hexaploide e número cromossômico de  $2n= 18, 36, 42, e 54$ , todos com número básico  $x= 9$ , exceto o acesso H013 de *U. humidicola* que apresentou  $x=7$ , considerado pelos autores como um hexaploide ( $2n=6x=42$ ), baseados em descrições anteriores feitas para o gênero. Por fim, as observações quanto ao número de satélites, houve variação desses dentre os acessos da mesma espécie.

Em relação a meiose, os estudos realizados em *Urochloa humidicola* mostraram que há anormalidades tanto meióticas quanto pós-meióticas dos acessos e híbridos intraespecíficos (BOLDRINI et al., 2006; ADAMOWSKI et al., 2007; GALLO et al., 2007; BOLDRINI et al., 2009a, 2009b; BOLDRINI et al., 2010; BOLDRINI et al., 2011a, 2011b; RICCI et al., 2011b). Estudos com os acessos dessa espécie mostram que a maioria das anormalidades ocorrem devido a poliploidia, pois essa pode acarretar problemas de pareamento durante a meiose (BOLDRINI et al., 2006).

O acesso H003 ( $2n=7x= 42$ ) de *U. humidicola* tem sido alvo de alguns estudos meióticos (BOLDRINI et al., 2006; BOLDRINI et al., 2010). Boldrini e colaboradores (2006) descreveram pela primeira vez o número básico de  $x=6$  no acesso H003 de *U. humidicola*, o qual apresentou  $2n=7x=42$  cromossomos. Os autores observaram cromossomos univalentes retardatários durante a anáfase I, meiócitos que não apresentavam a intercinese após a telófase I, como também relataram à presença de micronúcleos, dentre outras anormalidades, decorrentes da poliploidia. Em outro trabalho com o mesmo acesso, Boldrini e colaboradores (2010) descreveram que as anormalidades e as associações cromossômicas, observadas na diacinese, tais como meiócitos com 12 ou 42 univalentes são evidências da hidridação, tendo sido sugerido o cruzamento de um parental apomítico masculino  $2n=5x=30$  e um acesso sexual diploide,  $2n=2x=12$ , com ambos doando gametas não reduzidos (BOLDRINI et al., 2010).

Outros estudos foram realizados com os demais acessos de *U. humidicola* pertencentes ao Banco de Germoplasma da EMBRAPA Gado de Corte (Campo Grande-MS). O acesso H121 ( $2n=9x=54$ , número básico  $x=6$ ) (ADAMOWSKI et al., 2007) apresentou

ausência ou citocinese incompleta. Adamowski et al. (2007), sugeriram que o controle genético da citocinese nos meiócitos avaliados seriam ativados precocemente e não apresentavam sincronização com a cariocinese, gerando assim gametas não balanceados, além de ser um acesso com alto nível de ploidia.

Em outro estudo, Gallo et al. (2007) observaram a formação de gametas  $2n$  em *U. humidicola* (acesso H047,  $2n=4x=36$ ), por meio da restituição na primeira divisão (FDR). Segundo os autores, essa característica é geneticamente controlada. Levando em consideração o pareamento e o comportamento meiótico anormal há evidências de autoploidia, aloploidia segmentar ou aloploidia verdadeira. Além disso, os gametas  $2n$  originados do processo podem estar ligados à formação de novos poliploides por poliploidização sexual unilateral ou bilateral.

Avaliações com o acesso H030 de *U. humidicola*, mostraram que esse acesso, assim como o acesso H003, apresentou  $2n=7x=42$  (BOLDRINI et al., 2009a). As configurações na meiose também foram semelhantes com formação de constante de univalentes que apresentavam comportamento retardatários durante o alinhamento na placa metafásica, durante a Metáfase I. Com isso, os autores hipotetizaram que o H030 surgiu de um cruzamento entre um genitor hexaploide apomítico masculino ( $2n=6x=36$ ) que contribuiu com gametas não reduzidos  $n=36$  e um feminino sexual diploide ( $2n=2x=12$ ), com ambos os pais apresentando  $x=6$ . A análise do comportamento meiótico do acesso permitiu levantar evidências de que há aloploidização no gênero, mas que ainda pouco se sabe sobre a origem dos aloploidos naturais.

Boldrini e colaboradores (2009b) também analisaram meiócitos do acesso H038 de *U. humidicola*. Contagens em diacinese e anáfase I revelaram o número cromossômico de  $2n=9x=54$ . Foram observadas anormalidades nas diferentes fases da meiose, como segregações cromossômicas irregulares, cromossomos univalentes (presença de 6 univalentes) não reunidos na placa metafásica, formação de micronúcleos, entre outras. Os autores sugeriram, através desses dados que o acesso se originou de um cruzamento entre duas espécies relacionadas com tempo diferente na meiose, no qual o genitor feminino poderia ser um acesso sexual com  $2n=2x=12$  e o masculino, apomítico, com  $2n=8x=48$  que contribuiria com gametas não reduzidos. Logo, o acesso H038 de *U. humidicola* pode ter sofrido várias rodadas de poliploidização no passado até o recente evento de aloploidização.

Em um estudo publicado em 2011a, por Boldrini e colaboradores, foram avaliados 27 acessos nonaploides,  $2n=9x=54$  de *U. humidicola* do banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande-MS. Como resultado, foi observado a variação de meiócitos

anormais de 14,52 a 60% desses acessos. Em relação ao pareamento cromossômico, as diacineses avaliadas mostraram diversas associações cromossômicas variando de bivalentes a nonavalentes. As anormalidades descritas, foram categorizadas por segregações cromossômicas irregulares, bivalentes não orientados na placa metafásica, stickiness, fusão celular e ausência de citocinese, levando a formação de díades e tríades. Dentre essas anormalidades, a segregação cromossômica irregular e cromossomos atrasados nas anáfases foram predominantes, o que conseqüentemente, levou à formação de micronúcleos nas telófases. Essas anormalidades, segundo os autores, são frequentes em acessos poliploides (BOLDRINI et al., 2011a).

Com o intuito de selecionar os melhores acessos para o programa de melhoramento de *U. humidicola*, BOLDRINI et al., (2011b), analisaram a microsporogênese de 20 acessos apomíticos da espécie com  $2n=6x=36$  cromossomos, pertencentes a EMBRAPA Gado de Corte. Dentre os acessos de *U. humidicola* foram observadas irregularidades, frequentemente encontradas em poliploides, como migração precoce dos cromossomos, cromossomos atrasados nas anáfases e formação de micronúcleos. Dentre os acessos analisados, 19 foram selecionados para serem testados como genitores masculinos em cruzamentos intraespecíficos com H031 (sexual) (BOLDINI et al., 2011b).

Em relação aos híbridos produzidos pelo acesso H031 (sexual-  $2n=6x=36$ ), vale ressaltar as análises meióticas dos cruzamentos desse com o acesso apomítico H016 (BRS Tupi-  $2n=6x=36$ ) (RICCI et al., 2011a). O acesso apomítico foi considerado para cruzamento devido a sua população ser originária da mesma região do acesso sexual e possuir uma excelente produtividade e valor nutritivo. Foram selecionadas 50 progênies do cruzamento entre os acessos e em todas as etapas da meiose examinadas, observou-se variação considerável na regularidade das divisões, sendo as porcentagens de tétrades anormais variando de 15,8 a 98,3% entre os híbridos gerados. As altas taxas de anormalidades meióticas não eram esperadas, principalmente por serem híbridos intraespecíficos e a meiose de ambos os parentais serem relativamente estáveis, no genitor feminino (H031), com 16,3% de tétrades anormais e genitor masculino (H016), com apenas 3,1% de tétrades anormais. As principais anormalidades observadas nos híbridos foram relacionadas à segregação cromossômica irregular em ambas as divisões, como por exemplo, migração precoce de cromossomos para a placa metafásica nas metafases I e II, e cromossomos atrasados nas anáfases I e II o que levava, à formação de micronúcleos na telófase I, telófase II e em tétrades. A frequência de micronúcleos foi de até 98,3% das tétrades em um híbrido apomítico. Esses resultados sugerem que os genomas parentais não apresentaram o mesmo

ritmo meiótico. Esperava-se que as diferenças entre os parentais, como um acúmulo de diferenças cromossômicas estruturais, impactassem principalmente na primeira divisão meiótica e tivessem menos impacto na meiose II. Logo, há evidência de que ambos os genomas, dos parentais, não estão intimamente relacionados.

Vigna e colaboradores (2016a), a fim de compreender melhor a genética da poliploidia e a transmissão dessa em *U. humidicola*, para a obtenção de marcadores moleculares úteis aos programas de melhoramento de forrageiras, com a construção de um mapa de ligação da espécie, além de usar de marcadores microssatélites, utilizou-se de dados de associação cromossômica de meiócitos dos acessos hexaploides, H016 cv. BRS Tupi (apomítico), H031 de *U. humidicola* e respectivos híbridos ( $2n=6x=36$ ). Como resultados da meiose, os progenitores e híbridos variaram em suas associações cromossômicas em apenas bivalentes e as combinações de bi e tetravalentes, bi e hexavalentes e bi, tetra e hexavalentes. Houve predomínio de 16 bi e um tetravalente, seguidos por 14 bi e dois tetravalentes. Os hexavalentes foram encontrados em baixa frequência pelo estudo. Os tipos observados de associações cromossômicas nas diacineses, a presença de dois nucléolos em alguns meiócitos, os diferentes tamanhos de genomas e sua alocação preferencial na primeira placa metafásica e migração cromossômica assíncronas para os polos durante as anáfases, juntamente de dados de marcadores, evidenciaram que os genótipos H031 e H016 são aloploidos naturais recentes e que esses acessos provavelmente se originaram de um cruzamento entre um genitor feminino sexual diplóide ( $2n=2x=12$ , genoma A) e um masculino apomítico tetraploide ( $2n=4x=24$ , genoma B) que, após a meiose, deu origem a um triploide ( $2n=3x=18$ , ABB). Uma outra hipótese é que esse triploide, também pode ter sido originado de um cruzamento de dois genitores diploides ( $2n=2x=12$ ), um contribuindo com um gameta reduzido ( $n=6$ , genoma A) e o outro contribuindo com um gameta não reduzido ( $n=12$ , genoma B). Em ambas as hipóteses, triploide sofre duplicação natural e forma um alohexaploide ( $2n=6x=36$ , AABBBB). A predominância de meiócitos com bivalentes e tetravalentes indica que o genoma B permitiu a formação de tetravalentes. No entanto, a ocorrência de hexavalentes, embora em baixa frequência, revela que o genoma A exibe uma certa homeologia com o genoma B, garantindo algumas associações cromossômicas entre eles, o que também foi observado em um mapa genético realizado no estudo. Os híbridos também ofereceram evidências que sugerem a aloploidia de seus genitores devido a assincronia da meiose.

Além dos estudos de citogenética convencional, vale ressaltar os estudos citogenéticos que utilizam-se de técnicas moleculares, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para mapear sequências específicas nos cromossomos ou a hibridização *in situ* genômica (GISH)

com sondas de DNA genômico para identificar a origem parental dos cromossomos em híbridos e alopoliploides (CHESTER et al., 2010). A FISH tem sido uma das técnicas mais importante na pesquisa citogenética de plantas (JIANG, 2019). Essa técnica utiliza-se de marcadores que identificam cromossomos específicos, fornecendo meios de se estudar mudanças genômicas através de sequências repetitivas altamente conservadas que podem ser usadas como sondas na maioria das plantas, tais como rDNA 5S e 35S (25S, 18S e 5.8S), repetições teloméricas, centroméricas, entre outras (CHESTER et al., 2010). A aplicação mais conhecida da FISH é o mapeamento de sondas de DNA para cromossomos, permitindo assim o estabelecimento de um mapa físico das sondas que permitiria a integração de mapas de ligação genética com mapas cromossômicos (JIANG, 2019).

A FISH e a GISH em *Urochloa* têm sido empregadas para auxiliar na discriminação dos cromossomos e genomas, pois o gênero apresenta diferentes números básicos e diferenças cariotípicas que indicam a coexistência de diferentes genomas e rearranjos cromossômicos nas espécies presentes no grupo (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NANI et al., 2016; PAULA et al., 2017; ROCHA et al., 2019; CÔRREA et al., 2020; MENDES et al., dados não publicados).

O estudo de Akiyama et al. (2010) avaliou citogeneticamente diferentes acessos de três espécies de *Urochloa* (*U. brizantha*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis*) e um híbrido de *U. brizantha*, a cultivar Mulato (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandú), por meio da FISH. Com esse estudo, foi possível verificar o número cromossômico para cada acesso, além de identificar os cromossomos portadores do rDNA 5S e 25S, e propor a natureza alopoliploide das espécies, pois esse apresenta diferenças no número de sítios, entre os indivíduos da mesma espécie. O acesso *U. humidicola* CIAT 6369 foi determinado como hexaploide ( $2n=6x=54$ ), com  $x=9$  e apresentou três cromossomos com sítio rDNA 5S, três com 25S e outros três com sítios 25S sintênicos a 5S.

A citogenética molecular também permite entender a natureza da poliploidia de acessos apomíticos (NIELEN et al., 2010). A análise de acessos *U. brizantha* diploide sexual e tetraploide apomítico, através da construção de mapas físicos de rDNA, permitiram elucidar a alopoliploidia dessa espécie, reforçando o já proposto por Akiyama, Yamada- Akiyama e Ebina (2010). As diferenças marcantes, como a presença de apenas um loco de rDNA 5S em um acesso diploide e de três no tetraploide, reforça essa teoria, pois, de acordo com o autor, com a tetraploidização seriam esperados dois locos. Além disso, a FISH identificou, um sítio de rDNA 45S no acesso diploide e dois no tetraploide. Neste último, apenas um sítio estava ativo, com isso, subentende-se que houve o fenômeno de dominância nucleolar, pois esse

fenômeno, híbridos ou aloploplóides desenvolvem nucléolos nos cromossomos de apenas um dos pais.

Nani et al. (2016) avaliaram o cariótipo de *U. brizantha* (tetraploide), *U. decumbens* (tetraploide) e *U. ruziziensis* (diploide) com mapeamento das sequências de DNAr 5S e 45S, retrotransposon centromérico do milho (CRM1) e bandas CMA e DAPI. Em relação aos sítios ribossomais, em *U. ruziziensis* quatro sítios de rDNA 5S (pares 2 e 6) e dois pares de 35S rDNA (par 8). Em *U. brizantha*, houve variação dentro e entre plantas, sendo relatado quatro, cinco e seis sítios 5S e dois, três e quatro de 35S. Por fim *U. decumbens*, foram relatados sete sítios de 5S (pares 4, 7, 10 e 13), sendo o do par quatro estava em estado de heterozigose e 35SrDNA foram identificados quatro sítios (pares 9 e 11), desses no par 11 os sítios de 35S apresentou heteromorfismo com relação ao comprimento total e a morfologia cromossômica, além de um dos pares apresentarem constrição terciária. Nas três espécies estudadas, foram observadas que as bandas CMA (regiões ricas em guanina e citosina) se co-localizaram com os sítios de rDNA 35S. Houve variação no número de regiões centroméricas marcadas com a sonda CRM1, sendo *U. ruziziensis* a única espécie com todos os centrômeros hibridizados. Não foram observadas bandas DAPI em nenhuma das três espécies.

Um estudo recente, realizado por Mendes e colaboradores (dados não publicados) mapearam, por meio da FISH os sítios de rDNA 5S e 35S em acessos diploides de *U. decumbens* (B105) e *U. brizantha* (D04), além de dois acessos tetraploides *U. dictyoneura* (DT158 e DT159). Para os acessos diploides, além do número cromossômico  $2n=2x=18$ , o que já havia sido evidenciado por Côrrea e colaboradores (2020), foi observado a presença em *U. decumbens* de quatro pares de rDNA 5S e dois sítios de rDNA 35S. Em *U. brizantha* diploide, foram localizados dois sítios de rDNA 5S e 35s. Para os acessos de *U. dictyoneura* foram descritos o número cromossômico de  $2n=4x=24$ . Em relação aos genes rDNA, em ambos os acessos, foram descritos oito sítios de rDNA 5S e quatro sítios de rDNA 35S. Vale ressaltar que os quatro sítios de rDNA 35S eram sintênicos a 5S.

Outra técnica que vem sendo amplamente utilizada para a identificação da ploidia é a citometria de fluxo, que permite a quantificação do DNA nuclear em amostras de plantas (BENNETT; LEITCH, 2011). Em 2019, os dados relacionados a quantidade de DNA/tamanho do genoma estavam disponíveis para 12.273 espécies, nas quais com estimativas para 10.770 espécies angiospermas, 21 gimnospermas, 303 pteridófitas, 334 briófitas e 445 ‘algas’ (correspondem a Rhodophyta, Chlorophyta e as algas verdes estreptófitas no Reino Plantae, e Phaeophyta e Heterokonta dentro dos Stramenopiles) (PELLICER; LEITCH., 2019). Em *Urochloa*, a citometria de fluxo foi usada para a



caracterização de acessos do banco de germoplasma da EMBRAPA Gado de Corte (PENTEADO et al., 2000). Nesse estudo, os autores verificaram o nível de ploidia e a quantidade de DNA de 435 acessos pertencentes a 13 espécies do grupo. Em alguns casos foi feita a contagem cromossômica, por meio de citogenética clássica, para a confirmação do número cromossômico. Destes 435 acessos, 57 eram diploides e os demais variavam de tetraploides (4x) a heptaploides (7x), com maior abundância de tetraploides (254 acessos).

Ishigaki e colaboradores (2010) analisaram os tamanhos dos genomas em quatro espécies de *Urochloa* para avaliar sua possível utilização em cruzamentos. Foram observadas variações nas quantidades de DNA das cultivares, havendo um aumento acompanhando o nível de ploidia. A espécie *U. ruziziensis*, diploide sexual, apresentou o menor valor (0,62 pg), seguida das tetraploides apomíticas, *U. brizantha* (1,43 pg) e *U. decumbens* (1,66 pg), a pentaploide *U. brizantha* (1,78 pg) e a hexaploide *U. humidicola* (1,99 pg). No estudo, os autores destacaram que as diferenças apresentadas nos tamanhos dos genomas das cultivares não representam dificuldades para realização de cruzamentos em *Urochloa* e que as plantas tetraploides apomíticas (*U. decumbens* e *U. brizantha*) podem ser utilizadas como doadoras de pólen em cruzamentos com *U. ruziziensis* tetraploidizada.

Outro estudo de quantificação do tamanho do genoma em *Urochloa* (NITTHAISONG et al., 2016) utilizou 28 acessos de 11 espécies (*Urochloa deflexa* (Schumach) Hubbard, *Urochloa plantaginea* (Link) Hitchc, *Urochloa romosa* (L.) Stapf, *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf, *Urochloa xantholeuca* (Hack. Ex Schinz) H. Scholz, *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. dictyoneura* e *U. humidicola*). Notou-se que os acessos de *U. deflexa*, *U. lata*, *U. plantaginea*, *U. romosa* e *Urochloa ruziziensis* (diploides) apresentavam valor estimado de C entre 0,89 a 1,83 pg/2C. As avaliadas como tetraploides, *U. nigropedata*, *U. xantholeuca*, *U. brizantha* e *U. decumbens* encontravam-se de 1,93 a 3,31 pg/2C. Por fim, *U. brizantha*, *U. dictyoneura* e *U. humidicola*, avaliadas como hexaploides, tiveram seu valor estimado entre 3,39 a 4,02 pg/2C. Os autores também observaram que os acessos apomíticos apresentavam maiores valores C que os sexuais e concluíram que o tamanho do genoma depende do nível de ploidia e do modo reprodutivo, além de notar a relação entre o tamanho do genoma e o número de cromossomos nas espécies.

Paula et al. (2017) quantificou o DNA de alguns híbridos de *Urochloa*, comparando os com os valores obtidos dos parentais, *U. decumbens* cv. Basilisk (3,741 pg) (TIMBÓ et al., 2014a), *U. brizantha* cv. Marandu (3,521pg) (TIMBÓ et al., 2014a) e *U. ruziziensis* tetraploidizada artificialmente (2,922) (TIMBÓ et al., 2014b) com os valores dos híbridos H963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*), H1863 (*U. ruziziensis* x *U. brizantha*) e Mulato II [(*U.*

*ruzizensis* x *U. decumbens*) x *U. brizantha*]. O híbrido 1863 apresentou quantidade de DNA de 3,24 pg estando conforme o esperado a partir dos genitores. O híbrido cv. Mulato II obteve um aumento no conteúdo de DNA em relação à média dos genitores (3,83 pg). O híbrido 963 apresentou 3,62 pg e esse aumento na quantidade de DNA se deveu a presença de dois cromossomos excedentes.

Corrêa et al. (2020) quantificaram o DNA nuclear dos acessos B105 (*U. brizantha*) e D04 (*U. decumbens*), ambos pertencentes ao Banco de Germoplasma da EMBRAPA Gado de Corte. Esses apresentaram valor C de 0,89 pg e de 0,72 pg, respectivamente. Os valores dos genótipos analisados pelos autores foram proporcionais aos já reportados para as cultivares tetraploide de *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk, respectivamente, com 1,43 e 1,66 pg (ISHIGAKI et al., 2010) e 1,75 e 1,89 pg (TIMBÓ et al., 2014a).

A quantificação do DNA (valores 2C) dos acessos tetraploides DT158 e DT 159 de *Urochloa dictyoneura* foram obtidos por Mendes e colaboradores (dados não publicados). Os valores foram, respectivamente, 2,83 pg e 3,12 pg, sendo correspondentes a outras espécies tetraploides do gênero *Urochloa*, como de *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk (ISHIGAKI, 2010; TIMBÓ, 2014a)

### 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

Os acessos de *Urochloa humidicola* avaliados estão descritos na 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 foram mantidas em vasos, em casa de vegetação no Departamento de Biologia da UFLA, Lavras-MG.

Tabela 1 – Identificação dos acessos de *Urochloa humidicola*.

ID.	CIAT	País	Região	Altitude	Precipitação	Meses	Modo
EGC*		de		(m)	(mm)	de	de
		Origem				Seca	reprodução
H016	26149	Burundi	Makamba	1650	1230	4	Apomítico
H031	26146	Burundi	Rutana	1170	1240	4	Sexual
H108	ND	Comercial no Brasil desde 1970	ND	ND	ND	ND	Apomítico
H125	6133	Zambia	Norte	1242	1200	7	Apomítico
H126	6369	ND	ND	ND	ND	ND	Apomítico

Fonte: EMBRAPA Gado de corte (2020). EGC\*- EMBRAPA Gado de corte; ND- Não determinado.

#### 3.3 Preparações cromossômica

Para a obtenção das metáfases mitóticas, foram coletadas pontas de raízes entre os horários de 9 da manhã ao meio dia e pré-tratadas com ciclohexamida 12,5 mg L<sup>-1</sup>, por 2 h a temperatura ambiente. Após esse processo, as raízes foram lavadas com água destilada e fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) e mantidas por 24h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as raízes foram armazenadas em freezer a -20°C em álcool 90% até o momento de uso.

A digestão da parede celular foi feita em 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 40 minutos, em média, a 37°C. As lâminas foram preparadas de acordo com a técnica de dissociação celular e secagem ao ar (CARVALHO; SARAIVA, 1993). As preparações cromossômicas foram avaliadas em microscópio de luz e aquelas contendo as melhores metáfases, com cromossomos espalhados e sem sobreposições, foram selecionadas para a FISH.

### 3.4 Hibridização *in situ* fluorescente- FISH

Para a FISH foram utilizadas sondas de rDNA 35S (pTa71; 18S-5.8S-25S- *Triticum aestivum* L.), marcadas indiretamente com biotina, via reação de nick translation. As sondas de rDNA 5S foram marcadas indiretamente com digoxigenina via reação de PCR com primers específicos RICRGAC1 e RICRGAC2 obtidos e amplificados a partir do genoma de *Oryza sativa* L. (FUKUI; OHMIDO; KHUSH, 1994).

Para a preparação cromossômica, a lâmina foi pós-fixada com formaldeído 4% em SSC2x por 10 minutos. Após esse procedimento, a preparação cromossômica foi desnaturada em formamida 70% em SSC 2x por 1 min e 16s a 85 °C, seguido de desidratação em uma série alcoólica gelada 70%, 90% e 100%. Em seguida, a mistura de hibridização [75% formamida, 2 x SSC, 12,5% de sulfato de dextran, 1 µL de esperma de salmão (concentração de 10 mg/ mL) e aproximadamente 40 ng/µL das sondas 35S e 5S rDNA] foi desnaturada por 8 min a 95 °C em banho seco imediatamente transferida para o gelo e aplicada sobre a lâmina com a preparação cromossômica.

A hibridização realizou-se no período de 24/48h a 37 °C em câmara úmida. Para a detecção das sondas, foram usados os anticorpos anti-digoxigenina conjugado com rodamina e anti-biotina conjugado com FITC, por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida. Após remoção da lamínula, a lâmina foi imersa em série alcoólica crescente, por dois minutos em TA e então secas ao ar, em local livre de luz. As lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI.

Com o auxílio de microscópio Olympus BX60 equipado com sistema de epifluorescência e câmera digital refrigerada, as metáfases foram avaliadas utilizando 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 foram processadas em software de edição de imagem.

### 3.5 Cariogramas e Idiogramas

Os dados morfométricos dos cromossomos foram obtidos a partir da análise de cinco metáfases. As medições e a montagem do cariótipo foram feitas como o auxílio do software Dawid (KIROV et al., 2017) e os idiogramas foram construídos a partir desses dados. Os parâmetros cromossômicos usados foram: tamanho do braço curto (s) e longo (l) dos cromossomos; comprimento total do cromossomo  $i$  ( $C_{ti} = l + s$ ); o comprimento total do lote haploide ( $CTLH = \sum C_{ti}$ ), o comprimento relativo de cada cromossomo ( $CR = C_{ti}/CTLH \times 100$ ), relação de braços ( $RB = l/s$ ) e o índice centromérico ( $IC = c/C_{ti} \times 100$ ). A nomenclatura para descrever a morfologia cromossômica e a localização dos sítios de rDNA foi baseada em Levan et al. (1964) e Heslop-Harrison e Schwarzbacher (2011), respectivamente. Para determinar a simetria cariotípica foram utilizados os critérios de Stebbins (1971), Zarco (1986) e Eroğlu (2015). Stebbins (1971) considera a relação entre os braços e os comprimentos dos cromossomos para avaliar a simetria cariotípica. Os critérios de Zarco (1986) se baseiam nos índices A1, assimetria intracromossômica (em relação à posição do centrômero) e A2, assimetria intercromossômica (em relação ao tamanho). Eroğlu (2015) propõem o uso da fórmula  $(S/A_i = (1 \times M) + (2 \times SM) + (3 \times ST) + (4 \times T)/2n)$  que se baseia na morfologia cromossômica segundo Levan et al. (1964) e no índice centromérico.

### 3.6 Citometria de Fluxo

Três amostras de 20-30mg de tecido foliar dos acessos de *Urochloa humidicola* (TABELA 1) e da planta padrão de referência interna (*Pisum sativum* L., quantidade de DNA 2C de DNA contendo= 9.09pg) foram maceradas em placa de Petri contendo solução tampão de extração de núcleos, LB01, para obter a suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). Após a filtragem, foi adicionado 25µL de iodeto de propídeo à suspensão nuclear. Pelo menos 10.000 núcleo foram quantificados por amostra.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur 4 cores (Becton Dickinson) e os histogramas obtidos pelo software BD CellQuest™ (2007). Os dados foram analisados, por meio do software WinMDI™. O conteúdo de DNA foi estimado em picogramas (pg). Os valores de conteúdo de DNA foram submetidos à análise de variância, pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5% de probabilidade, pelo programa Sisvar (FERREIRA, 2014).

Além disso, foram obtidos os parâmetros valor 2C e o Cx, baseados em Greilhuber et al. (2005). O valor 2C corresponde ao tamanho do genoma holoploide, ou seja, representa o

complemento cromossômico inteiro e o DNA característico do organismo, independente do grau de ploidia. Por fim, o valor  $Cx$ , indica o número cromossômico e o DNA do organismo em relação ao número básico  $x$ , genoma monoploide (GREILHUBER et al., 2005).

## 4 RESULTADOS

Os kariogramas dos acessos de *U. humidicola* foram organizados com base nos resultados obtidos nas análises meióticas (BOLDRINI et al., 2009a, 2009b, 2011a; 2011b) e no mapeamento de ligação genética (VIGNA et al., 2016a), além das análises morfométricas dos cromossomos e mapeamento dos sítios de rDNA obtidas nesse estudo. Como foram observadas variações no número de sítios em alguns acessos, o detalhamento e a representação cariotípica considerou a maior frequência de sítios de DNA ribossomais.

### 4.1 Número Cromossômico e Tamanho do Genoma

Os dados de contagens cromossômicas e conteúdo de DNA dos acessos de *U. humidicola* estão apresentados na Tabela 2 e Figura 1. Dentre os acessos avaliados, o acesso H031 foi identificado como um aneuploide com  $2n=6x=36+1$  (FIGURA 1B) e quantidade DNA nuclear de 3,01 pg (TABELA 2).

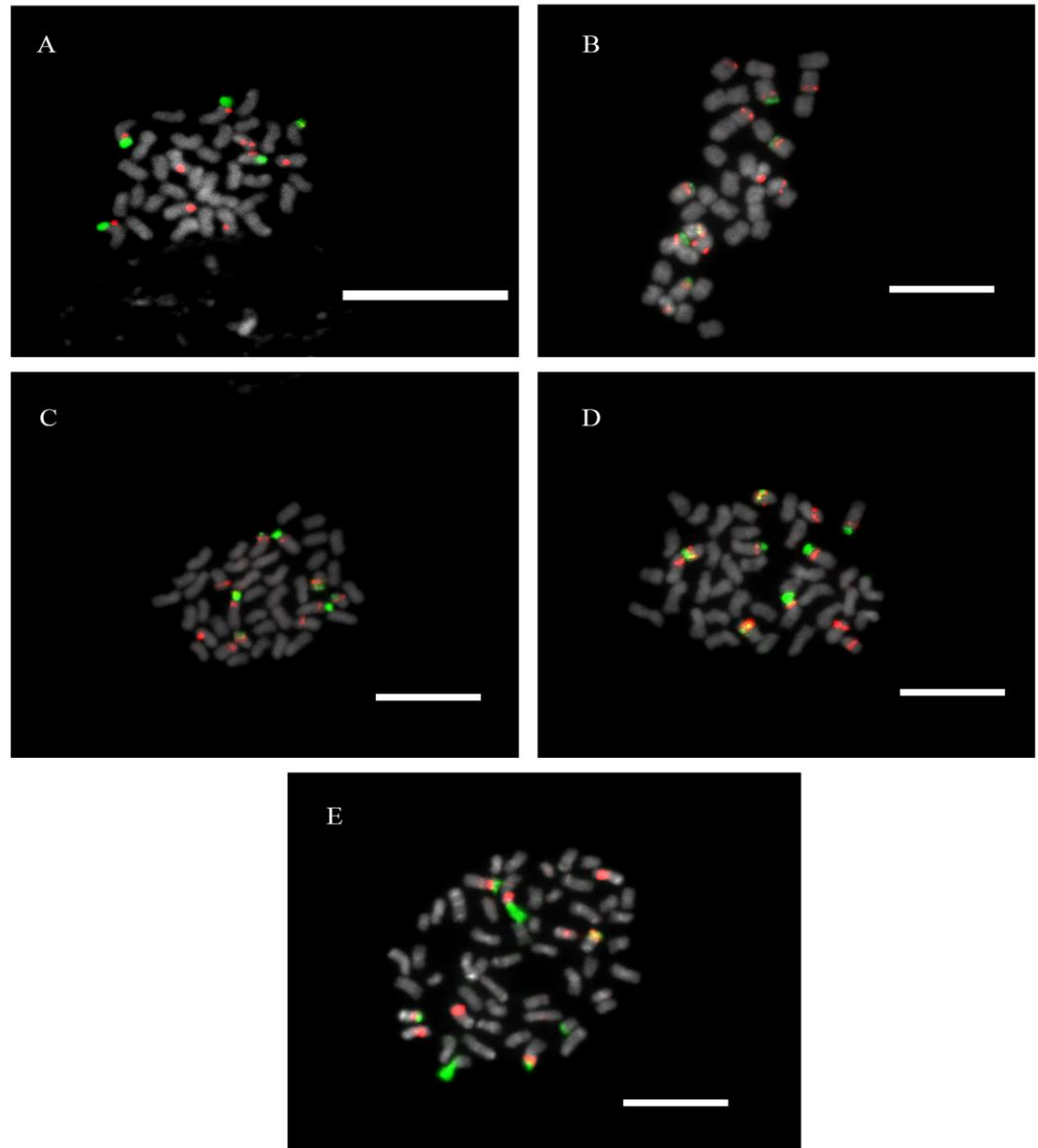
Tabela 2- Conteúdo de DNA de nuclear, número cromossômico e comprimento total do lote haploide (CTLH) em acessos de *U. humidicola*.

Acessos	Valor 2C (pg)*	Valor C (pg)	Valor C (Mbp C <sup>1</sup> )	Valor Cx (pg)	Valor Cx (Mbp Cx <sup>-1</sup> )	Número cromossômico	CTLH* (µm)
H016	2,95a	1,48	1442,55	0,49	480,85	2n=6x=36	32,25a
H031	3,01a	1,5	1471,89	0,5	490,63	2n=6x=36+1	28,92a
H125	3,51b	1,76	1716,35	0,5	490,38	2n=7x=42	48,99b
H126	4,45c	2,22	2176,05	0,63	621,73	2n=7x=42	43,94c
H108	3,94d	1,97	1926,66	0,44	428,15	2n=9x=54	42,44c

Pg= picogramas. Mbp = Mega pares de bases. Valor C = conteúdo de DNA gamético. Valor Cx = Conteúdo de DNA por genoma. \*médias seguidas por letras diferentes nas linhas de uma coluna, diferem umas das outras pelo teste de Scott-Knott para  $p \leq 0,05$ .

Fonte: Do autor (2020).

Figura 1- Metáfases dos acessos de *U. humidicola* (A) H016 ( $2n=6x=36$ ), (B) H031 ( $2n=6x=36+1$ ), (C) H125 ( $2n=7x=42$ ), (D) H126 ( $2n=7x=42$ ) e acesso H108 ( $2n=9x=54$ ). Em verde, sítios de rDNA 35S e em vermelho, sítios de rDNA 5S. Barra: 10  $\mu$ m



Fonte: Autor (2020).

#### 4.2 Dados cariotípicos dos acessos de *U. humidicola*

Todos os acessos, independente do nível de ploidia, apresentaram cromossomos metacêntricos, cariótipos simétricos, classificados categoria 1A de Stebbins (1971) e índice  $S/A_i=1$  de acordo com Eroğlu (2015) (FIGURA 2 e 3 e TABELAS APÊNDICE A1 e A5). As variações nos índices de assimetria intracromossômica ( $A_1$ ) e intercromossômica, de acordo com critérios de Zarco (1986) estão apresentados no Quadro 1.



Figura 2- Cariogramas dos acessos de *U. humidicola* (A) H016 ( $2n=6x=36$ ), (B) H031 ( $2n=6x=36+1$ ), (C) H125 ( $2n=7x=42$ ), (D) H126 ( $2n=7x=42$ ) e acesso H108 ( $2n=9x=54$ ). Em verde, sítios de rDNA 35S e em vermelho, sítios de rDNA 5S. Barra: 10 $\mu$ m. Fonte: Autor (2020)

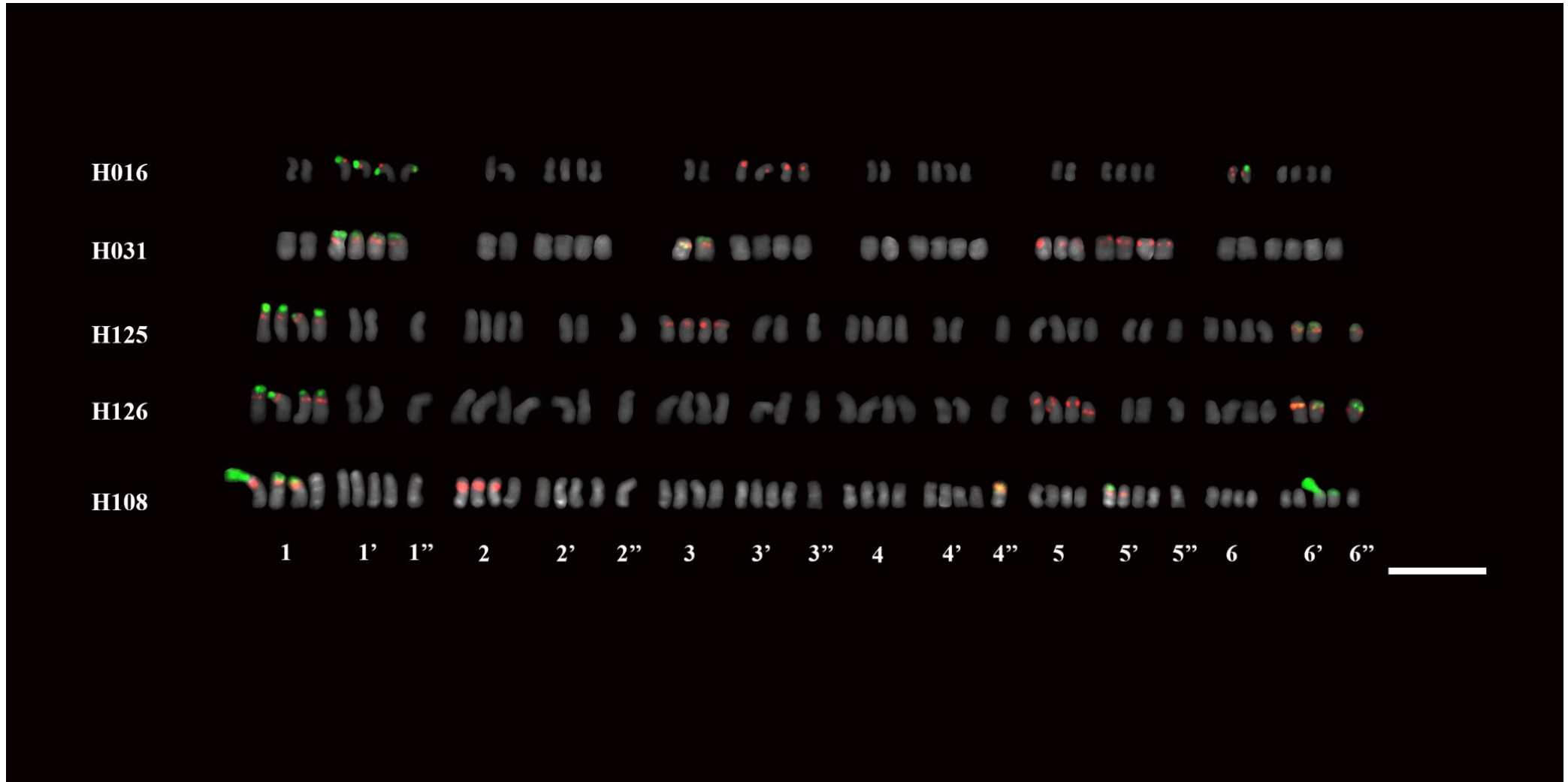
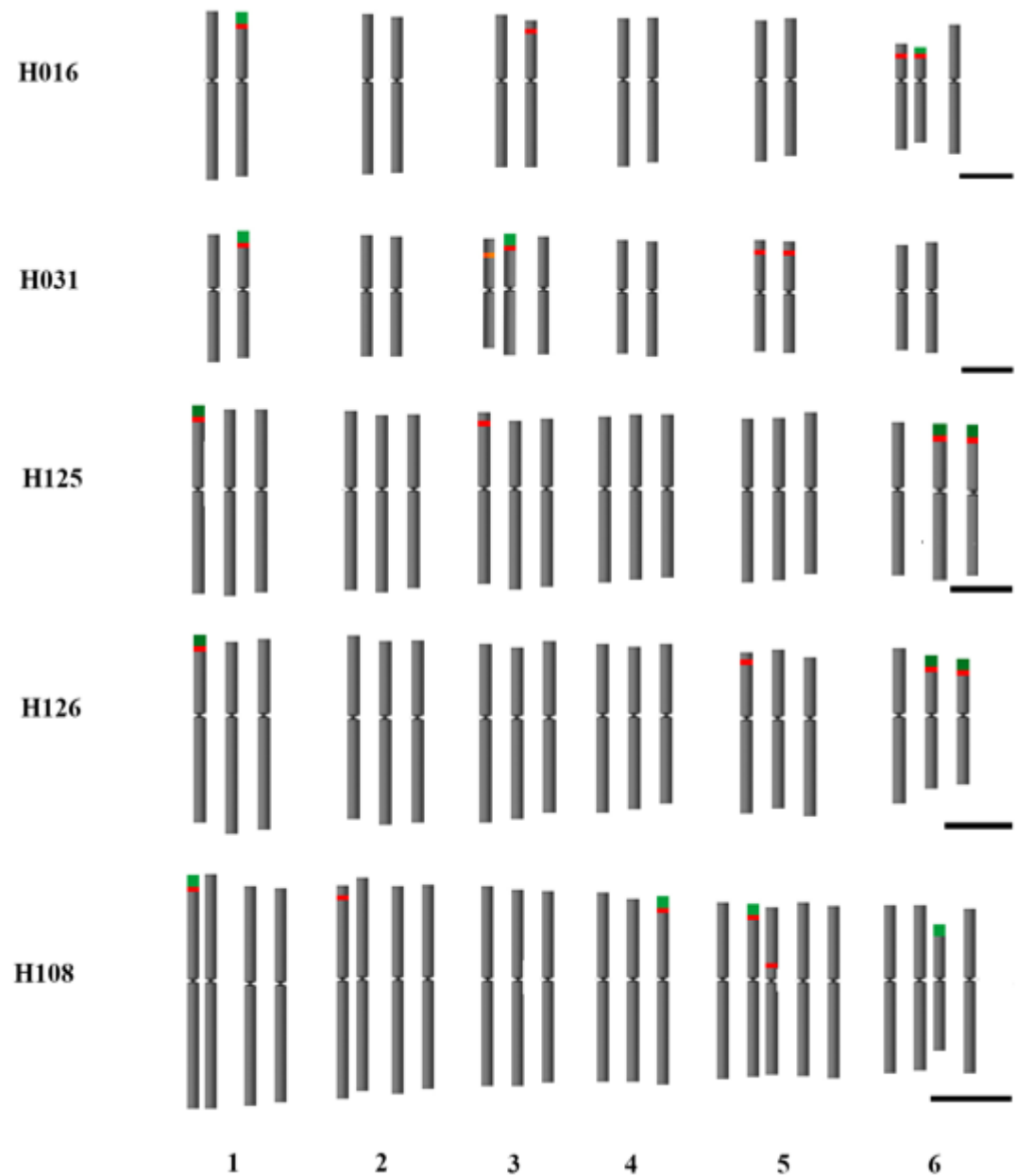


Figura 3- Idiogramas dos acessos de *U. humidicola* (A) H016 ( $2n=6x=36$ ), (B) H031 ( $2n=6x=36+1$ ), (C) H125 ( $2n=7x=42$ ), (D) H126 ( $2n=7x=42$ ) e acesso H108 ( $2n=9x=54$ ). Em verde, sítios de rDNA 35S e em vermelho, sítios de rDNA 5S. Barra: 1 $\mu$ m.



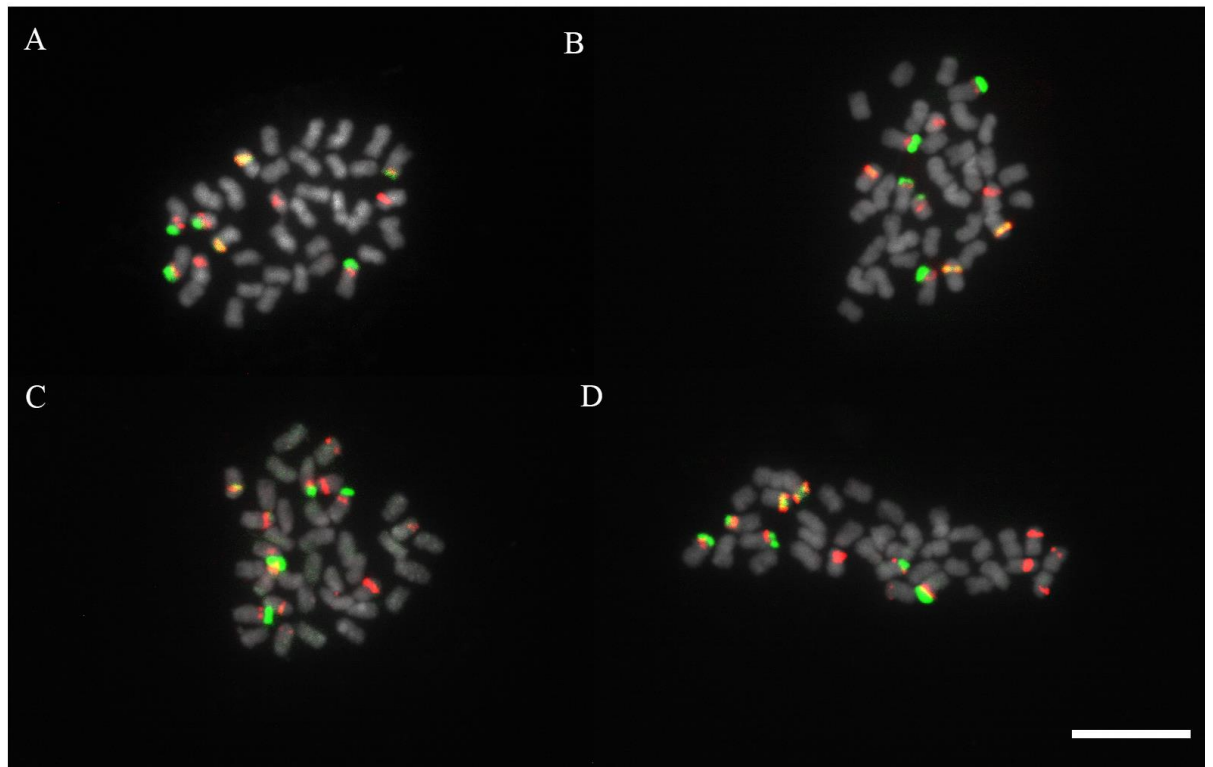
Fonte: Autor (2020).

### 4.3 Mapeamento dos sítios de rDNA 35S e 5S

Os sítios de DNA ribossomal 35S no acesso H016 de *U. humidicola* foram evidenciados em cinco cromossomos localizados nas regiões terminais dos grupos cromossômicos 1' e 6, sendo que nesses, foi observada a sintenia com sítio de rDNA 5S. No par 6, o sítio 35S está em estado hemizigoto. Outros cinco sítios de rDNA 5S, em posição intersticial nos cromossomos, foram identificados nos grupos 3' e no 6 (FIGURA 2). Em uma frequência menor, variações no número de sítios de rDNA também foram observadas, com sete ou oito sítios de rDNA 35S sintênicos com o sítio 5S, sendo cinco deles em posição terminal e os demais, intersticial. Outros dois ou três sítios de rDNA 5S estavam em posição intersticial nos cromossomos (FIGURAS 4A e B). Nos grupos 3' e 6, portadores dos sítios ribossomais sintênicos e 5S, respectivamente, foram observadas diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos (APÊNDICE A1; FIGURA 3).

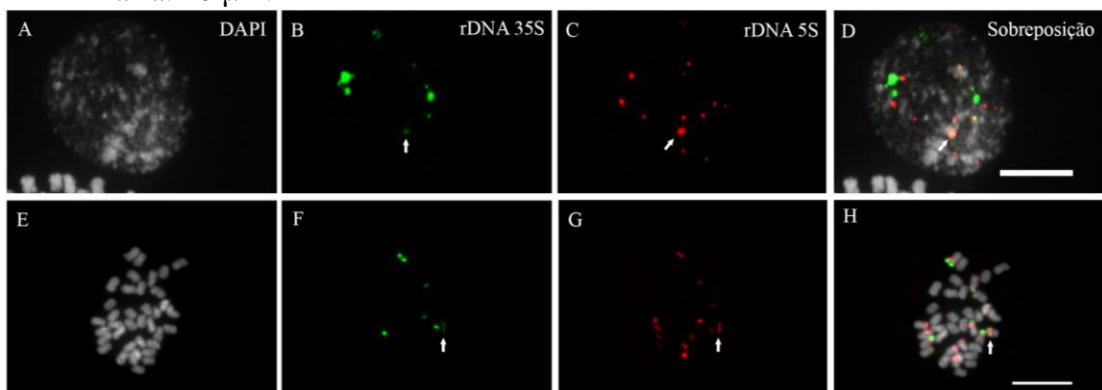
No acesso aneuploide H031, foram identificados sítios sintênicos de rDNA 35S e 5S nos grupos cromossômicos 1' e 3. Outros sete sítios de rDNA 5S, em posição intersticial nos cromossomos foram observados nos grupos 5 e no 5', sendo um deles no grupo 5, provavelmente, o cromossomo extra (FIGURA 2). Tanto em alguns núcleos interfásicos (FIGURA 5A- D), quanto em metáfases (FIGURA 5 E-H) foi observada a co-localização de um sítio de rDNA 5S com 35S. Assim como observado no acesso H016, esse acesso também apresentou, em frequências menores, variações nos números de sítios de rDNA 35S e 5S, sendo entre seis e sete sítios de 35S sintênicos com 5S e seis sítios intersticiais de 5S (FIGURA 4C e D). Diferenças entre os cromossomos homólogos para o comprimento total foram evidenciadas nos grupos 3, 4, 5 e 6 (APÊNDICE A2; FIGURA 3).

Figura 4- Metáfases dos acessos H016 ( $2n=6x=36$ ) (A e B) e H031 ( $2n=6x=36+1$ ) (C e D) de *Urochloa humidicola*. A-Metáfase com sete sítios de rDNA 35S sintênicos a 5S e três sítios de rDNA 5S. B- Metáfase com oito sítios de rDNA 35S sintênicos a 5S e dois sítios de rDNA 5S. C- Metáfase com seis sítios rDNA 35S sintênicos a 5S e seis sítios de rDNA 5S. D-Metáfase com sete sítios de rDNA 5S. Em verde, sítios de rDNA 35S e em vermelho, sítios de rDNA 5S. Barra: 10  $\mu$ m



Fonte: Do autor (2020).

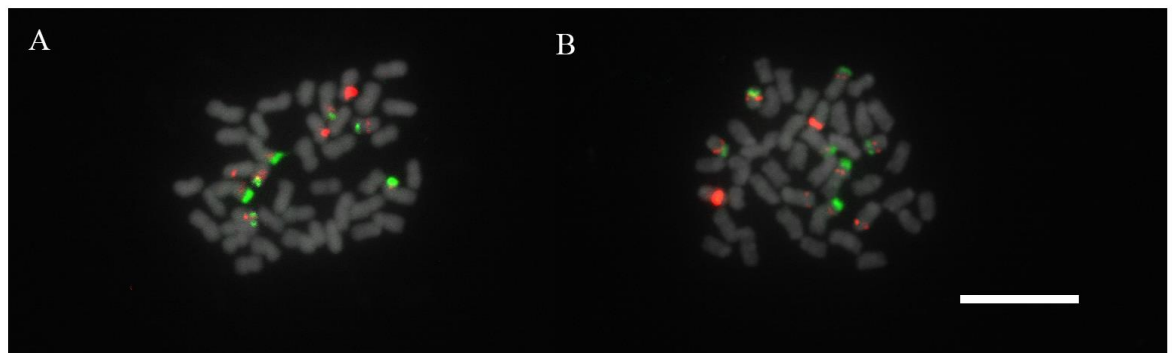
Figura 5- Sítios de rDNA 5S e 35S co-localizados no acesso H031 de *U. humidicola*. A a D-Núcleo interfásico (DAPI em cinza). E a H- Metáfase (DAPI em cinza). A seta indica co-localização dos sítios de rDNA 35S (em verde) e 5S (em vermelho). Barra: 10  $\mu$ m.



Fonte: Do autor (2020).

Nos acessos H125 e H126, sete cromossomos apresentaram sítios de rDNA 35S localizados nas regiões terminais dos grupos cromossômicos 1, 6' e 6'', sendo esses sintênicos com o sítio de rDNA 5S. Outros quatro sítios de rDNA 5S, para ambos os acessos, foram evidenciados em posição intersticial nos cromossomos, nos quais para o acesso H125 foi identificado no grupo 3 e no acesso H126 no grupo 5 (FIGURA 2). Além disso, em algumas metáfases do acesso H125 foram observados sete sítios de 35S sintênicos a 5S nas regiões terminais e três sítios de rDNA 5S intersticiais (FIGURA 6A). Essa variação também foi observada para o acesso H126, nos quais foi evidenciado nove sítios de 35S sintênicos a 5S nas regiões terminais (sete) e intersticiais (dois) e dois sítios de rDNA 5S intersticiais (FIGURA 6B). Ambos os acessos apresentaram diferenças em relação ao comprimento total entre os cromossomos homólogos, sendo nos cromossomos do grupo 4 para o acesso H125 e nos grupos 1 e 5 para o acesso H126 (APÊNDICE A3 e A4; FIGURA 3).

Figura 6- Metáfases dos acessos H125 (A) e H126 (B) ( $2n=7x=42$ ) (A e B) com variações nos sítios de rDNA 35S e 5S. A-Metáfase com sete sítios de rDNA 35S sintênicos a 5S e três sítios de rDNA 5S. B- Metáfase com nove sítios de rDNA 35S sintênicos a 5S e dois sítios de rDNA 5S. Em verde, rDNA 35S e em vermelho, rDNA 5S. Barra: 10  $\mu$ m.



Fonte: Do autor (2020).

No acesso nonaploide H108, sete cromossomos apresentaram sítios de rDNA 35S localizados nas regiões terminais, dos grupos 1, 4'' e 5', sintênicos com o sítio de rDNA 5S e dois 35S no grupo 6'. Outros três sítios de rDNA 5S, em posição intersticial nos cromossomos, foram identificados no grupo 2 e um cromossomo na região pericentromérica, grupo 5' (FIGURA 3 e 4). Nos grupos 1, 2 e 5' há cromossomos em estado de hemizigose para um dos sítios de DNA ribossomal. Os grupos 4'' e 6' apresentaram diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos, devido à presença de sítios rDNA 35S e

5S (APÊNDICE A5; FIGURA 3).

Quadro 1- Características citogenéticas avaliadas dos acessos de *U. humidicola*.

Características avaliadas	Acesso H016	Acesso H031	Acesso H125	Acesso H126	Acesso H108
Número Cromossômico (2n)	36	36 +1	42	42	54
Nível de ploidia	6x	6x	7x	7x	9x
Número básico de cromossomos	6	6	6	6	6
Quantidade de DNA nuclear (pg)	2,95	3,01	3,51	4,45	3,94
Valor C (MbpC <sup>-1</sup> )	1442,55	1471,89	1716,39	2176,05	1926,66
Valor Cx (Mbp Cx <sup>-1</sup> )	480,85	490,63	490,38	621,73	428,15
Fórmula Cariotípica	36m	37m	42m	42m	54m
CTLH <sup>1</sup> (µm)	32,25	28,92	48,99	43,94	42,44
Número de sítios de 35S rDNA	5	6	7	7	7
Grupos cromossômicos e Localização predominante dos sítios de 35S	1' e 6' / Terminal	1' e 2' / Terminal e intersticial	1, 6' e 6'' / Terminal	1, 6' e 6'' / Terminal	1,5' e 6' / Terminal
Número de sítios de 5S rDNA	10	13	11	11	9
Grupos cromossômicos e Localização predominante dos sítios de 5S	3' e 6' / Intersticial	5 e 5' / Intersticial	3/ Intersticial	5/ Intersticial	2 e 5' / Intersticial e pericentromérica
Número de cromossomos com sinais sintênicos de rDNA 35S e 5S	5	6	7	7	5
Índices de Simetria cariotípica					
Stebbins (1971)	1A	1A	1A	1A	1A
S/Ai (EROĞLU, 2015)	1	1	1	1	1
A1 <sup>2</sup> (ZARCO, 1986)	0,27	0,24	0,22	0,26	0,20
A2 <sup>3</sup> (ZARCO, 1986)	0,10	0,06	0,09	0,11	0,12

<sup>1</sup> Comprimento total do lote haploide. <sup>2</sup> Assimetria intracromossômica e <sup>3</sup> Assimetria intercromossômica. Fonte: Do autor (2020).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Considerações sobre o número cromossômico e o tamanho dos genomas dos acessos de *U. humidicola*

Todos os acessos de *U. humidicola* aqui analisados, apresentaram número básico de  $x=6$ , como proposto em análises meióticas (BOLDRINI et al., 2006, 2009 a,b, 2011a,b; ADAMOWSKY et al., 2007; RICCI et al., 2011b; VIGNA et al., 2016). Outros autores baseados em análises mitóticas (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010) descreveram  $x=7$  e  $9$  para alguns acessos, inclusive para o acesso H126 (CIAT 6369),  $2n=6x=54$  (AKIYAMA et al., 2010). Entretanto, esses trabalhos usaram como referência o número básico predominantemente descrito de  $x=9$  para *Urochloa* (VALLE; PAGLIARINI, 2009). O número  $x=6$  foi descrito inicialmente por RISSO-PASCOTTO et al. (2006) em *U. dictyoneura*, espécie próxima filogeneticamente a *U. humidicola* (RENVOIZE; CLAYTON, KABUYE, 1996; MORTON; GONZALES, 2005; SALARIATO et al., 2008; TRIVINÕ et al., 2017).

Em relação às contagens cromossômicas, foi confirmado  $2n=6x=36$  e  $2n=9x=54$  para os acessos H016 e H108 respectivamente, já descritos por Boldrini et al. (2011a; 2011b) e Vigna e colaboradores (2016a). Os acessos heptaploides H125 e H126 apresentaram 42 cromossomos, coincidindo com o número descrito em outros acessos da espécie (H003 e H030) (BOLDRINI et al., 2006; BOLDRINI et al., 2009a; BOLDRINI et al., 2010). Para o H126 (CIAT6369), Akiyama et al. (2010) descreveram  $2n=6x=54$ , diferindo do relato para nível de ploidia e número cromossômico.

O acesso sexual H031 de *U. humidicola* foi identificado como aneuploide com  $2n=6x=36+1$ , diferindo de relatos anteriores baseados em análises meióticas e mapeamento genético, os quais descreveram  $2n=6x=36$  (VALLE; GLIENKE, 1991; BOLDRINI et al., 2011b; VIGNA et al., 2016a; WORTHINGTON et al., 2019). Essas diferenças nas contagens podem estar relacionadas ao tamanho reduzido dos cromossomos dos acessos de *U. humidicola*, segundo a classificação de Fukui e Nakayama (1996), mas principalmente porque as análises anteriores foram feitas em células meióticas com técnicas citogenéticas convencionais.

A aneuploidia observada para acesso H031 foi também identificada em híbridos interespecíficos de *Urochloa* (PAULA et al., 2017; MORAES et al., 2019) e na própria espécie *U. humidicola*, no acesso CIAT 16888 (EGC H027) (WORTHINGTON et al., 2019).



A relevância da ocorrência nesse acesso está associada à aplicação no programa de melhoramento genético, pois ele é o único representante descrito com modo de reprodução sexual para *U. humidicola* e vem sendo utilizado como genitor feminino em programas de melhoramento e produzindo híbridos como, por exemplo, com os acessos apomíticos H016 (cultivar BRS Tupi) (RICCI et al., 2011a; VIGNA et al., 2016a) e H027 (WORTHINGTON et al., 2019).

O tamanho do genoma, com base na quantidade de DNA nuclear, dos acessos de *U. humidicola* é considerado pequeno, de acordo com as categorias definidas por Leitch et al. (2005), pois o valor C, variou de 1,48 a 2,22 pg entre os acessos. Em outros estudos com *Urochloa*, a classificação foi semelhante para os acessos diploides,  $2n=2x=18$ , de *Urochloa brizantha* (B105) e *Urochloa decumbens* (D04) (CÔRREA et al., 2020) e para os acessos tetraploides,  $2n=4x=24$ , de *U. dictyoneura* (MENDES et al., dados não publicados),

Os acessos apresentaram variação na quantidade de DNA proporcional ao nível de ploidia, com exceção do acesso H126. Cabe ressaltar que o tamanho do genoma nem sempre reflete a variação do número, comprimento cromossômico ou número de genes, pois existem mecanismos, tais como fusões ou fissão cêntricas, reparo de quebras da fita dupla (DSB), recombinações homólogas desiguais, eventos de disploidia, perdas ou ganho de fragmentos ou amplificação ou redução de sequências de DNA repetitivo que podem tornar as variações de tamanho de genoma, tamanho e número de cromossomos e de genes, distintos entre si (SCHUBET; VU, 2016; VICIENT; CASACUBERTA, 2017; SILJAK-YAKOVLEV et al., 2017; PELLICER et al., 2018; REN et al., 2018; VITALES et al., 2020).

Semelhante ao observado com os acessos H125 e H126 de *U. humidicola*, as diferenças no conteúdo de DNA nuclear foram observadas entre dois acessos tetraploides de *Urochloa dictyoneura* (MENDES et al., dados não publicados). Essa diferença pode estar associada, possivelmente, a proporção de DNA repetitivo presente nos genomas, sendo esse o principal fator que influencia na variação, quando se comparam espécies próximas (BENNETZEN; MA; DEVOS, 2005). A variação também pode estar relacionada à rearranjos de fragmentos com perdas ou ganhos de sequências, decorrentes dos processos de hibridação e poliploidia (PELLICER et al., 2018; REN et al., 2018), como relatado em espécies de *Anacyclus*, família Asteraceae (VITALES et al., 2020).

A quantidade de DNA (valores 1C e 2C) relatada para o acesso H108 se assemelha à descrição de Ishigaki et al. (2010) e Nitthaisong et al. (2015) para os acessos CIAT 679 e PI 299497 de *U. humidicola*, respectivamente, com mesmo número cromossômico. No entanto,

houve divergência para o valor  $Cx$ , pois esses autores consideraram os seus acessos como hexaploides com número básico  $x=9$ , contrariando relatos de análises meióticas que confirmaram  $x=6$  para a espécie (BOLDRINI et al., 2011a)

## 5.2 Análise dos Cariótipos dos acessos de *Urochloa humidicola*

Os dados morfológicos e o mapeamento dos sítios de rDNA obtidos nesse estudo dão suporte à proposta de organização cariotípica dos acessos de *U. humidicola* em seis grupos de cromossomos, arrançados em subgrupos, de acordo com o nível de ploidia. Essa forma de agrupamento também é sustentada por resultados obtidos em estudos anteriores por Boldrini et al. (2006; 2009a; 2009b; 2010; 2011a; 2011b), Ricci et al. (2011b), Vigna et al. (2016a) e Worthington et al (2019), que indicam o número básico de cromossomos  $x=6$  e ocorrência de alopoliploidia na espécie.

Os cromossomos de todos os acessos avaliados foram classificados como metacêntricos diferindo da análise cariotípica realizada por Bernini e Marin- Morales (2001). Esses autores relataram cariótipos com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos nos acessos H019, H013 e H112 de *U. humidicola*. Akiyama et al. (2010) também identificaram cromossomos portadores dos sítios rDNA 25S como submetacêntricos no acesso CIAT 6369 (EGC- H126). Essas diferenças na classificação podem ser decorrentes de diferenças na origem de formação dos acessos ou ainda, pela condensação dos cromossomos. Outros estudos cariotípicos realizados em *Urochloa*, também demonstraram que o padrão de condensação dos cromossomos e o emprego de diferentes critérios para definição da morfologia cromossômica podem interferir na sua classificação (NANI et al., 2016; MORAES et al., 2019; MENDES et al., dados não publicados).

Uma característica relatada em *Urochloa* é a condensação tardia das regiões terminais e a presença das fibras de cromatina estendidas, sobretudo nos cromossomos portadores do sítio rDNA 35S (NANI et al., 2016; MORAES et al., 2019). Para maioria das metáfases em todos os acessos avaliados em nosso estudo, as regiões dos sítios ribossomais 35S, além de apresentarem heteromorfismo entre cromossomos homólogos, estavam mais descondensadas em comparação com o restante do cromossomo. Essa característica pode influenciar nas medições dos cromossomos e, como consequência, na classificação e organização dos pares/grupos cromossômicos entre os diferentes trabalhos.

Os cariótipos de todos os acessos de *U. humidicola* avaliados foram classificados como simétricos, de acordo com os critérios de Stebbins (1971) e Eroğlu (2015), sendo

portanto semelhante ao descrito para outros acessos/genótipos de *Urochloa*, como *U. ruziziensis* cv. Kennedy diploide,  $2n=2x=18$  (NANI et al., 2016), *U. ruziziensis* tetraploidizada,  $n=4x=36$  (TIMBÓ et al., 2014b; MORAES et al., 2019) e *U. brizantha*,  $2n=4x=36$  (NANI et al., 2016) e em acessos tetraploides de *U. dictyoneura*,  $2n=4x=24$  (MENDES et al., dados não publicados). Um cariótipo assimétrico corresponde a um cariótipo com presença de variações no comprimento total dos cromossomos e cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (STEBBINS 1971).

Ao analisar os dados com base nos valores de assimetria intracromossômica (A1) e intercromossômica (A2) (ZARCO, 1986) é possível detalhar relações de simetria dentre os acessos avaliados. Os cariótipos dos acessos H016 (6x) e H126 (7x) foram mais assimétricos comparado com os demais avaliados, inclusive em relação ao acesso H108 (9x). As análises de Bernini e Marin- Morales (2001), observaram que acessos de *Urochloa* com maior nível de ploidia são considerados mais assimétricos, no entanto, nessas avaliações compararam-se um maior número de acessos de diferentes espécies de *Urochloa*, ou seja, a análise envolveu uma amostra maior e mais diversificada quanto aos níveis de ploidia do em nosso estudo

Os critérios das análises de simetria cariotípica se baseiam em dados de predominância de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e a heterogeneidade do tamanho dos cromossomos no cariótipo (PERRUZI; EROĞLU, 2013). No entanto, as classificações de Stebbins (1971) e Eroğlu (2015) são qualitativas e Zarco (1986) emprega uma análise quantitativa, sendo que esse último permite uma melhor comparação entre indivíduos, espécies e populações, sob forma gráfica principalmente (ZARCO, 1986; PERRUZI; EROĞLU, 2013). Outros estudos comparativos entre espécies de *Urochloa* (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001) e de *Cynodon* (CHIAVEGATTO et al., 2016) mostraram que é possível uma melhor distinção entre as espécies.

Diante disso, em estudos com amostragem similares ao presente trabalho, a utilização dos critérios de Stebbins (1971) ou de Eroğlu (2015) seriam suficientes para a classificação da simetria do cariótipo.

### 5.3 Mapeamento dos sítios de rDNA 5S e 35S de acessos de *U. humidicola*

O número de cromossomos portadores dos sítios rDNA 35S dos acessos de *U. humidicola* avaliados por meio da FISH foi superior à descrição dos satélites observados por Bernini e Marin-Morales (2001) em cariótipos obtidos através de citogenética convencional. A diferença observada para a posição dos satélites nos cariótipos em ambos estudos se deve à referência do número básico de  $x=6$  considerada em nossas análises.

Outro aspecto importante foi a variação no número de sítios de rDNA entre e dentro de plantas e em metáfases de um mesmo meristema para todos os acessos, com exceção do acesso H108. Há relatos dessa variação entre e dentro de plantas para os sítios rDNA 5S e 35S em *Urochloa*, como observado por Nani et al. (2016) em *U. brizantha* cv. Marandu ( $2n=4x=36$ ) e em outras gramíneas como *Lolium perenne* L. (ROCHA et al., 2015; FERREIRA et al., 2018) e *Lolium multiflorum* Lam. (BUSTAMANTE et al., 2014; FERREIRA et al., 2018). Essa variação tem sido associada à mobilidade dos genes ribossômicos, por estarem flanqueados por elementos transponíveis e sujeitos a rearranjos cromossômicos, resultando na sua plasticidade quanto ao número e localização nos cromossomos (RASKINA et al., 2008; LYSÁK; SCHUBERT et al., 2013; BROWN; O'NEILL, 2010; ROA; GUERRA, 2012).

No acesso H31, a co-localização do único sítio intersticial de rDNA 35S com o sítio 5S, observada em metáfases e núcleos interfásicos, é indicativo de arranjo tipo-L. Esse tipo de arranjo consiste na ligação física dos sítios rDNA 35S e 5S, descrito também em plantas do gênero *Artemisia*, família Asteraceae (GARCIA et al., 2009; GARCIA et al., 2010; GARCIA et al., 2012). Em Poaceae, não foram encontradas descrições semelhantes, sendo ambos os sítios observados em locus cromossômicos separados, como para a maioria das plantas (RODIONOV et al., 2017). Para a confirmação desse tipo de arranjo nos cromossomos do acesso H031 é recomendável outras análises, tais como a combinação de dados das técnicas de hibridização de Southern Blot, com a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (RT-PCR), sequenciamento de sequências e do metiloma e a FISH, como realizado em *Artemisia* (GARCIA et al., 2009; GARCIA et al., 2012) ou ainda, a técnica de Fiber-FISH que permite analisar a estrutura e a organização do DNA repetitivo ao longo do comprimento de uma molécula de DNA nas fibras de cromatina (JIANG, 2019).

Em relação aos sítios de rDNA dos acessos H125 e H126, esses apresentaram o mesmo número de sítios de rDNA 35S e 5S e encontravam-se nas mesmas regiões cromossômicas, diferindo quanto à localização dos sítios 5S intersticiais desses no cariótipo.

Os acessos H126 ( $2n=7x=42$ ) e H108 ( $2n=9x=54$ ), divergiram em relação ao número de sítios de rDNA e de sítios em sintenia dos resultados obtidos por Akyama et al. (2010). O número de cromossomos do acesso H126 também foi diferente da descrição desses autores, os quais relataram  $2n=6x=54$ .

#### 5.4 Considerações sobre a constituição genômica de acessos de *U. humidicola*

O estudo realizado por Vigna e colaboradores (2016a) propuseram as designações genômicas A e B para acessos hexaploides de *U. humidicola*. Entretanto, para diferenciar a nomenclatura (genoma B) já empregada por Paula et al. (2017) e Côrrea et al. (2020) para *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis*, nosso estudo propõe o emprego da designação H para se referir aos putativos genomas de *U. humidicola*, sendo H<sup>1</sup> e H<sup>2</sup>, referentes, respectivamente, aos genomas A e B de Vigna et al. (2016a). Cabe ressaltar que a discriminação exata dos cromossomos pertencentes a cada genoma proposto para todos os acessos avaliados, poderá ser feita mediante a análise com um número maior de marcadores citogenéticos.

Em nosso estudo, a organização dos cariótipos dos acessos H016 e H031 em seis grupos de seis cromossomos, arranjados em dois subgrupos de 2 e 4 cromossomos homólogos, se baseia nos resultados da meiose desses acessos e seus híbridos obtidos nos trabalhos de Ricci et al. (2011b) e Vigna et al. (2016a) e no estudo de mapeamento de ligação genética (VIGNA et al., 2016a). Esses últimos autores, consideraram os acessos hexaploides *U. humidicola* como aloploiploides com duas possíveis origens. A proposta de aloploiploidia está relacionada a observação da homeologia entre os genomas evidenciadas pela formação de bivalentes a hexavalentes. Essas informações mostram que os genomas das espécies que deram origem aos acessos hexaploides eram estreitamente relacionados, mas parcialmente diferenciados (RENNY; WENDEL, 2014). Em relação à origem, a primeira hipótese proposta por Vigna et al. (2016a) é que um genitor feminino diploide sexual ( $2n=2x=12$ - genoma A) cruzou com um acesso tetraploide apomítico ( $2n=4x=24$ - genoma B). Esse cruzamento deu origem ao triploide com  $2n=3x=18$ . Esse triploide sofreu duplicação natural e deu origem ao hexaploide (genomas AABB<sup>3</sup>B) apomítico de *U. humidicola*. A segunda hipótese é de que esse triploide seja proveniente de um cruzamento de duas plantas diploides sexuais, no qual uma delas doou gametas não reduzidos.

As descrições de Vigna et al. (2016a) e Boldrini et al. (2011b) e as evidências dos dados cariotípicos obtidos nesse estudo, para os acessos H016 e H031 sugerem auto-

alopoliploidia para os acessos hexaploide de *U. humidicola* (6x) e composição genômica  $H^1H^1H^2H^2H^2H^2$ . Tomando por base o arranjo cariotípico em combinação das proposições de Vigna et al (2016) é provável que ambos acessos apresentem a mesma constituição genômica, pois grau de relacionamento genético entre eles já foi relatado em trabalhos anteriores (VIGNA et al., 2016 a, 2016b; JUNGSMANN et al., 2010). Para confirmar isso, será necessário a utilização de técnicas citogenéticas, tais como a GISH, que discriminem melhor essas diferenças e confirmem o genoma proposto.

Quanto aos acessos heptaploides, a proposta do cariótipo organizado em seis grupos com sete cromossomos cada, (arranjados em subgrupos de 4 e 2 homólogos mais 1 cromossomo) foi baseada nos resultados da meiose obtidos para o acesso H030, que também apresenta  $2n=7x=42$  (BOLDRINI et al., 2009a). Esses autores observaram que seis univalentes permaneciam atrasados na anáfase I e 18 cromossomos segregavam para cada pólo nas telófases analisadas. Os cromossomos retardatários que não atingiram os pólos nas telófases I ou II a tempo de serem incluídos nos núcleos foram eliminados como micronúcleos. Com isso, Boldrini et al. (2009a) propuseram que o acesso heptaploide se originou do cruzamento de um genitor masculino apomítico hexaploide,  $2n=6x=36$ , com produção de gametas não reduzidos com um genitor feminino sexual, diploide,  $2n=2x=12$ . Portanto, os dados obtidos nesse estudo para os acessos H125 e H126 associados com as informações de Boldrini et al. (2009a), também sugerem auto-alopoliploidia e uma suposta composição que envolve a participação de um terceiro genoma ( $H^3$ ), sem homologia com os demais ( $H^1$  e  $H^2$ ), o qual estaria representado pelos cromossomos que se comportam como univalentes na meiose. Nessas circunstâncias e seguindo a proposta de Boldrini et al (2009a) sobre envolvimento do hexaploide ( $H^1H^1H^2H^2H^2H^2$ ) como um dos parentais, a composição genômica dos acessos H125 e H126 poderia ser  $H^1H^1H^2H^2H^2H^2H^3$ . Portanto, análises meióticas e a GISH desses acessos, de outros com o mesmo número cromossômico e putativos parentais serão de grande importância para a confirmação da origem auto-alopoliploide para os heptaploides de *U. humidicola*.

Além dos dados de morfometria cromossômica e mapeamento dos sítios de rDNA, a proposta do cariótipo do acesso H108 ( $2n=9x=54$ ) se baseou nos resultados das análises meióticas com outro acesso (H038) nonaploide de *U. humidicola* (BOLDRINI et al., 2009b). No estudo do acesso H038, os autores relataram associações cromossômicas de trivalentes, nonavalentes e seis univalentes e segregação de 24 cromossomos para cada polo na anáfase I. Por meio disso, Boldrini et al. (2009b) sugeriram que o acesso nonaploide provém de um

cruzamento de um genitor masculino apomítico octaploide ( $2n=8x=48$ ) que contribuiu com gametas não reduzidos e um genitor sexual diploide ( $2n=2x=12$ ). Levando em conta essas configurações descritas por Boldrini et al. (2009b), a combinação envolveria um auto-alooctaploide, supostamente  $H^1H^1H^1H^1H^2H^2H^2H^2$  (gametas  $2n$ ) x  $H^3H^3$  (gameta  $n$ ) resultando em um  $2n=9x=54$  (auto-alononaploide  $H^1H^1H^1H^1H^2H^2H^2H^2H^3$ ). O genoma  $H^3$  seria representado pelos seis cromossomos que se comportam como univalentes na meiose, da mesma forma que se observa nos heptaploides descritos acima. Portanto, esse genoma não apresenta homologia ou homeologia com os genomas  $H^1$  e  $H^2$ . Os cromossomos que segregam durante a anáfase I corresponderiam aos genomas  $H^1$  e  $H^2$ , assim esses segregam com 24 cromossomos para cada polo. A análise da meiose e estudos usando GISH no acesso H108 e em outros acessos com mesmo número cromossômico, serão imprescindíveis para a confirmação da organização auto-alopoliploide do cariótipo e composição genômica.

## 6 CONCLUSÕES

Os cariótipos dos acessos de *U. humidicola* são simétricos e constituídos por cromossomos metacêntricos.

O acesso sexual H031 é um aneuploide, com  $2n=6x=36+1$ .

Os acessos com mesmo nível de ploidia apresentaram variação quanto a quantidade e/ou posição dos sítios de rDNA 5S e 35S no cariótipo.

Os acessos apresentam variações no número de sítios de DNA ribossomal entre e dentro de plantas, com exceção do acesso H108.

Os dados cariotípicos e o mapeamento dos sítios de rDNA 5S e 35S corroboram com a proposta de auto-alopoliploidia e número básico  $x=6$  em *U. humidicola*.

**REFERÊNCIAS**

- ADAMOWSKI, E. D. V. et al. Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Genet Mol Res**, v. 6, n. 616, p. 21, 2007.
- 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, 2010.
- ALIX, K. et al. Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. **Annals of botany**, v. 120, n. 2, p. 183-194, 2017.
- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. DE A.; XAVIER, D. F. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no País. **Embrapa gado de Leite**, v.4, n. 22, p. 3–6, 2002.
- ASKER, S. Progress in apomixis research. **Hereditas**. v.91, p. 231-240, 1979.
- 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, 1987.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, Ilia J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 467-590, 2011.
- 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**, v. 104, p. 157-172, 2001.



- BOLDRINI, K. R. et al. Meiotic behavior as a selection tool in the breeding of *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Euphytica**, v. 182, n. 3, p. 317-324, 2011b.
- BOLDRINI, K. R. et al. Origin of a polyploid accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 888-895, 2009a.
- BOLDRINI, K. R.; ADAMOWSKI, E. V.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B.D. Meiotic behavior in nonaploid accessions of *Brachiaria humidicola* (Poaceae) and implications for breeding. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n.1, p. 169-176, 2011a.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; DO VALLE, C. B. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, v. 85, n. 3, p. 225-228, 2006.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; DO VALLE, C. B. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses  $x=6$  for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1444, p. 50, 2009b.
- BROWN, J.D.; O'NEILL, R. J. Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 11, p. 291-316, 2010.
- BUSTAMANTE, F. O. et al. Distribution of rDNA in diploid and polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and fragile sites in 45S rDNA regions. **Crop Science**, v. 54, n. 2, p. 617-625, 2014.
- CALISTO, V. et al. Desynapsis and precocious cytokinesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) compromise meiotic division. **Journal of Genetics**, v. 87, n. 1, p. 27, 2008.

CATASÚS- GUERRA, L. C. de. *Poaceis cubensibus notulae*, III (in floram novam cubensem stvdia intendentia). **Fontqueria**, v. 55, n. 4, p. 15-17, 2001.

CHESTER, M. et al. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). **Genes**, v. 1, n. 2, p. 166-192, 2010.

CHIAVEGATTO, R. B. et al. Karyotype asymmetry in *Cynodon* Rich.(Poaceae) accessions. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S.s A. Genera *Graminum*: Grasses of the World. **Kew Bulletin**, v. 13, p. 256–285, 1986.

CONNER, J. A.; OZIAS-AKINS, P. Apomixis: engineering the ability to harness hybrid vigor in crop plants. In: **Plant Germline Development**. Humana Press, New York, NY, p. 17-34, 2017.

CORRÊA, C. T.; BONETTI, N. G.; BARRIOS, S. C.; VALLE, C. B. D.; TORRES, G. A.; TECHIO, V. H. GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa* P. Beauv. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 2, 887-896, 2020.

DA ROCHA, M.J.; CHIAVEGATTO, R.B; DAMASCENO, A.G.; ROCHA. LC.; SOBRINHO, F.S.;TECHIO, V.H. Comparative meiosis and cytogenomic analysis in euploid and aneuploid hybrids of *Urochloa* P. Beauv. **Chromosome Research**, v.27 n.4, p. 333-344, 2019.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. George Allen & Unwin, London, p.519, 1956.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. **Applied Genetics**, v. 3, n. 38, p. 285–302, 1997.

DUJARDIN, M. Additional chromosome numbers and meiotic behaviour in tropical African grasses from western Zaire. **Canadian Journal of Botany**. v.57, p. 2138- 2152, 1979.

EROĞLU, H. E. Which chromosomes are subtelocentric or acrocentric? A new karyotype symmetry/asymmetry index. **Caryologia**, v. 68, n. 3, p. 239-245, 2015.

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

FERREIRA, M. T. M. et al. Relationship between epigenetic marks and the behavior of 45S rDNA sites in chromosomes and interphase nuclei of *Lolium–Festuca* complex. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 6, p. 1663-1679, 2018.

FIGUEIREDO, U. J. D.; NUNES, J. A. R.; VALLE, C. B. D. Estimation of genetic parameters and selection of *Brachiaria humidicola* progenies using a selection index. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 237-244, 2012.

FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. Analysis of Chromosome. **Plant Chromosomes: Laboratory Methods**, p. 241, 1996.

FUKUI, K.; OHMIDO, N.; KHUSH, G. S. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, n. 8, p. 893-899, 1994.

GALLO, P. H. et al. 2n gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). **Euphytica**, v. 154, n. 1-2, p. 255-260, 2007.

GARCIA, S. et al. Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, pag. 176, 2010.

GARCIA, S.; KHAITOVÁ, L. C.; KOVAŘÍK, A. Expression of 5 S rRNA genes linked to 35 S rDNA in plants, their epigenetic modification and regulatory element divergence. **BMC plant biology**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2012.

GREILHUBER J. et al. The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to Describe Nuclear DNA Contents, **Annals of Botany**, v. 95, n.1, p. 255–260, 2005.

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

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

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, Trude. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18-33, 2011.

IBGE. **Dados parciais do censo Agropecuário 2017**. Ministério do Planejamento, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017.

Disponível:<[https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/index.html](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html)>Acesso: 04/10/2020.

ISHIGAKI, G. et al. Estimation of genome size in *Brachiaria* species. **Grassland Science**, v. 56, n. 4, p. 240–242, 2010.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiple-shoot clumps and seedlings. **Grassland science**, v. 55, n. 3, p. 164-170, 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, 2014.
- JENKINS, G.; HASTEROK, R. BAC 'landing' on chromosomes of *Brachypodium distachyon* for comparative genome alignment. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 88, 2007.
- JIANG, J. Fluorescence *in situ* hybridization in plants: recent developments and future applications. **Chromosome Research**, v. 27, n. 3, p. 153-165, 2019.
- JUNGMANN, L. et al. Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. **Genome**, v. 53, n. 9, p. 698-709, 2010.
- KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A.C.G de. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006.
- 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.
- LEITCH, I. J. et al. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 207–217, 2005
- LEÓN-MARTÍNEZ, G.; VIELLE-CALZADA, J. Apomixis in flowering plants: developmental and evolutionary considerations. In: **Current Topics in Developmental Biology**. Academic Press, p. 565-604, 2019.
- LEVAN, A. K.; FREDGA, K.; SANDBERG A. A. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

LYSÁK, M. A.; SCHUBERT, I. Mechanisms of chromosome rearrangements. In: **Plant Genome Diversity Volume 2**. Springer, Vienna, 2013. p. 137-147.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. **Reunião anual da sociedade brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 2005, p. 56-84, 2005.

MACHADO, L. A. Z. et al. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2010.

Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/862836>>. Acesso: 16 de outubro de 2018.

MENDES, L. M. **Análise cariotípica em acessos diploides de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* e poliploides de *Urochloa dictyoneura* (POACEAE)**. 2020. 40 p. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Chromosome number and meiotic behavior in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetics**, v.85, p. 83–88, 2006.

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

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.; ZULOAGA, F.O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introduzidas de los gêneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae:Panicoideae:Paniceae).

**Darwiniana**, v.31, n.1-4, p. 43-109. 1992.

MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O. Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) para México y América Central. **Darwiniana**, v.32, n.1-4, p. 59-75, 1993.

NANI, T. F. et al. Location of low copy genes in chromosomes of *Brachiaria* spp. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 2, p. 109-118, 2018.

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, 2016.

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, 2010.

NITTHAISONG, P. et al. Chromosome Number, Genomic Variation, and Molecular Markers to Assess Genetic Diversity of *Brachiaria* Species. **Crop Science**, v. 56, n. 1, p. 312-321, 2016.

PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, C.A.D.M. As contribuições de *Brachiaria* e *Panicum* para a pecuária leiteira. In: **Pecuária de leite no Brasil: Cenário e avanços tecnológicos**. E: Duarte Vilela; Reinaldo de Paula Ferreira; Elizabeth Nogueira Fernandes; Fabrício Vieira Juntolli, EMBRAPA, Brasília, 1ª ed. p. 435, 2016.

PAULA, C. M. P. DE; 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, 2017.

- PELLICER, J., HIDALGO, O., DODSWORTH, S., & LEITCH, I. J. (2018). Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9(2), 88.
- PELLICER, J.; LEITCH, Ilia J. The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. *New Phytologist*, v. 226, n. 2, p. 301-305, 2020.
- PENTEADO, M. I.D. O. et al. Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. **Embrapa Gado de Corte-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2000.
- PEREIRA, J. F. et al. Research priorities for next-generation breeding of tropical forages in Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 314-319, 2018.
- PERUZZI, L.; EROĞLU, H. E. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? **Comparative cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 1, 2013.
- RAO, I. M.; KERRIDGE, P. C.; MACEDO, M. C. M. Nutritional requirements of *Brachiaria* and adaptation to acid soils. In. *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement* ed. John W. Miles, Brigitte L. Maass, Cacilda Borges Valle. **CIAT Publication**. p. 288, 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, 2008.
- REN, L. et al. A mechanism for genome size reduction following genomic rearrangements. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 454, 2018.
- RENNY, B. S.; WENDEL, J. F. Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants. **American journal of botany**, v. 101, n. 10, p. 1711-1725, 2014.



RENVOIZE, S.A., W.D. CLAYTON, and C.H.S. KABUYE. **Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb.** In: J.W. Miles et al., editors, *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*. CIAT, Colombia. p. 1–15, 1996.

RESENDE, R. M.S.; VALLE C.B. do; JANK L. (Eds.) **Melhoramento de forrageiras tropicais.** 1ª ed. Campo Grande, Embrapa. Apresentação. 2008.

RICCI, G. C. L. et al. Chromosome numbers and meiotic analysis in the pre-breeding of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). **Journal of genetics**, v. 90, n. 2, p. 289-294, 2011b.

RICCI, G. L.; SOUZA-KANESHIMA, A. M. D. ; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. D. Meiotic behavior in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) hybrids. **Euphytica**, v.182, n. 3, 355, 2011a.

RICHARDS, A. J. Apomixis in flowering plants: an overview. **Philosophical Transactions. Royal Society**, v. 358, p. 1085-1093, 2003.

RISSO-PASCOTTO C, PAGLIARINI MS, VALLE CB, MENDES-BONATO AB  
Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breed**, v. 122, p.136–140, 2003.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. D. Microsporogenesis in *Brachiaria bovonei* (Chiov.) Robyns and *B. subulifolia* (Mez) Clayton (Poaceae). **Scientia Agricola**, v. 66, n.5, 691-696, 2009.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. 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, 2006a.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 4, p. 837–845. Campo Grande, 2006b.

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. 1-13, 2012.

ROCHA, L. C. et al. 45S rDNA sites in meiosis of *Lolium multiflorum* Lam.: variability, non-homologous associations and lack of fragility. **Protoplasma**, v. 256, n. 1, p. 227-235, 2019.

ROCHA, L. C. et al. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, v. 252, n. 2, p. 451-460, 2015.

RODIONOV, A. V. et al. ITS1–5.8 S rDNA–ITS2 sequence in 35S rRNA genes as marker for reconstruction of phylogeny of grasses (Poaceae family). **Biology Bulletin Reviews**, v. 7, n. 2, p. 85-102, 2017.

RODRIGUES, R. C et al. Agronomic, morphogenic and structural characteristics of tropical forage grasses in northeast Brazil. **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, v. 2, n. 2, p. 214, 2014.

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, 2010.

SANTOS, F. C. et al. Chromosomal distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 571-582, 2015.

SCHIFINO-WITTMANN, M. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas.

**Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 897-902, 2001.

SCHUBERT, I.; VU, G.T.H. Genome stability and evolution: attempting a holistic view.

**Trends in plant science**, v. 21, n. 9, p. 749-757, 2016.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SHARMA, A.K.; KOUR, S. Chromosome number reports LXIX. **Taxon**, v. 6, n. 5, p. 861-872, 1980.

SHARMA, M.L.; SHARMA, A. K. Cytological Studies in the North Indian Grasses.

**Cytologia**, v.44, p.861-872, 1979.

SILJAK-YAKOVLEV, S. et al. Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: A case study in *Reichardia* genus. *PloS one*, v. 12, n. 8, p. e0182318, 2017.

SOUZA SOBRINHO, F. S.; BENITES, F. R. G.; MOREIRA, G. R.; LINHARES, L. L.;

CUNHA, G. M. Melhoramento genético de *Brachiaria ruziziensis*: histórico e estratégias. In:

Martins, C. B.; Deminicis, B. B.; Moreira, G. R.; Mendonca, P. P. (Org.). **Tópicos especiais**

**em ciência animal IV**, v. 1, p. 309-329, 2016.

STEBBINS, G. L. et al. Chromosomal evolution in higher plants. **Chromosomal evolution in higher plants**, 1971.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 14, July 2017. Disponível em:

<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 04 outubro de 2020.

- SWENNE, A.; LOUANT, B. P.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomie Tropicale**, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.
- TIMBÓ, A. L. D. O. et al. Nuclear DNA content and chromosome number in *Brachiaria* spp. genotypes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 62-67, 2014a.
- TIMBÓ, A. L. D. Oliveira et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 43, n. 3, p. 127–131, 2014b.
- 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, 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, 2017.
- VALLE, C. B. D.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis News Let**, v. 3, p. 11-13, 1991.
- VALLE, C. B. do. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. **Embrapa Gado de Corte-Documents (INFOTECA-E)**, 1990.
- VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v.56, n.4, p.460-472, 2009.
- VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M.S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement**. Ed: Singh, R.J., CRC Press, p. 103-151, 2009.

- VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: ***Brachiaria: biology, agronomy, and improvement***. Ed: Miles, J.W.; Maass B.L.; Valle, C.B., CIAT/EMBRAPA, Cali, Colômbia, p. 147-163, 1996.
- VALLE, C.B.D.; GLIENKE, C.; LEGUIZAMON, G. O. C. Breeding of apomictic *Brachiaria* through interspecific hybridization. **Proc. XVII Int. Grassl. Congr., New Zealand: NZIAS**, v. 1, p. 427-428, 1993.
- VALLE, C.B.D.; MACEDO, M. D.M.; EUCLIDES, V.P.B.; JANK, L. RESENDE, R.M.S. Gênero *Brachiaria*. In. **Plantas forrageiras**. Ed. Dilermando Miranda da Fonseca, Janaina Azevedo Martuscello. UFV. Viçosa, p. 537, 2010.
- VELDKAMP, J. F. et al. *Brachiaria, Urochloa* (Gramineae-Panicaceae) in Malesia. **Blumea**, v. 41, n. 2, p. 413-437, 1996.
- VICIENT, C. M.; CASACUBERTA, J. M. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. **Annals of Botany**, v. 120, n. 2, p. 195-207, 2017.. *Annals of Botany* , v. 120, n. 2, pág. 195-207, 2017.
- VIGNA, B. B. Z. et al. Evidence of allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological analysis and genetic linkage mapping. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. 1-23 , 2016a.
- VIGNA, B. B. Z. et al. Leaf transcriptome of two highly divergent genotypes of *Urochloa humidicola* (Poaceae), a tropical polyploid forage grass adapted to acidic soils and temporary flooding areas. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 910, 2016b.
- VITALES, D., et al. Genome size variation at constant chromosome number is not correlated with repetitive DNA dynamism in *Anacyclus* (Asteraceae). **Annals of Botany**, v.125, n.4, p. 611-623, 2020.

WEBSTER, R. D. The Australian Paniceae (Poaceae). **J. Cramer**, Berlin, Stuttgart. v.15, p.228, 1987.

WORTHINGTON M. et al. A parthenogenesis gene candidate and evidence for segmental allopolyploidy in apomictic *Brachiaria decumbens*. **Genetics**. V. 203, p. 1117–32, 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. 41, 2019.

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

ZULOAGA, F. O. et al. Catalogue of New World grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae. **Catalogue of new world grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae, and Danthonioideae**, 2003.

**APÊNDICE A- Tabelas com os dados Morfométricos dos acessos de *U. humidicola***

Tabela A1- Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H016). Comprimento total dos cromossomos (CTi), razão entre braços (RB), índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	CTi (µm)	RB (L/S)	IC	Morfologia
1	3,08	1,43	41,07	m
1' <sup>a</sup>	2,99	1,40	41,58	m
2	2,93	1,42	41,24	m
2'	2,85	1,46	40,72	m
3	2,77	1,33	41,57	m
3' <sup>bd</sup>	2,68	1,46	40,69	m
4	2,71	1,41	41,88	m
4'	2,64	1,34	42,83	m
5	2,57	1,38	41,93	m
5'	2,51	1,25	44,43	m
6 <sup>abcd</sup>	2,17	1,22	42,93	m
6'	2,35	1,33	45,01	m

<sup>a</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S e 35S sintênicos; <sup>b</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S; <sup>c</sup> Cromossomos com sítio de rDNA 35S em hemizigose; <sup>d</sup> Grupo cromossômico com diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos.

Fonte: Autor (2020).

Tabela A2- Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H031), Comprimento total dos cromossomos (CTi) razão entre braços (RB), índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	CTi (µm)	RB (L/S)	IC	Morfologia
1	2,64	1,31	43,34	m
1' <sup>a</sup>	2,64	1,17	46,15	m
2	2,52	1,19	45,59	m
2'	2,48	1,24	44,63	m
3 <sup>ad</sup>	2,39	1,17	46,05	m
3'	2,43	1,24	44,59	m
4 <sup>d</sup>	2,35	1,22	44,99	m
4'	2,38	1,31	43,32	m
5 <sup>bcd</sup>	2,30	1,14	46,77	m
5' <sup>b</sup>	2,31	8,23	45,09	m
6 <sup>d</sup>	2,18	1,27	44,09	m
6'	2,29	1,27	44,06	m

<sup>a</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S e 35S sintênicos; <sup>b</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S; <sup>c</sup> Grupo cromossômico com trissomia; <sup>d</sup> Grupo cromossômico com diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos.

Fonte: Autor (2020).

Tabela A3- Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola*

(acesso H125), Comprimento total dos cromossomos (CTi) razão entre braços (RB), índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	CTi (μm)	RB (L/S)	IC	Morfologia
1 <sup>a</sup>	3,08	1,24	44,67	m
1'	3,04	1,33	42,90	m
1''	2,98	1,28	43,78	m
2	2,93	1,28	43,84	m
2'	2,88	1,39	41,89	m
2''	2,84	1,31	43,23	m
3 <sup>b</sup>	2,79	1,24	44,62	m
3'	2,75	1,48	40,32	m
3''	2,74	1,39	41,79	m
4	2,70	1,30	43,39	m
4'	2,69	1,22	44,96	m
4'' <sup>c</sup>	2,65	1,19	45,50	m
5	2,68	1,31	43,21	m
5'	2,65	1,27	44,09	m
5''	2,63	1,09	47,77	m
6	2,49	1,29	43,81	m
6' <sup>a</sup>	2,32	1,23	44,88	m
6'' <sup>ac</sup>	2,14	1,43	41,11	m

<sup>a</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S e 35S sintênicos; <sup>b</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S; <sup>c</sup> Grupo cromossômico com diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos.

Fonte: Autor (2020).



Tabela A4- Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H126), comprimento total dos cromossomos (CTi), razão entre braços (RB), índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	CTi (µm)	RB (L/S)	IC	Morfologia
1 <sup>ac</sup>	2,72	1,33	43,08	m
1'	2,79	1,61	38,42	m
1''	2,76	1,50	39,99	m
2	2,67	1,23	44,82	m
2'	2,65	1,40	41,71	m
2''	2,64	1,35	42,60	m
3	2,59	1,41	41,45	m
3'	2,49	1,44	40,94	m
3''	2,49	1,23	44,76	m
4	2,45	1,37	42,26	m
4'	2,36	1,37	42,28	m
4''	2,32	1,23	44,81	m
5 <sup>bc</sup>	2,34	1,43	41,14	m
5'	2,31	1,31	43,39	m
5''	2,31	1,59	38,60	m
6	2,26	1,26	44,34	m
6' <sup>a</sup>	1,94	1,20	45,43	m
6'' <sup>a</sup>	1,83	1,20	45,44	m

<sup>a</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S e 35S sintênicos; <sup>b</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S; <sup>c</sup> Grupo cromossômico com diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos.

Fonte: Autor (2020).

Tabela A5- Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H108), comprimento total do cromossomos (CTi), razão entre braços (RB), índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	CTi ( $\mu\text{m}$ )	RB (L/S)	IC	Morfologia
1 <sup>ad</sup>	2,89	1,21	45,26	m
1'	2,71	1,26	44,25	m
1''	2,64	1,25	44,38	m
2 <sup>be</sup>	2,64	1,23	44,82	m
2'	2,56	1,25	44,35	m
2''	2,52	1,18	45,86	m
3 <sup>a</sup>	2,46	1,15	46,52	m
3'	2,42	1,17	45,50	m
3''	2,36	1,17	46,07	m
4	2,34	1,18	45,78	m
4'	2,25	1,27	43,97	m
4'' <sup>ae</sup>	2,33	1,28	43,93	m
5	2,18	1,29	43,60	m
5' <sup>abd</sup>	2,12	1,26	44,32	m
5''	2,12	1,30	43,40	m
6	2,07	1,26	44,32	m
6' <sup>cg</sup>	1,80	1,26	44,18	m
6''	2,03	1,33	42,91	m

<sup>a</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S e 35S sintênicos; <sup>b</sup> Cromossomos portadores dos sítios de rDNA 5S; <sup>c</sup> Cromossomos portadores de rDNA 35S; <sup>d</sup> Cromossomos em hemizigose; <sup>e</sup> Grupo cromossômico com diferenças no comprimento total entre os cromossomos homólogos.

Fonte: Autor (2020).