



**CAIO TÚLIO RODRIGUES CORRÊA**

**CONSTITUIÇÃO GENÔMICA E RELAÇÕES  
ENTRE ESPÉCIES DE *Urochloa* P. Beauv.**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**CAIO TÚLIO RODRIGUES CORRÊA**

**CONSTITUIÇÃO GENÔMICA E RELAÇÕES  
ENTRE ESPÉCIES DE *Urochloa* P. Beauv.**

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

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

**LAVRAS – MG  
2019**

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

Corrêa, Caio Tulio Rodrigues.

Constituição genômica e relações entre espécies de *Urochloa*  
P. Beauv. / Caio Tulio Rodrigues Corrêa. - 2019.  
51 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. GISH. 2. Composição genômica. 3. Brachiaria. I. Techio,  
Vânia Helena. II. Título.

**CAIO TÚLIO RODRIGUES CORRÊA**

**CONSTITUIÇÃO GENÔMICA E RELAÇÕES  
ENTRE ESPÉCIES DE *Urochloa* P. Beauv.  
GENOMIC CONSTITUTION AND RELATIONSHIPS  
IN *Urochloa* (P. Beauv.) SPECIES**

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

APROVADA em 18 de fevereiro de 2019.

Dr<sup>a</sup> Vânia Helena Techio, UFLA

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

Dr<sup>a</sup> Cacilda Borges do Valle, EMBRAPA

Dr. Sanzio Carvalho Lima Barrios, EMBRAPA



Profª Drª Vânia Helena Techio

Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2019**

*À toda população brasileira  
e a todos os pesquisadores que acreditam na Ciência como uma ferramenta de transformação  
social em direção a um mundo mais justo e igual para todos,*

OFEREÇO

*À minha mãe, Maria Emília,*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo financiamento do projeto e concessão das bolsas de estudo. À Embrapa Gado de Corte, pela parceria e disponibilização das plantas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade e estrutura concedida para a realização desse trabalho.

À professora Dra. Vânia Helena Techio, agradeço pelo acolhimento, dedicação, disponibilidade e atenção. Obrigado por todo o aprendizado e orientação, que sem dúvida foram essenciais para a conclusão dessa etapa.

À professora Giovana Augusta Torres, agradeço aos sete anos de orientação, incentivos, conselhos e exemplos pessoais e profissionais.

À pós-doutoranda Laiane Corsini Rocha pela grande ajuda e contribuição, sendo sempre além de uma ótima profissional, uma amiga querida.

À todas as amigas e amigos do laboratório de Citogenética pela convivência e companheirismo. Em especial à Nathalia, que contribuiu enormemente na execução do trabalho.

Aos meus amigos e amigas de Lavras, em especial Luiza e Patrícia, que caminham ao meu lado desde o primeiro ano de graduação, compartilhando todas as realizações e dificuldades.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram. Em especial à minha mãe, Maria Emília, pela criação e amor incondicional, sendo ainda a pessoa que mais admiro e me orgulho. Obrigado também à minha irmã Karen pelo apoio e amizade.

*“Se a educação sozinha não transforma a sociedade,  
sem ela tampouco a sociedade muda.”*

*(Paulo Freire)*

## RESUMO

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) inclui espécies de grande importância econômica, sendo utilizadas como forrageiras. As espécies alotetraploides *U. brizantha* (cv. Marandu) e *U. decumbens* (cv. Basilisk) e a diploide *U. ruziziensis* tiveram seus genomas definidos como  $BBB^1B^1$ ,  $B^1B^1B^2B^2$  e  $B^2B^2$ , respectivamente. Evidências apontam para *U. ruziziensis* como doadora ancestral do genoma  $B^2$  na alotetraploidia de *U. decumbens*, mas ainda existem dúvidas sobre a origem dos genomas  $B$  e  $B^1$ . Existem acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*, que são potenciais ancestrais dos acessos tetraploides. O objetivo do presente estudo foi determinar a constituição dos genomas e as relações de homologia/homeologia cromossômica entre os acessos de *U. brizantha* (2x e 4x), *U. decumbens* (2x e 4x) e *U. ruziziensis* (2x) por meio da técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH). Adicionalmente foram confirmados os números cromossômicos e determinados os tamanhos dos genomas das espécies de diploides. Os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* apresentaram  $2n = 2x = 18$  cromossomos e conteúdo de DNA de 1,79 e 1,44 pg, respectivamente. As análises da GISH revelaram alta homologia entre os genomas de *U. brizantha* e *U. decumbens* diploides, o que sugere baixo tempo de divergência entre elas. A GISH utilizando a sonda genômica dos acessos diploides nos cromossomos dos acessos tetraploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* produziu padrões de marcação similares, revelando o genoma  $B^1$  presente em ambas as tetraploides. Com base nos resultados, foi proposta a composição genômica para os acessos diploides de *U. brizantha* ( $B^1B^1$ ) e *U. decumbens* ( $B^1B^1$ ) e ambas foram apontadas como doadoras do genoma  $B^1$  (ou  $B^1$ ) no processo de aloploidização dos acessos tetraploides.

Palavras-chave: GISH. *Brachiaria*. Composição genômica. Citogenética.

## ABSTRACT

The genus *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) comprises species of great economic relevance as forages. The genomic constitution for the allotetraploid species *U. brizantha* (cv. Marandu) and *U. decumbens* (cv. Basilisk) and the diploid *U. ruziziensis* was previously proposed as  $BBB^1B^1$ ,  $B^1B^1B^2B^2$  and  $B^2B^2$ , respectively. Evidence indicates *U. ruziziensis* as the ancestral donor of genome  $B^2$  in *U. decumbens* allotetraploidy, but the origin of the genomes  $B$  and  $B^1$  is still unknown. There are diploid accessions of *U. brizantha* e *U. decumbens* that may be potential ancestors of the tetraploids. The aim of this study was to determine the genomic constitution and relationships between accessions of *U. brizantha* ( $2x$  and  $4x$ ), *U. decumbens* ( $2x$  and  $4x$ ) and *U. ruziziensis* ( $2x$ ) via genomic *in situ* hybridization (GISH). Additionally, chromosome number and genome size were verified for the diploid accessions. The diploids *U. brizantha* and *U. decumbens* presented  $2n = 2x = 18$  chromosomes and DNA content of 1.79 and 1.44 pg, respectively. The GISH analysis revealed high homology between the diploids *U. brizantha* and *U. decumbens*, which suggests relatively low divergence time. The GISH using genomic probes from the diploid accessions on the tetraploid accessions chromosomes presented similar patterns, highlighting the genome  $B^1$  present in both of the tetraploids. Based on GISH results, the genomic constitution was proposed for the diploid accessions of *U. brizantha* ( $B^1B^1$ ) and *U. decumbens* ( $B^1B^1$ ) and both were pointed as donors of genome  $B^1$  (or  $B^{1'}$ ), present in the allotetraploid accessions.

Keywords: GISH. *Brachiaria*. Genomic composition. Cytogenetics.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 Importância econômica, aspectos botânicos e taxonômicos de <i>Urochloa</i> .....	13
2.2 Caracterização citogenética de <i>Urochloa</i> .....	18
2.3 Citogenética molecular e relação genômica de <i>Urochloa</i> .....	20
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 Local .....	23
3.2 Material Vegetal .....	23
3.3 Preparo de Lâminas .....	24
3.4 Hibridização <i>in situ</i> genômica - GISH .....	24
3.5 Citometria de fluxo .....	26
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Número cromossômico e tamanho do genoma .....	27
4.2 Análise da hibridização <i>in situ</i> genômica (GISH) .....	28
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
5.1 Número cromossômico e tamanho do genoma .....	33
5.2 Relação genômica entre espécies diploides de <i>Urochloa</i> .....	34
5.3 Constituição e relação genômica entre espécies diploides e tetraploides.....	38

5.4 Análise integrada das relações genômicas.....	40
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) é um gênero pertencente à família Poaceae, que reúne cerca de 135 espécies distribuídas em países tropicais e subtropicais, com maior concentração no continente africano, que é considerado seu centro de origem (CLAYTON *et al.*, 2016).

O gênero é amplamente cultivado como forrageira no Brasil e apresenta importância econômica na criação de bovinos para corte e produção de leite. Devido a sua ampla distribuição e boa adaptação ao clima e solo brasileiros, quatro espécies de *Urochloa* têm sido empregadas em programas de melhoramento que visam a avaliação e seleção de genótipos que reúnam características desejáveis e a realização de cruzamentos inter e intraespecíficos (VALLE; RESENDE; JANK, 2009).

A maior parte das espécies do gênero é apomítica e poliploide, havendo poucos acessos diploides e sexuais. Dentre as espécies com maior relevância agrônômica estão *U. brizantha* (Hoschst. ex A. Rich) R.D. Webster, *U. decumbens* (Stapf) R.D. Webster e *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga que são predominantemente apomíticas e poliploides e *U. ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga, que é diploide e sexual. Algumas espécies já foram utilizadas em cruzamentos com *U. ruziziensis* (tetraploidizada artificialmente) e deram origem aos híbridos Mulato I (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandu) e Mulato II [(*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) x *U. brizantha*] (SOUZA SOBRINHO, 2009).

Estudos de divergência genética baseados em caracteres morfológicos (ASSIS *et al.*, 2002; RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996) e moleculares (AMBIEL *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2011; PESSOA-FILHO; MARTINS; FERREIRA, 2017; TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005; TRIVIÑO *et al.*, 2017) incluíram *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* em um mesmo grupo taxonômico em um complexo agâmico. Entretanto, esses resultados foram obtidos somente com análises em espécies poliploides,

com exceção de um acesso diploide de *U. decumbens* no trabalho de Pessoa-Filho et al. (2017) e de *U. ruziziensis*, que é exclusivamente diploide.

De modo semelhante, os estudos citogenéticos também priorizam as avaliações em poliploides, tendo em vista a sua predominância na composição do gênero (principalmente as tetraploides) e nas áreas de cultivo (VALLE; PAGLIARINI, 2009). A partir dessas avaliações foi determinado o número básico cromossômico de  $x = 6, 7, 8, 9$ , sendo  $x = 9$  o mais frequente entre as espécies do gênero (CHINNAPPA, 1987; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; BASAPPA; MUNIYAMMA;; VALLE; PAGLIARINI, 2009; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010). Posteriormente, análises citogenéticas moleculares com uso da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), também foram realizadas em *U. brizantha* (4x), *U. decumbens* (4x) e *U. ruziziensis* (2x) para a diferenciação dos cariótipos por meio da localização das sequências de DNA ribossomal, evidenciando diferenças nos números de sítios de rDNA 5S e 45S entre as espécies (NIELEN *et al.*, 2009; AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; NANI *et al.*, 2016).

Mais recentemente, foi confirmada a alotetraploidia e proposta a constituição genômica  $BBB^1B^1$  e  $B^1B^1B^2B^2$  para espécies *U. brizantha* (4x) e *U. decumbens* (4x) e  $B^2B^2$  para *U. ruziziensis*, baseada em uma análise envolvendo a técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH) (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017) associada a estudos meióticos anteriores (MENDES-BONATO *et al.*, 2001, 2002a, 2002b, 2006a, 2006b; MENDES *et al.*, 2006). Paula *et al.* (2017) demonstraram que esses genomas são homeólogos com menor afinidade entre B e  $B^2$ , indicando maior proximidade entre *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, como já proposto por outros autores (BASAPPA *et al.* 1987; LUTTS *et al.* 1991; NDIKUMANA, 1985; TRIVIÑO *et al.*, 2017).

Diante deste cenário e dispondo dos citótipos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*, análises complementares empregando a GISH podem contribuir para validar o modelo de composição genômica proposto por Paula *et al.* (2017), assim como auxiliar na definição dos genomas ancestrais das espécies tetraploides e das relações de afinidade

genômica entre as espécies diploides e entre estas e as tetraploides. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar a constituição dos genomas e as relações de homologia/homeologia cromossômica entre os acessos *U. brizantha* (2x e 4x), *U. decumbens* (2x e 4x) e *U. ruziziensis* (2x) por meio da GISH.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância econômica, aspectos botânicos e taxonômicos de *Urochloa*

A pecuária está entre as atividades mais rentáveis do Brasil. Em 2018, a pecuária brasileira movimentou R\$ 523 bilhões, representando cerca de 31% do PIB do agronegócio e 7% do PIB nacional. No Brasil existem 221,81 milhões de cabeças de gado, que ocupam 165 milhões de hectares, colocando o país como o segundo maior produtor de carne bovina no mundo (ABIEC, 2018; IBGE, 2017).

O cultivo de pastagens é a base para a criação de bovinos para corte e produção de leite. O tipo de forrageira usada para alimentação do gado tem impacto direto no seu crescimento, sendo que a escolha da espécie ideal deve equilibrar fatores como conteúdo proteico, quantidade de massa seca e palatabilidade. Além disso, deve ser considerada a adaptação da forrageira ao ambiente em que se deseja utilizá-la, incluindo elementos como a tolerância à seca, frio, resistência à doenças e pragas. No Brasil, os gêneros mais utilizados como forrageiras são *Urochloa* e *Panicum* (capim-colonião), que representam 83,8% e 13,5% da área total destinada à produção de sementes, respectivamente (JANK *et al.*, 2014)

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) pertence à tribo Paniceae, subfamília Panicoideae e família Poaceae. Existe uma problemática taxonômica envolvendo o gênero, em que espécies previamente pertencentes ao gênero *Brachiaria* foram incluídas em *Urochloa*. *Brachiaria* continha cerca de 100 espécies com distribuição pantropical, em uma ampla variedade de habitats, que abrangiam desde desertos a pântanos. *Urochloa*

compreendia 12 espécies que se distribuíam principalmente por savanas africanas (TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005).

*Brachiaria* foi descrita inicialmente em 1826, por Trinius, como uma subdivisão do gênero *Panicum* L. Posteriormente, o grupo foi elevado a gênero por Grisebach, em 1853. Em 1903, Nash definiu a orientação das espiguetas e posição da gluma inferior como características diagnósticas do gênero (MORRONE; ZULOAGA, 1992).

Quando ainda eram tratados como gêneros distintos, os limites taxonômicos de *Brachiaria* e *Urochloa* se fundamentavam na morfologia floral. As espécies de *Brachiaria* eram descritas como gramíneas anuais ou perenes com inflorescências em forma de espiguetas, dispostas em racemos unilaterais ao longo de uma ráquis central filiforme. As espiguetas são sésseis ou pediceladas, individuais ou em pares, com gluma inferior adjacente à ráquis, em posição adaxial. Espécies de *Urochloa* também eram descritas como anuais ou perenes, com inflorescências racemosas e espiguetas dispostas individualmente ou em pares, mas com gluma oposta à ráquis, em posição abaxial (CLAYTON; RENVOIZE, 1986).

A confiabilidade dos caracteres utilizados para separar *Brachiaria* de *Urochloa* foi questionada por vários autores. Um dos argumentos é que a diferença na orientação das espiguetas (adaxial, com gluma inferior adjacente à ráquis em *Brachiaria*; e abaxial, com gluma inferior oposta à ráquis em *Urochloa*) só é válida para espiguetas individuais em ramos primários. Quando em pares, as espiguetas dos dois gêneros possuem orientação adaxial (MORRONE; ZULOAGA, 1992). Além disso, filogenias moleculares utilizando região ITS (TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005) e genes cloroplastidiais (SALARIATO *et al.*, 2010) mostraram que *Brachiaria* e *Urochloa* não são dois clados distintos, apresentando relações de parentesco mais complexas e diferentes das caracterizações morfoanatômicas anteriores.

Como resposta à problemática taxonômica, *Brachiaria* foi restrito a três espécies que possuem desarticulação na base do antécio superior, sendo as demais transferidas para *Urochloa*, aumentando drasticamente seu número de espécies. Posteriormente, Veldkamp

(2004) estabeleceu que *Brachiaria* e *Urochloa* são sinônimos, transferindo as três espécies restantes (*B. eruciformis*, *B. malacodes*, *B. schoenfelderi*) para o novo gênero *Moorochloa* Veldkamp.

Atualmente, *Urochloa* compreende cerca de 135 espécies, sendo a maior parte delas encontradas no continente africano, que é considerado seu centro de origem (CLAYTON *et al.*, 2016). No Brasil, o gênero foi introduzido oficialmente em 1952, com a espécie *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster. Entretanto, seu estabelecimento em larga escala só ocorreu após as importações de *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga, *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster e de uma grande quantidade de sementes, a partir de 1965. Na década de 70, houve um enorme aumento das áreas de pastagens cultivadas com as espécies *U. decumbens*, *U. humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga, *U. brizantha* e *U. ruziziensis*, que se adaptaram bem ao clima e solo brasileiros (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002). As espécies de *Urochloa* mais utilizadas como forrageiras no Brasil, em ordem decrescente, são *U. decumbens*, *U. brizantha*, *U. humidicola*, *U. ruziziensis* (JANK *et al.*, 2014).

As relações filogenéticas entre as três principais espécies de *Urochloa* demonstram certa controvérsia. Renvoize *et al.* (1996) em um estudo baseado na morfologia das espiguetas, classificaram 83 espécies de *Urochloa* em nove grupos diferentes, sendo *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* pertencentes ao mesmo grupo. Os autores destacaram ainda uma maior proximidade entre *U. brizantha* e *U. decumbens*, havendo dificuldade de distinção entre as duas e ainda reidentificaram *U. decumbens* cv. Basilisk como *U. brizantha*.

Ambiel *et al.* (2008) também questionaram a identificação da cultivar Basilisk como *U. decumbens*, visto que estes analisaram um dendrograma baseado em marcadores RAPD que posicionou essa espécie com os acessos de *U. brizantha*. Em outro trabalho, novamente com marcadores RAPD, Ambiel *et al.* (2010) agruparam *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, também verificando maior proximidade entre as duas primeiras. Essa relação foi

corroborada por Pessoa Filho *et al.* (2017) por meio da filogenia baseada em genes cloroplastidiais, sugerindo que a linhagem de *U. ruziziensis* teria se divergido das outras duas em 5.67 milhões de anos, seguida de uma divergência mais recente entre *U. brizantha* e *U. decumbens*, por volta de 1.6 milhões de anos.

Em contrapartida, Triviño *et al.* (2017), em um estudo de diversidade genética e estrutura populacional baseado em microssatélites, com 601 acessos diploides e poliploides de *Urochloa*, verificou maior proximidade entre *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, em relação a *U. brizantha* e determinou que a cultivar Basilisk é de fato mais próxima dos outros acessos tetraploides de *U. decumbens*.

Apesar de seu uso extensivo em pastagens, as cultivares de *Urochloa* possuem suas respectivas limitações agrônômicas: *U. decumbens* cv. Basilisk apresenta susceptibilidade às cigarrinhas de pastagens (*Notozulia entreriana*) e, ocasionalmente, é atacada pelo fungo *Phitomyces chartarum*, que acarreta problemas para o gado quando ingerido por um período prolongado de tempo; *U. brizantha* cv. Marandu é mais tolerante ao inseto, porém é menos adaptada a solos ácidos, pobres e mal drenados, além de ser susceptível ao fungo *Rhizoctonia*. *U. ruziziensis* apresenta o melhor valor nutricional, mas também é susceptível às cigarrinha de pastagens e não é persistente em solos ácidos ou longos períodos de seca. (ALVIM; BOTREL; XAVIER, 2002; VALLE; RESENDE; JANK, 2009).

Após mais de três décadas de adaptação excepcional e grande expansão de *Urochloa* como forrageira no Brasil, surgiu a demanda por um programa de melhoramento que reunisse as características desejáveis de diferentes cultivares e espécies do gênero, tais como a adaptação a solos ácidos, produtividade elevada, bom valor nutricional e resistência à cigarrinha e fungos (MILES *et al.*, 2004). Nesse contexto, a Embrapa Gado de Corte-Campo Grande, MS e Gado de Leite-Juiz de Fora-MG vem conduzindo programas de melhoramento com as principais espécies, tendo como foco a produção de híbridos interespecíficos (VALLE; RESENDE; JANK, 2009). Os principais programas de melhoramento se destinam a cruzamentos interespecíficos, envolvendo as espécies do complexo agâmico (*U. brizantha*, *U.*

*decumbens* e *U. ruziziensis*) (JANK *et al.*, 2014), mas também existem trabalhos que focam no melhoramento intraespecífico de *U. humidicola* (BOLDRINI *et al.*, 2011; JUNGSMANN *et al.*, 2010).

Dentre as 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 inviabilizem os gametas e elucidando problemas de fecundação e de produção de sementes em híbridos (VALLE.; RESENDE; JANK, 2009).

Outro fator importante a ser considerado em um programa de melhoramento é o modo de reprodução das espécies. *Urochloa* é um gênero predominantemente poliploide e apomítico. A apomixia é uma forma de reprodução assexuada com produção de sementes que está associada à poliploidia. A apomixia é encontrada em diversas famílias de Angiospermas, não necessariamente relacionadas entre si (HAND; KOLTUNOW, 2014). Na subfamília Panicoideae, estima-se que mais de 500 espécies apresentem reprodução apomítica, dentre as quais se encontram as espécies de *Urochloa*. Esse modo de reprodução é interessante quando se pretende realizar cruzamentos, pois ele garante a fixação do vigor híbrido associado a todas as vantagens da propagação de sementes (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Uma maneira de explorar as características desejadas nos indivíduos apomíticos é a realização de cruzamentos com as plantas sexuais. Para viabilizar os cruzamentos, é necessário igualar o nível de ploidia dos genitores, o que pode ser realizado por haploidização das espécies apomíticas tetraploides ou a duplicação do número cromossômico das diploides sexuais (PEREIRA *et al.*, 2012). Existem acessos diploides e sexuais de *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* identificados no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte (VALLE *et al.* 2008). Esses genótipos tem sido utilizados nos programas de melhoramento, em tratamentos visando a poliploidização (PINHEIRO, 2000). Em *Urochloa*, já foi realizada a duplicação cromossômica nas espécie *U. ruziziensis* (SWENNE; LOUANT; DUJARDIN, 1981; ISHIGAKI *et al.*, 2009; TIMBO *et al.*, 2014b) e em acessos diploides de

*U. brizantha* (PINHEIRO, 2000) e *U. decumbens* (SIMIONI; VALLE, 2015), através da imersão de sementes germinadas em solução de colchicina Alguns cruzamentos resultaram no lançamento das cultivares Mulato I (*U. brizantha* (cv. Marandu) e *U. ruziziensis*), Mulato II (*U. decumbens* (cv. Basilisk) e *U. ruziziensis*) (SOUZA SOBRINHO, 2009) e Ibyporã (*U. brizantha* x *U. ruziziensis*) (EMBRAPA, 2017).

## 2.2 Caracterização citogenética de *Urochloa*

A citogenética fornece informações básicas essenciais para estudos evolutivos e para programas de melhoramento. Além disso, o uso de tais informações em estudos taxonômicos, ou citotaxonomia, tem contribuído para um melhor entendimento sobre a relação genética entre espécies e a maneira em que elas divergem umas das outras (GUERRA, 2008). A citogenética dispõe de várias ferramentas para auxiliar na distinção entre grupos morfológicamente similares (DOBIGNY *et al.*, 2004), sendo as mais clássicas: o número, tamanho e morfologia dos cromossomos, presença de constrições secundárias, tamanho do genoma e padrões de distribuição da cromatina (GUERRA, 2012).

O número cromossômico é o dado citogenético mais conhecido para quase todas as famílias de plantas. Apesar de ser o parâmetro mais simples do cariótipo, é também a maneira mais fácil, rápida e barata de levantar alguma informação substancial sobre o genoma de uma espécie (GUERRA, 2008), sendo ainda mais eficaz para diferenciar espécies de gêneros filogeneticamente próximos ou de grupos polifiléticos com cariótipo variável (GUERRA, 2012).

Estudos citogenéticos em *Urochloa* mostram a predominância do número básico de cromossomos  $x=9$  (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; SPIES *et al.*, 1991; VALLE, C. B.; SINGH; MILLER, 1987), embora existam relatos dos números  $x=5, 6, 7, 8, 10$  e  $12$  ( SHARMA; SHARMA, 1979; SHARMA; KOUR, 1980; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006). Valle e Pagliarini (2009) revisaram os números cromossômicos do gênero existentes na literatura e encontraram espécies variando de  $2n=14$  a  $2n=90$ , com variação intraespecífica e diferentes níveis de ploidia, havendo uma tendência à

tetraploidia. Dentre as espécies com maior importância econômica encontram-se: *U. brizantha* ( $2n=2x=18$ ,  $2n=4x=36$ ,  $2n=5x=45$  ou  $2n=6x=54$ ), *U. decumbens* ( $2n=2x=18$  ou  $2n=4x=36$ ), *U. ruziziensis* ( $2n=2x=18$ ) e *U. humidicola* ( $2n=6x=36$  ou  $2n=9x=54$ ) (VALLE; PAGLIARINI, 2009)

Por meio da citometria de fluxo, Ishigaki et al. (2010) analisaram os tamanhos dos genomas de quatro espécies de *Urochloa* para avaliar sua utilização em cruzamentos. Foi observada variação nos valores C entre as cultivares, aumentando com o aumento da ploidia. A diploide sexual *U. ruziziensis* apresentou o menor valor C (0,62 pg), seguida das poliploides apomíticas (*U. brizantha* tetraploide 1,43 pg; *U. decumbens* tetraploide 1,66 pg; *U. brizantha* pentaploide 1,78 pg e *U. humidicola* hexaploide 1,99 pg). Os autores destacaram que as diferenças nos tamanhos dos genomas das cultivares não representam barreiras para cruzamentos no gênero e que as plantas tetraploides apomíticas podem ser usadas como doadoras de pólen em cruzamentos com *U. ruziziensis* tetraploidizada.

Paula et al. (2017) também quantificaram o DNA de algumas espécies e de híbridos de *Urochloa*, comparando os valores dos híbridos H963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*), H1863 (*U. ruziziensis* x *U. brizantha*) e Mulato II [(*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) x *U. brizantha*] com os valores de seus parentais. Foram encontrados 3,62 pg de DNA para H963, 3,24 pg para H1863 e 3,83 pg para Mulato II. Os autores verificaram que houve um aumento na quantidade de DNA do híbrido Mulato II em relação à média de seus parentais, um resultado incomum na literatura.

A existência de híbridos entre as espécies *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* demonstra a proximidade genética entre elas. No entanto, ainda existem dúvidas sobre as relações genômicas entre as três espécies. Estudos meióticos nas tetraploides *U. brizantha* e *U. decumbens* revelaram uma série de anormalidades, como segregação irregular, formação de multivalentes e presença de micronúcleos, que evidenciaram aloploidia segmental nessas espécies (MENDES-BONATO et al., 2002a; MENDES-BONATO et al., 2002b). Posteriormente, novas análises meióticas em híbridos triploides e tetraploides de *U. brizantha*

e *U. ruziziensis*, mostraram meiócitos com segregação assincrônica e pareamento intragenômico (MENDES-BONATO et al., 2006a; MENDES-BONATO et al., 2006b). Com base nesses resultados, os autores inicialmente designaram os genomas de acordo com as iniciais dos epítetos das espécies, sendo genoma B para *U. brizantha* e genoma R para *U. ruziziensis*.

### 2.3 Citogenética molecular e relação genômica de *Urochloa*

Em táxons que possuem cariótipos muito similares, é necessário o uso de técnicas que forneçam maior grau de detalhamento dos cromossomos para que seja detectada variação entre os genomas. Um exemplo é o bandamento cromossômico que pode ser utilizado para identificar regiões heterocromáticas (ex: Bandamento C), eucromáticas (ex: Bandamento G), e os bandamentos fluorescentes para marcar regiões ricas em A-T (ex: DAPI) e regiões ricas em C-G (ex: CMA). Além dessas técnicas, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido amplamente empregada para detectar sequências de DNA específicas, seja em núcleos interfásicos ou cromossomos metafásicos (BARTLETT, 2008).

A FISH funciona com a utilização de sondas que se hibridizam com sequências de DNA complementares nos cromossomos e são detectadas devido à presença de marcadores fluorescentes. As sequências mais utilizadas como sondas são os DNAs ribossomais, teloméricos e centroméricos. Essas sequências, geralmente, têm em comum a sua organização em blocos repetitivos (em tandem) e o fato de serem conservadas evolutivamente, se apresentando muito similares em todos os eucariotos (ROA; GUERRA, 2015).

A utilização da técnica de FISH em estudos citogenéticos possibilitou o mapeamento físico de rDNA em espécies de *Urochloa*. Nielen et al., (2009) localizou sequências de rDNA 5S e 45S associada à cariotipagem convencional em acessos sexual diploide (BRA 002747) e apomítico tetraploide (BRA 000591) de *U. brizantha* (Tabela 1). O acesso diploide apresentou número cromossômico  $2n=18$ , com fórmula cariotípica  $3M+5SM+1T$ . No acesso tetraploide foi observado  $2n=4x=36$  e fórmula cariotípica  $8M+1SM$ . Os autores destacaram que o número de sítios de rDNA 5S não correspondeu ao nível de ploidia dos acessos, visto

que era esperado o dobro do número de sítios de rDNA no acesso tetraploide em relação ao acesso diploide (NIELEN *et al.*, 2009).

Akyama *et al.* (2010) utilizaram diferentes acessos de *U. brizantha* (4x e 5x), *U. ruziziensis* (2x), *U. humidicola* (6x) e do híbrido Mulato (4x – originado do cruzamento de *U. decumbens* e *U. ruziziensis*) em um estudo de rDNA com o uso da FISH. Foram observadas diferenças no número e morfologia dos sítios de rDNA (Tabela 1). O número de sítios de rDNA 45S correspondeu aos níveis de ploidia em todas as espécies (diploide com dois sítios; tetraploides com quatro sítios; pentaploide com cinco sítios e hexaploide com seis sítios). O mesmo não foi observado em relação aos loci de rDNA 5S. Tais resultados indicaram a coexistência de diferentes genomas nas espécies sugerindo a alopoliploidia.

**Tabela 1:** Número cromossômico e sítios de rDNA em espécies de *Urochloa*

Espécie	Núm. Cromossômico	Sítios 5S	Sítios 45S	Ref.
<i>U. brizantha</i>	$2n = 2x = 18$	1	1	Nielen <i>et al.</i> (2009)
	$2n = 4x = 36$	3	2	Nielen <i>et al.</i> (2009)
	$2n = 4x = 36$	6	4	Akyama <i>et al.</i> (2010)
	$2n = 4x = 36$	4	4	Akyama <i>et al.</i> (2010)
	$2n = 5x = 45$	5	5	Akyama <i>et al.</i> (2010)
	$2n = 4x = 36$	3-6	2-4	Nani <i>et al.</i> (2016)
<i>U. decumbens</i>	$2n = 4x = 36$	7	4	Nani <i>et al.</i> (2016)
<i>U. humidicola</i>	$2n = 6x = 54$	6	6	Akyama <i>et al.</i> (2010)
<i>U. ruziziensis</i>	$2n = 2x = 18$	4	2	Akyama <i>et al.</i> (2010)
	$2n = 2x = 18$	2	1	Nani <i>et al.</i> (2016)

Em outro estudo, Nani *et al.* (2016) realizaram um estudo cariotípico nas espécies *U. brizantha* (4x), *U. decumbens* (4x) e *U. ruziziensis* (2x), através do mapeamento das sequências de rDNA 5S e 45S (Tabela 1), retrotransposon centromérico do milho (CRM1) e bandas CMA e DAPI. Foram observadas variações no número de sítios de rDNA 5S e 45S em *U. brizantha* e um par heteromórfico e outro em hemizigose em *U. decumbens*. Bandas CMA

foram observadas nas três espécies, coincidindo com os sítios de rDNA 45S. 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.

A técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH), uma variação da FISH, tem sido usada em estudos com o propósito de distinguir cromossomos de diferentes genitores ou de genomas diferentes em aloploidos e híbridos interespecíficos/intergenéricos. Enquanto a FISH usa sequências de DNA específicas como sondas, a GISH utiliza o DNA genômico (gDNA) total de uma espécie (SCHWARZACHER, 2003). Tal procedimento permite que genomas inteiros sejam marcados, sendo possível identificar os genitores em híbridos naturais ou artificiais, estudar a origem e evolução de aloploidos e auxiliar na seleção de genitores em programas de melhoramento genético (SILVA; SOUZA, 2013).

A GISH já foi empregada em grupos importantes de gramíneas, como *Triticeae* Dumort. (ANAMTHAWAT-JÓNSSON *et al.*, 1990), *Lolium* L. e *Festuca* L. (CAO *et al.*, 2000; KOPECKÝ *et al.*, 2009), *Setaria* P. Beauv. (BENABDELMOUNA *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2013), *Cenchrus* L. e também *Urochloa* (PAULA *et al.*, 2017) para distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploidos.

Em *Urochloa*, Paula *et al.* (2017) utilizaram concomitantemente a GISH e a FISH para analisar as relações genômicas nas espécies *U. brizantha* (4x), *U. decumbens* (4x), *U. ruziziensis* (2x e 4x) (Tabela 2) e nos híbridos H963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*), H1863 (*U. ruziziensis* x *U. brizantha*) e Mulato II. Os autores verificaram alta homologia entre os genomas de *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*, sendo *U. decumbens* a intermediária na relação de parentesco das três espécies. Tais análises foram subsidiadas pelos estudos meióticos mencionados anteriormente, que mostraram meiócitos das tetraploides *U. brizantha* e *U. decumbens* com anormalidades típicas de aloploidos segmentais (MENDES-BONATO *et al.*, 2001; MENDES-BONATO *et al.*, 2002a; MENDES-BONATO *et al.*,

2002b). De acordo com os resultados, os autores confirmaram a alopoliploidia de *U. brizantha* e *U. decumbens* e propuseram a constituição genômica das duas espécies e de *U. ruziziensis*, que foram caracterizadas com os genomas BBB<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>B<sub>2</sub> e B<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, respectivamente. Os autores ainda destacaram que os genomas B, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram considerados homeólogos, com menor afinidade entre B e B<sub>2</sub>.

**Tabela 2:** Porcentagens de hibridização entre genomas de *Urochloa*, fornecidas pela GISH

Sonda genômica	Metáfase		
	<i>U. brizantha</i> (4x)	<i>U. decumbens</i> (4x)	<i>U. ruziziensis</i> (4x)
<i>U. brizantha</i>	100%	61,04%	32,69%
<i>U. decumbens</i>	59,66%	100%	63,54%
<i>U. ruziziensis</i>	49,55%	35,24%	100%

Fonte: Paula *et al.* (2017)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local

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

#### 3.2 Material vegetal

Foram avaliados acessos diploides sexuais de *U. brizantha* (B105, originário da Etiópia), *U. decumbens* (D04, originário do Quênia) e *U. ruziziensis* cv. Kennedy e acessos tetraploides apomíticos de *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk. Os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* foram cedidos pela EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande - MS e os demais foram cedidos pela EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora

- MG. As plantas foram mantidas em vasos, em casa de vegetação no Departamento de Biologia da UFLA.

### 3.3 Preparo das lâminas

Pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com ciclohexamida  $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ , por 2 horas a temperatura ambiente, lavadas em água gelada, fixadas em Carnoy (3 etanol : 1 ácido acético) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

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

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

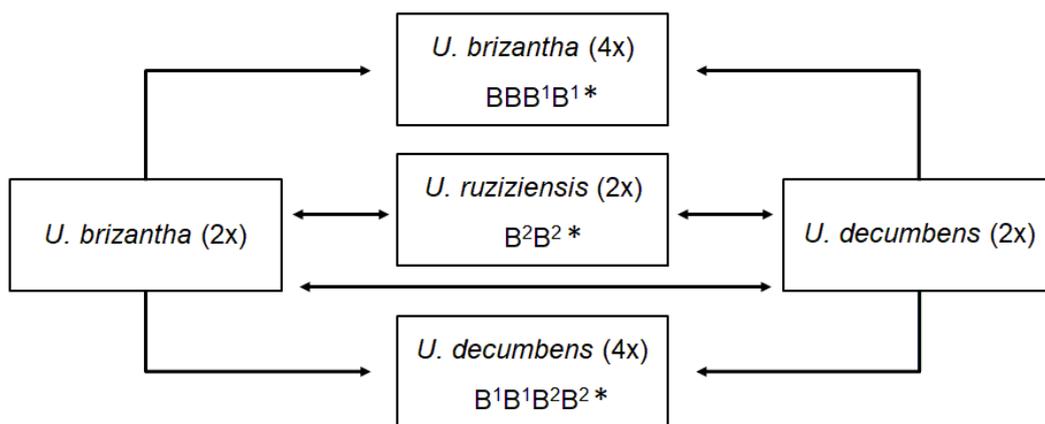
### 3.4 Hibridização *in situ* genômica - GISH

As sondas de DNA genômico (gDNA) de *U. brizantha* e *U. decumbens* (diploides) foram usadas em hibridizações genômicas com os acessos tetraploides. Entre as espécies diploides, a GISH foi realizada no esquema “round robin”, no qual as sondas de gDNA marcados de cada espécie foram usadas em hibridizações recíprocas (Figura 1).

As preparações cromossômicas foram rapidamente fixadas em solução de 3 etanol : 1 ácido acético e secas ao ar. Foram aplicados  $100 \mu\text{L}$  de solução formamida 70% em SSC 2x nas lâminas que após cobertas com lamínula 24x40 mm foram colocadas em estufa a  $85^{\circ}\text{C}$  por 1 min e 25 seg para desnaturação do DNA. Em seguida as lâminas foram imediatamente imersas em álcool etílico 70% gelado e posteriormente em álcool 90% e 100% e secas ao ar. A mistura de hibridização consistiu de 50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato de dextran, 40

ng/ $\mu$ L de DNA das sondas marcadas. Não foi utilizado DNA bloqueio. As sondas foram desnaturadas a 95-98 °C, por 8 min e imediatamente resfriadas em gelo. Foram aplicados 20  $\mu$ L da mistura de hibridização às preparações cromossômicas que foram seladas com lamínula. A hibridização foi realizada a 37 °C por 48 hs, seguida por lavagens sob agitação em 2xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente, em 2xSSC a 42 °C por 10 minutos; 2xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente e TNT por 5 minutos. A detecção das sondas foi feita com os anticorpos anti-digoxigenina conjugado com rodamina, em tampão TNB, por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida. Após remoção da lamínula as lâminas foram lavadas três vezes, 5 minutos cada, em TNT, à temperatura ambiente, sob agitação. Após secagem ao ar as lâminas foram montadas com meio de montagem Vectashield contendo DAPI.

**Figura 1.** Esquema de hibridizações *in situ* genômicas (GISH) em espécies de *Urochloa*.

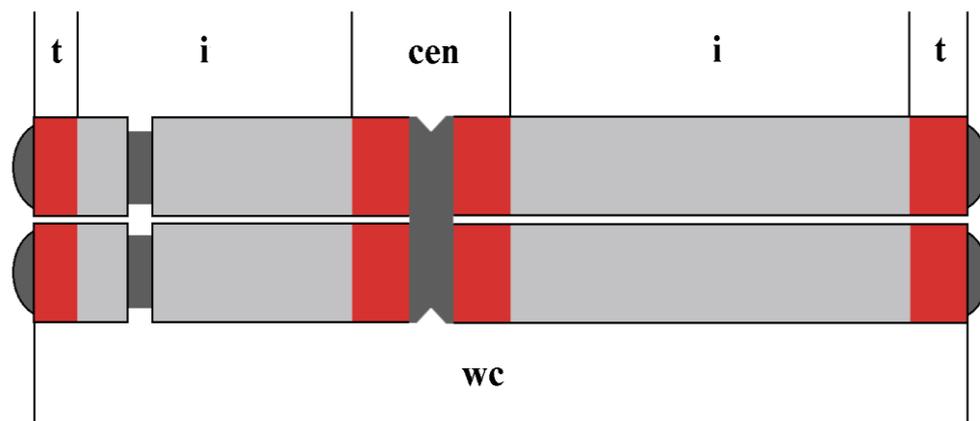


(\*) Genomas determinados por Paula *et al* (2017)

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60 equipado com sistema de epifluorescência e câmera digital refrigerada, usando filtros específicos para DAPI (Excitação: 330-385 nm; Emissão: 420 nm) e Rodamina (Excitação: 400-410 nm; Emissão: 455 nm). As imagens obtidas foram processadas para ajustes de brilho e contraste em software de edição de imagens.

A análise da relação entre os genomas dos acessos diploides com os dos acessos tetraploides teve como base a composição genômica proposta por Paula et al. (2017), que caracterizou os genomas  $BBB^1B^1$ ,  $B^1B^1B^2B^2$  e  $B^2B^2$  para *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis* respectivamente. Os segmentos cromossômicos marcados pela sonda genômica (marcas GISH+) foram mensurados no software Karyotype 2.0 (YU et al., 2018) para avaliar a proporção de genoma hibridizado nas metáfases. Os cromossomos foram agrupados de acordo com as marcas de hibridização, segundo as regiões cromossômicas (centroméricas e pericentroméricas, intersticiais e terminais) descritas por Heslop-Harrison et al. (2011) com adaptações (Figura 2).

**Figura 2:** Divisão das regiões cromossômicas: centromérica/pericentromérica (cen), intersticial (i), terminal e cromossomo inteiro (wc).



Fonte: adaptado de Heslop-Harrison et al. (2011).

O processamento das imagens foi feito com auxílio de software de edição de imagens.

### 3.5 Citometria de fluxo

Três amostras de 20-30 mg de tecido foliar jovem dos acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* e também da espécie *Pisum sativum* L. (padrão interno de referência – Quantidade de DNA  $2C = 9,09$  pg) foram maceradas em placa de Petri contendo

1 mL de tampão  $MgSO_4$  gelado para obter a suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). Em seguida, 25  $\mu L$  de iodeto de propídio foram adicionados à suspensão. Para cada amostra foram quantificados pelo menos 10.000 núcleos.

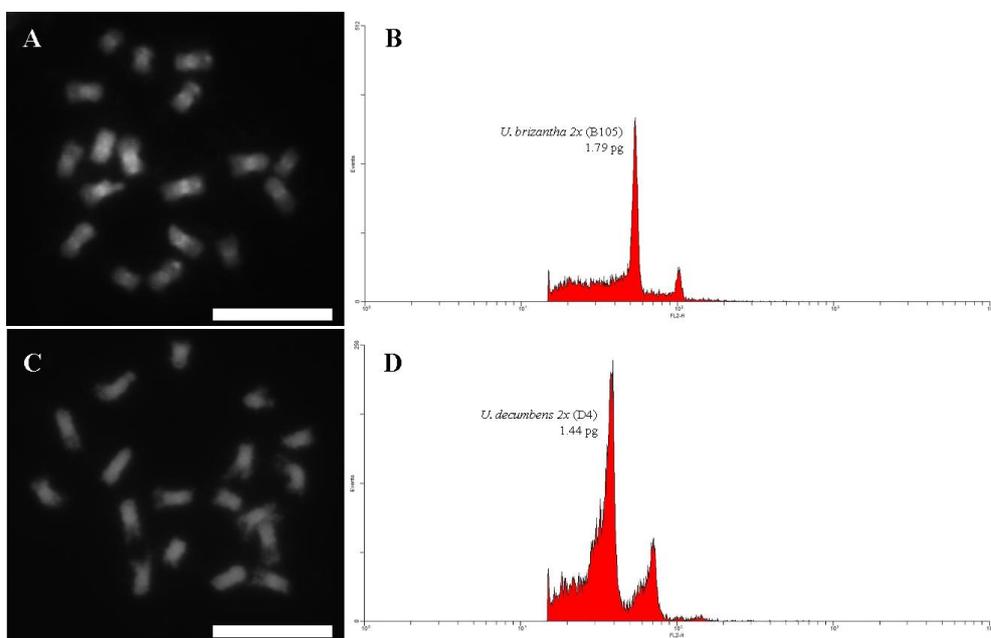
A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas foram obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.9. O conteúdo de DNA foi estimado em picogramas (pg).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Número cromossômico e tamanho do genoma

Para os acessos diploides de *U. brizantha* (B105) e *U. decumbens* (D04) foram confirmados 18 cromossomos e determinado o conteúdo de DNA de 1.79 e 1.44 pg, respectivamente (Figura 3).

**Figura 3.** Metáfases com  $2n = 18$  cromossomos contrastados com DAPI e histogramas de citometria de fluxo com a quantificação de DNA nos acessos B105 de *U. brizantha* – 1.79 pg (A-B) e D04 de *U. decumbens* – 1.44 pg (C-D). Barra: 10  $\mu m$ .



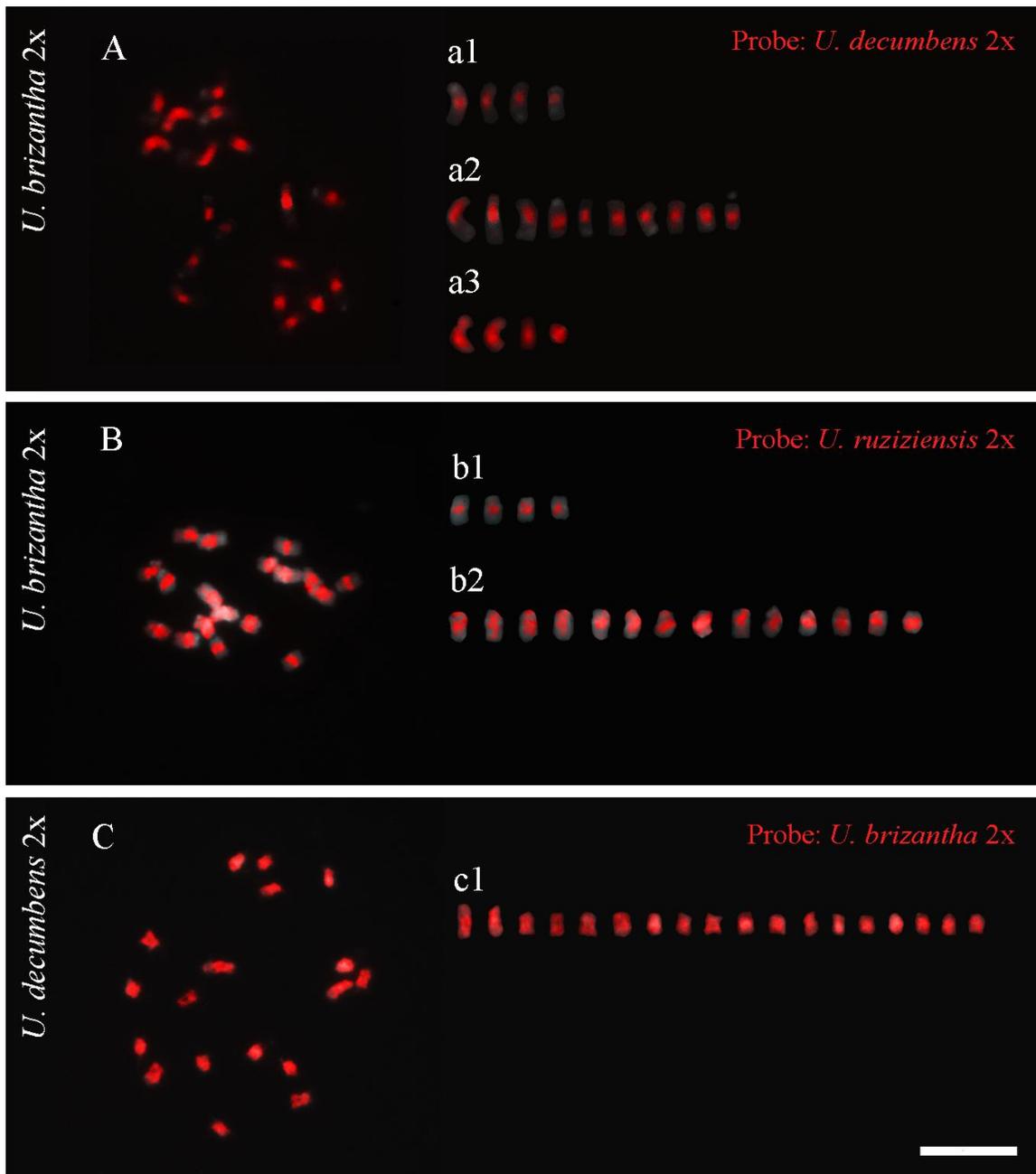
Fonte: Do autor (2019)

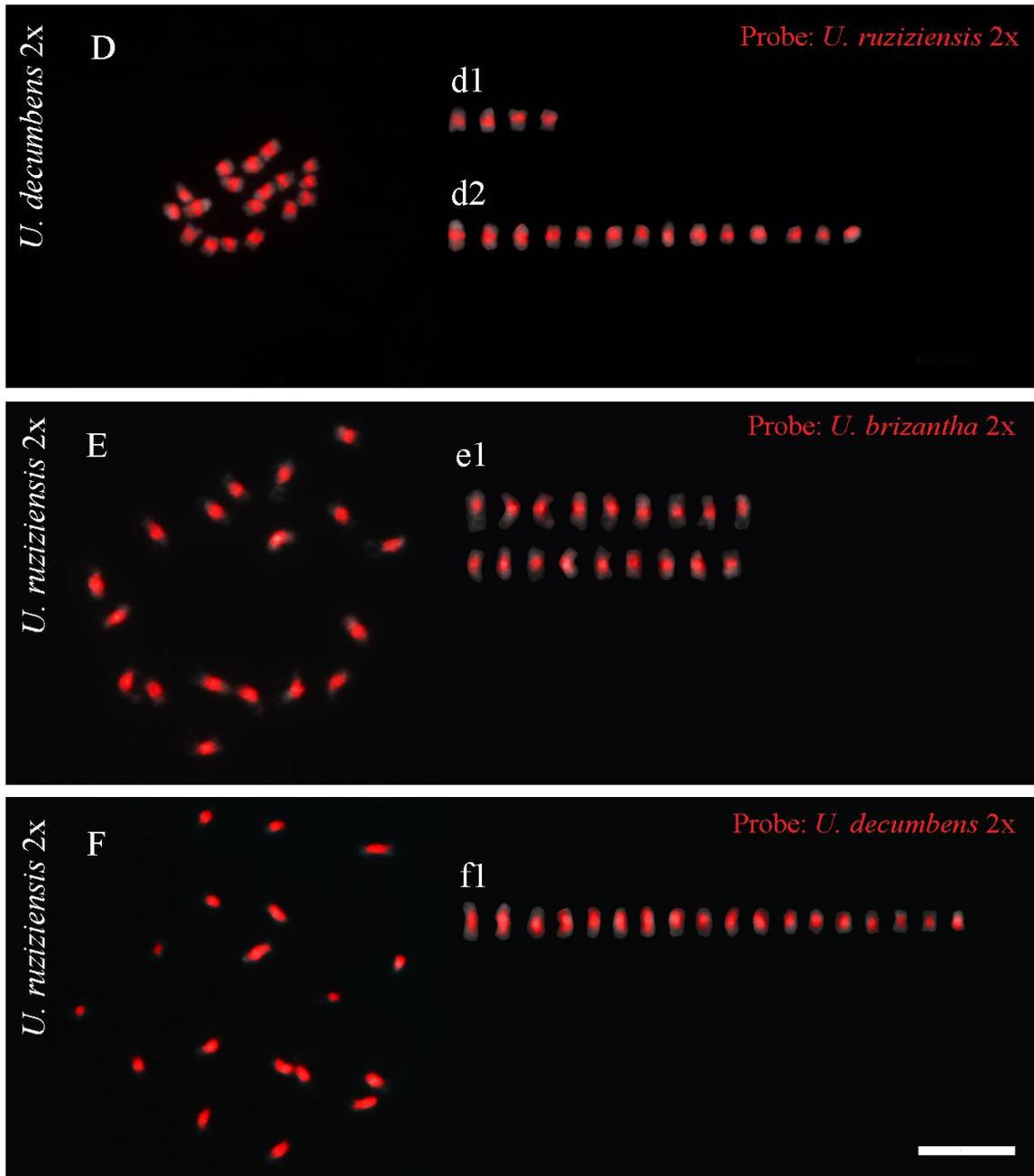
## 4.2 Análise da hibridização *in situ* genômica (GISH)

Nas análises da GISH, o DNA genômico (gDNA) de *U. decumbens* 2x e de *U. ruziziensis* hibridizaram 65.43% e 45.20%, respectivamente, no genoma de *U. brizantha* 2x (Tabela 3). A sonda genômica de *U. decumbens* 2x revelou marcas centroméricas/pericentroméricas em quatro cromossomos (Fig. 4a1), sinais estendidos até a região intersticial em 10 cromossomos (Fig. 4a2) e quatro cromossomos completamente hibridizados (Fig. 4a3). Com o gDNA de *U. ruziziensis*, foram evidenciados quatro cromossomos com marcas centroméricas/pericentroméricas (Fig. 4b1) e 14 cromossomos com marcas intersticiais (Fig. 4b2).

Em *U. decumbens* 2x, a proporção de genoma hibridizado com o gDNA de *U. brizantha* 2x foi de 100% (Tabela 3), sendo todos os cromossomos completamente marcados (Fig. 4c1). A sonda de gDNA de *U. ruziziensis* 2x hibridizou 60.89% com o genoma de *U. decumbens* 2x. Em quatro cromossomos foram observados sinais GISH positivos até a região centromérica/pericentromérica (Fig. 4d1) e 14 cromossomos apresentaram marcas até a região intersticial (Fig. 4d2). A GISH recíproca da sonda de *U. decumbens* 2x hibridizou 70,2% do genoma de *U. ruziziensis* 2x, com todos os cromossomos apresentando sinais GISH<sup>+</sup> estendidos até a região intersticial (Fig. 4F e 4f1). A sonda de *U. brizantha* 2x produziu padrão semelhante de marcação em *U. ruziziensis* 2x (4e1) e cobertura de cerca de 51% de hibridização (Tabela 3)

**Figura 4:** Metáfases de *U. brizantha* ( $2n = 2x = 18$ ) com sonda de *U. decumbens* 2x (A) e *U. ruziziensis* 2x (B). Metáfases de *U. decumbens* ( $2n = 2x = 18$ ) com sonda *U. brizantha* 2x (C) e *U. ruziziensis* 2x (D). Metáfases de *U. ruziziensis* ( $2n = 2x = 18$ ) com sonda de *U. brizantha* 2x (E) e *U. decumbens* 2x (F). Cromossomos contrastados com DAPI (cinza) e marcação da sonda nos cromossomos indicada pela fluorescência (vermelha). Sinais GISH+ centroméricos/pericentroméricos: a1, b1, d1; Sinais estendidos até a região intersticial: a2, b2, d2, e1, f1; Cromossomos completamente hibridizados: a3, c1. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .





Fonte: Do autor (2019)

A GISH com sondas de gDNA de *U. brizantha* 2x e *U. decumbens* 2x mostrou padrão de hibridização semelhante em *U. brizantha* 4x e proporção de hibridização de 41,36% e 51,56%, respectivamente (Tabela 3). Com ambas as sondas, 18 apresentaram marcas centroméricas/pericentroméricas conspícuas (Figura 5a1 e 5b1), variação de 14 e 16

cromossomos com marcas de hibridização estendidas até a região intersticial (Fig. 5a2 e 5b2) e quatro e dois cromossomos completamente hibridizados (Fig. 5a3 e 5b3).

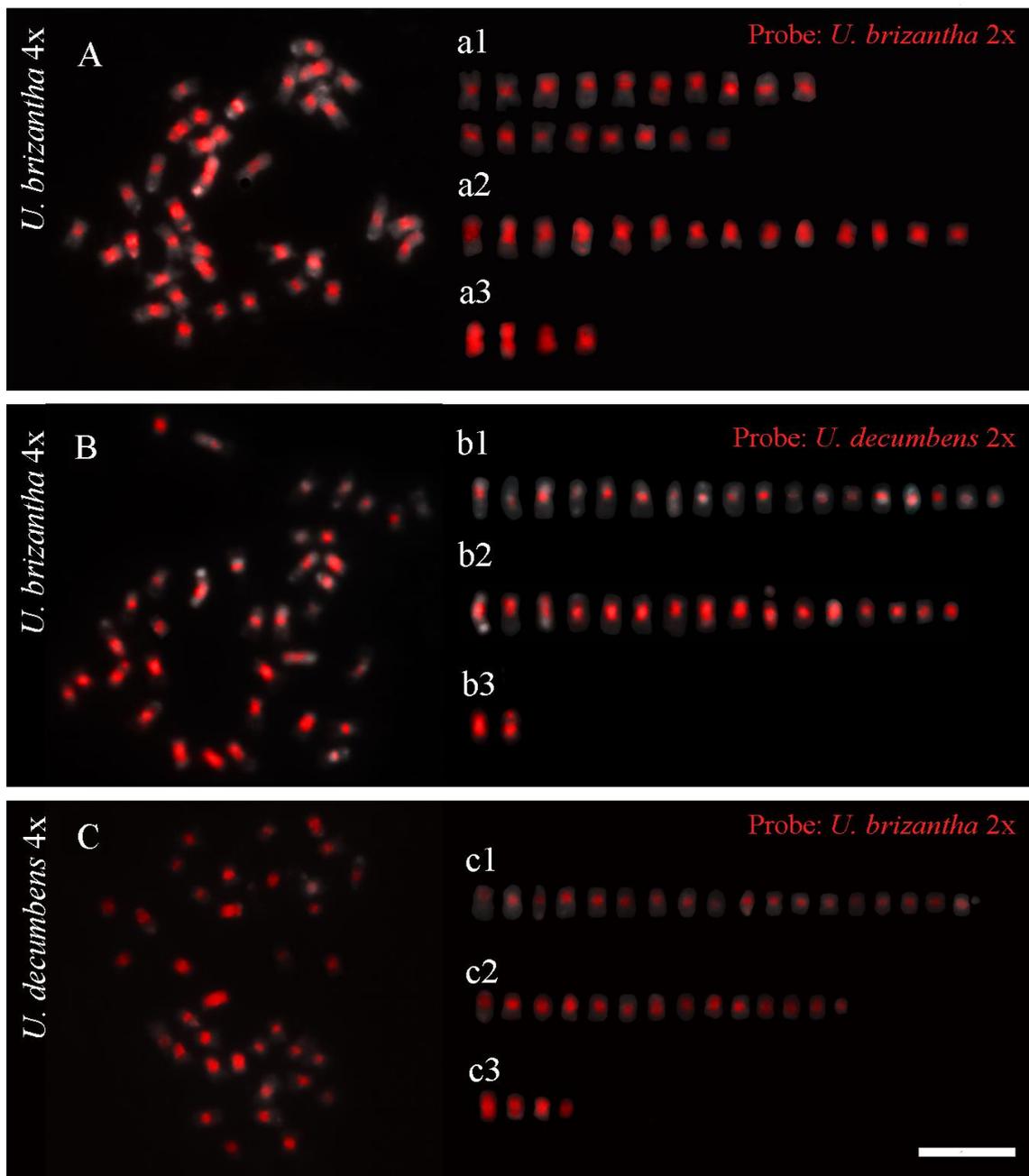
A sonda genômica de *U. brizantha* 2x hibridizou 58.29% do genoma de *U. decumbens* 4x com 18 cromossomos marcados na região centromérica/pericentromérica (Fig. 5c1), 14 até a região intersticial (Fig. 5c2) e quatro cromossomos completamente hibridizados (Fig. 5c3). A proporção de hibridização da sonda de gDNA de *U. decumbens* 2x nos cromossomos de *U. decumbens* 4x foi de 49,38% (Tabela 3), dos quais 29 apresentaram sinais GISH<sup>+</sup> na região centromérica/pericentromérica (Fig. 5d1), cinco até a região intersticial (Fig. 5d2) e dois cromossomos completamente hibridizados (Fig. 5d3)

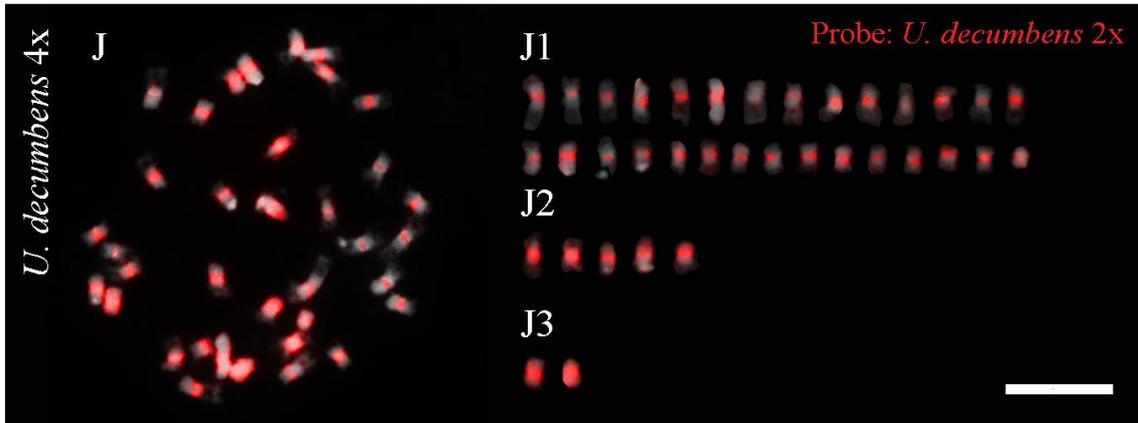
**Tabela 3:** Proporção média e desvio padrão (%) da proporção de hibridização entre genomas de espécies de *Urochloa*

Sonda	<i>U. brizantha</i> 2x	<i>U. decumbens</i> 2x	<i>U. ruziziensis</i> 2x
Metáfase			
<i>U. brizantha</i> 2x	-	65.43 ± 4.63	45.20 ± 0.53
<i>U. decumbens</i> 2x	100	-	60.89 ± 1.45
<i>U. ruziziensis</i> 2x	50.93 ± 1.57	70.12 ± 4.43	-
<i>U. brizantha</i> 4x	41.36 ± 1.98	51.56 ± 2.15	-
<i>U. decumbens</i> 4x	58.54 ± 3.34	49.38 ± 1.28	-

(-) Hibridizações não realizadas

**Figura 5:** Metáfases de *U. brizantha* ( $2n = 4x = 36$ ) com sonda de *U. brizantha* 2x (A) e *U. decumbens* 2x (B). Metáfases de *U. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ) com sonda de *U. brizantha* 2x (C) e *U. decumbens* 2x (D). Cromossomos contrastados com DAPI (cinza) e marcação da sonda nos cromossomos indicada pela fluorescência (vermelha). Sinais GISH+ centroméricos/pericentroméricos: a1, b1, c1, d1; Sinais estendidos até a região intersticial: a2, b2, c2, d2; Cromossomos completamente hibridizados: a3, b3, c3, d3. Barra: 10  $\mu$ m.





Fonte: Do autor (2019)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Número cromossômico e tamanho do genoma

O número cromossômico ( $2n = 2x = 18$ ) observado para os acessos B105 de *Urochloa brizantha* e D04 de *U. decumbens* já havia sido descrito previamente por outros autores (NIELEN *et al.*, 2009; PENTEADO *et al.*, 2000; PINHEIRO, 2000; RICCI *et al.*, 2011). O valor C obtido para ambas espécies ( $870 \text{ Mbp C}^{-1}$  e  $704 \text{ Mbp C}^{-1}$  respectivamente) é consistentemente proporcional ao valor relatado para as cultivares tetraploides Marandu e Basilisk (Tabela 4).

Os genomas de *U. brizantha* e *U. decumbens* diploides são considerados ‘pequenos’, segundo as categorias definidas por Leitch *et al.* (2005) e a diferença na quantidade de DNA entre elas ( $166 \text{ Mbp C}^{-1}$ ), pode ser devida à proporção de DNA repetitivo nos genomas. Bennetzen *et al.* (2005) apontaram as diferenças no conteúdo de DNA repetitivo, especificamente em relação à atividade de diferentes elementos transponíveis, como a principal razão para as variações no tamanho do genoma entre espécies próximas. O aumento gradual da variação no tamanho do genoma pode, a longo prazo, afetar a produção de gametas, resultando em segregação irregular de cromossomos com tamanhos

desproporcionais na meiose (SMARDA; BURES, 2010). No entanto, pequenas diferenças no conteúdo de DNA, como a observada no presente estudo, dificilmente representariam barreiras reprodutivas, visto que variação de proporções similares (ISHIGAKI *et al.*, 2010; TIMBÓ *et al.*, 2014) não impediu o cruzamento de acessos tetraploides em *Urochloa*.

**Tabela 4:** Conteúdo de DNA em espécies de *Urochloa*

Espécie	Valor C (Mbp C <sup>-1</sup> )	Valor Cx (Mbp Cx <sup>-1</sup> )	Ploidia	Ref.
	870	870	2x	Do autor (2019)
<i>U. brizantha</i>	1404	702	4x	Ishigaki (2010)
	1720	860	4x	Timbó (2014a)
	704	704	2x	Do autor (2019)
<i>U. decumbens</i>	1633	817	4x	Ishigaki (2010)
	1855	927	4x	Timbó (2014a)

Mbp = Mega pares de bases. Valor C = conteúdo de DNA gamético. Valor Cx = Conteúdo de DNA por genoma.

Ishigaki *et al.* (2010) avaliaram os valores C de cinco cultivares de quatro espécies de *Urochloa* e verificaram que o tamanho do genoma foi dependente do nível de ploidia, com uma tendência ao aumento do conteúdo de DNA por genoma com o aumento da ploidia. Essa relação também pode ser observada para *U. decumbens* ao comparar os valores obtidos no presente estudo com os valores previamente relatados para as cultivares tetraploides. (ISHIGAKI *et al.*, 2010; TIMBÓ *et al.*, 2014a). O mesmo não foi visto para *U. brizantha*. Contudo, essa comparação, considerando variação intraespecífica de ploidia, não foi realizada por Ishigaki *et al.* (2010), uma vez que a única espécie diploide utilizada em sua análise foi *U. ruziziensis*.

## 5.2 Relação genômica entre espécies diploides de *Urochloa*

As análises permitiram detectar e descrever o padrão de hibridização das sondas de gDNA das espécies diploides de *Urochloa* em GISH recíprocas e também em relação às espécies tetraploides. A partir disso, cromossomos inteiros ou regiões específicas foram distinguidas e revelaram diferentes níveis de relacionamento entre os genomas envolvidos.

Os resultados confirmaram prévias observações feitas em *Urochloa* por Paula *et al.* (2017) em relação às marcações centroméricas/pericentroméricas em todas as metáfases avaliadas, embora estes autores tenham concentrado suas avaliações entre as espécies tetraploides e híbridos interespecíficos. Tais resultados indicam a homologia dos repeats centroméricos entre as espécies do grupo e reforça a íntima relação de parentesco. Outros estudos indicaram a alta conservação dessas sequências entre diferentes gêneros da família Poaceae, tais como *Secale*, *Hordeum*, *Festuca*, *Semiarundinaria*, *Arundo* e *Zea* (BELYAYEV; RASKINA; NEVO, 2001).

Em *Brassica*, MALUSZYNSKA *et al.* (2005) observaram, por meio da GISH, predominância de marcas pericentroméricas nos cromossomos. Os autores associaram esse padrão à elevada proporção de famílias de DNA repetitivo nas regiões centroméricas e pericentroméricas, ao passo que a região distal é provavelmente mais rica em genes e não hibridiza tão distintivamente com a sonda genômica. Especificamente, análises de marcas epigenéticas em *U. ruziziensis* (2x), *U. brizantha* (4x) e *U. decumbens* (4x) realizadas por Paula *et al.* (2016) demonstraram que as regiões terminais e intersticiais-terminais dos cromossomos foram identificadas como domínios eucromáticos pela marcação com o anticorpo H3K4me2. De forma complementar, os sinais de H3K9me2 foram visualizados em domínios tipicamente heterocromáticos, que incluem as regiões centroméricas e pericentroméricas. É importante ressaltar também que, com a GISH, tem sido observado que a marcação preferencial das regiões centromérica e pericentromérica é observada até mesmo em espécies com genomas pequenos, que possuem uma proporção relativamente baixa de famílias de DNA repetitivo, como o arroz (LI *et al.*, 2001) e *Brachypodium distachyon* (JENKINS *et al.*, 2004).

As regiões teloméricas, com exceção dos cromossomos completamente marcados, não apresentaram marcas GISH+, apesar de serem compostas por DNA repetitivo e serem consideradas altamente conservadas em plantas (ROA; GUERRA, 2015; WATSON; RIHA, 2010). Majka *et al.* (2017), em uma análise comparativa por meio da GISH, também observaram ausência de marcas em regiões terminais de diferentes espécies de Poaceae. Os

autores atribuíram esse resultado à composição complexa dos telômeros das espécies em questão, que podem conter, para além da sequência telomérica básica (T/A)<sub>1-4</sub> G<sub>1-8</sub>, outras famílias de DNA organizadas em tandem, como previamente relatado para o trigo (SALINA *et al.*, 2009). Outro fator possivelmente relacionado é a condensação tardia das regiões terminais dos cromossomos de *Urochloa*, relatado por Nani *et al.* (2016), e também observado neste trabalho. Esse fenômeno, associado às desnaturações inerentes à técnica de hibridização *in situ*, causa certa degradação nas terminações dos cromossomos, dificultando obtenção de marcas nessa região.

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

A similaridade entre *U. brizantha* e *U. decumbens* já foi mencionada por outros autores em revisões taxonômicas do gênero, mas referindo-se às tetraploides (MORRONE; ZULOAGA, 1992; RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). Em ambos os trabalhos foi destacado que as duas espécies são frequentemente difíceis de serem diferenciados morfológicamente, sendo a forma da ráquis (filiforme na primeira e plana na segunda) e disposição das espiguetas (uniseriada e duas séries, respectivamente) as únicas diferenças entre elas. Existem inclusive relatos de *U. brizantha* sendo identificada como *U. decumbens*

(RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996) e vice-versa (MAASS, 2004). Ambiel et al. (2008) questionaram a identificação da cultivar Basilisk como *U. decumbens*, visto que o dendrograma baseado em marcadores RAPD posicionou essa espécie em meio aos acessos de *U. brizantha*. Entretanto, Triviño et al. (2017), em um estudo de diversidade genética e estrutura populacional utilizando microssatélites de diploides e poliploides, verificou que a cultivar Basilisk é de fato mais próxima dos outros acessos tetraploides de *U. decumbens*.

O padrão de hibridização genômica em *U. ruziziensis* com o gDNA de *U. brizantha* 2x e *U. decumbens* 2x produziu resultados similares e confirma que os genomas presentes nestas duas últimas espécies são homeólogos ao genoma B<sup>2</sup> de *U. ruziziensis*, como já mencionado por Paula et al. (2017). A diferença na proporção de genoma hibridizado foi maior entre *U. ruziziensis* e *U. decumbens* 2x comparado com a relação *U. ruziziensis* e *U. brizantha* 2x, o que indica a existência de relativamente maior compartilhamento de sequências de DNA repetitivo entre as duas primeiras.

A relação encontrada no presente trabalho para as espécies diploides também é corroborada pelo estudo de Triviño et al. (2017), que concluiu, com base em evidências moleculares, que *U. decumbens* 4x e *U. ruziziensis* são mais próximas entre si do que de *U. brizantha* 4x e indicou que um subgenoma de *U. decumbens* estaria relacionado com *U. ruziziensis* e outro com *U. brizantha*. O mesmo já havia sido proposto para acessos tetraploides com base em análises meióticas (MENDES-BONATO et al. 2002a; MENDES-BONATO et al. 2002b) e reiterado pelo estudo citogenômico de Paula et al. (2017), que mostrou que as três espécies são estreitamente relacionadas e que *U. decumbens* ocupa uma posição intermediária em termos de relação genômica. No entanto, esse resultado diverge das análises de Ambiel et al. (2010), que usaram marcadores RAPD para agrupar acessos geneticamente similares; e de Pessoa-Filho et al. (2017), que produziram uma filogenia molecular baseada em genes cloroplastídicos; em que ambos revelaram maior proximidade genética entre *U. brizantha* e *U. decumbens* (tetraploides), em relação à *U. ruziziensis*.

### 5.3 Constituição e relação genômica entre espécies diploides e tetraploides de *Urochloa*

Na análise do padrão de hibridização genômica de *U. decumbens* diploide nos cromossomos das tetraploides, constatou-se maior afinidade com o genoma de *U. brizantha* 4x comparado com o genoma de *U. decumbens* 4x. Essa relação também foi observada por Triviño et al. (2017), que analisaram a diversidade genética entre acessos de *Urochloa* e verificaram que acessos diploides e poliploides de *U. decumbens* formaram dois subclusters distintos, sendo alguns tetraploides inclusive mais próximos de *U. brizantha*. De acordo com os autores, a distância genética entre acessos diploides e tetraploides da mesma espécie não é surpreendente, visto que a diferença de ploidia e a apomixia representam barreiras reprodutivas.

Esses resultados também são justificáveis ao se considerar a origem alopoliploide das espécies de *Urochloa*, que já foi apontada por estudos baseados em comportamento meiótico (MENDES-BONATO et al., 2001; MENDES-BONATO et al., 2002a), mapeamento de rDNA (AKIYAMA et al., 2010; NANI et al., 2016; NIELEN et al., 2010) e hibridização *in situ* genômica (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017). Já tem sido relatado que um alopoliploide não é necessariamente a soma de seus genótipos parentais, visto que uma série de processos evolutivos ocorre pós poliploidização, tais como reorganização do genoma, alterações na expressão gênica, fragmentação de genes, conversão gênica e sub- e neofuncionalização de genes duplicados (RENNY-BYFIELD; WENDEL, 2014). Muitos desses processos têm sido associados a extensas e rápidas mudanças nos genomas dos poliploides em direção à sua diploidização e estabilidade (MALUSZYNKA; HASTEROK, 2005), tais como foram descritos para o milho (GAUT et al., 2000) e *Arabidopsis thaliana* (ERMOLAEVA et al., 2003). Nesse aspecto, é plausível que os genomas dos acessos tetraploides de *Urochloa* apresentem variações em relação ao dos diploides, decorrentes dos seus ajustes genômicos pós-poliploidização, como proposto por Nani et al. (2016).

Além disso, como já mencionado anteriormente, a identificação em nível de espécie no gênero *Urochloa* é feita a partir da morfologia floral e a evolução de caracteres

morfológicos não reflete necessariamente a evolução de caracteres moleculares (DOYLE; ENDRESS, 2000), logo a proximidade genética entre duas espécies pode ser mascarada por diferenças morfológicas entre elas e vice-versa. Também é válido ressaltar que os critérios taxonômicos utilizados para espécies de *Urochloa* não incluem caracteres citológicos, como nível de ploidia, ou modo de reprodução (sexual e apomítica). Nesse sentido, entende-se que *U. decumbens* 2x e *U. brizantha* 4x possuam uma maior proporção de regiões repetitivas homólogas entre si do que em relação à *U. decumbens* 4x e que a classificação morfológica não é capaz de refletir essa proximidade genética, alocando-as em táxons distintos.

A hibridização parcial ou completa do DNA genômico de *U. brizantha* 2x e *U. decumbens* (2x) em parte dos cromossomos de *U. brizantha* 4x e *U. decumbens* 4x evidencia alta homologia cromossômica. No entanto, há que se considerar algumas diferenças no padrão de marcas de hibridização nos cromossomos que sugerem uma afinidade levemente maior com o genoma de *U. brizantha* 2x em relação a *U. decumbens* 2x para essas duas cultivares tetraploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*. Essas pequenas diferenças são consistentes com a análise da proporção de hibridização nos cromossomos/genomas entre os dois acessos diploides que conservam alto grau de homologia. No entanto, não se exclui a possibilidade de que *U. decumbens* 2x também possa ser doadora de um dos genomas parentais das tetraploides *U. brizantha* e de *U. decumbens*. Deste modo, para fins de discriminá-los, nossas análises sugerem que *U. brizantha* diploide apresenta constituição genômica B<sup>1</sup>B<sup>1</sup> e *U. decumbens* diploide, B<sup>1'</sup>B<sup>1'</sup>. Assim, considerando a proposta de Paula *et al.* (2017), que definiu a constituição genômica de *U. brizantha* 4x e *U. decumbens* 4x como BBB<sup>1</sup>B<sup>1</sup> e B<sup>1</sup>B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>, respectivamente, os resultados apresentados no presente estudo indicam que os cromossomos marcados completamente ou com sinais GISH+ até as regiões intersticiais pertenceriam ao genoma B<sup>1</sup>B<sup>1</sup> ou B<sup>1'</sup>B<sup>1'</sup>. A composição genômica das espécies tetraploides é complementada pela confirmação das análises da GISH comparativa de *U. brizantha* (2x) e *U. decumbens* (2x) com *U. ruziziensis* (2x) que evidenciaram a afinidade genômica e a homeologia dos genomas B<sup>1</sup> e B<sup>1'</sup> com o genoma B<sup>2</sup> de *U. ruziziensis*.

Considerando esse cenário, é possível que os cromossomos e respectivos genomas das espécies diploides tenham sofrido modificações/rearranjos estruturais ao longo do processo evolutivo. Uma das evidências de que isso deva ter ocorrido está na variação do conteúdo de DNA entre ambas. Entretanto, são necessários outros estudos, incluindo análises cariotípicas e de DNA repetitivo e filogenias, que investiguem o tempo de divergência dos acessos diploides e tetraploides para confirmar a origem dos genomas de *Urochloa*. Pessoa-Filho *et al.* (2017) observaram alta similaridade genética e relativamente baixo tempo de divergência (~1.6 milhões de anos) entre as tetraploides *U. brizantha* e *U. decumbens* e apontaram que provavelmente um único evento de poliploidização ocorreu para estabelecer essas linhagens, mas não foram incluídos acessos diploides dessas espécies nas análises realizadas.

#### 5.4 Análise integrada das relações genômicas

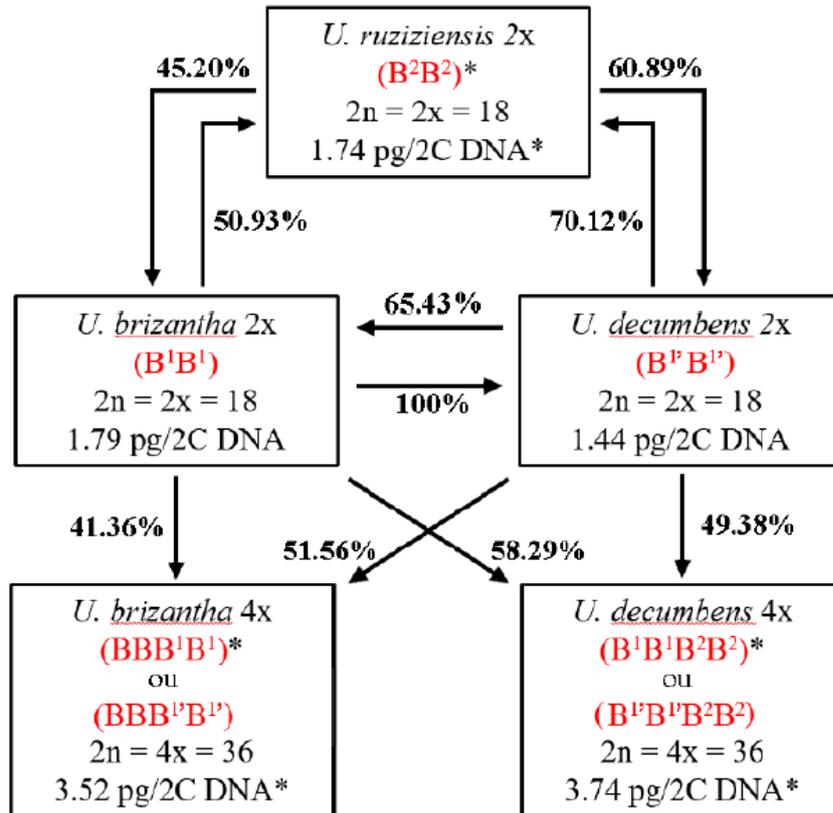
A recente determinação dos genomas B, B<sup>1</sup> e B<sup>2</sup> para *Urochloa* elucidou algumas das questões sobre a alopoliploidia presente no complexo agâmico formado por *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*. Paula *et al.* (2017) indicaram que *U. ruziziensis* diploide é portadora do genoma B<sup>2</sup>, podendo-se supor que ela pode ter contribuído na composição genômica de *U. decumbens* 4x. O mesmo já havia sido sugerido por Basappa *et al.* (1987), baseado em caracteres morfológicos e número cromossômico. O presente estudo trouxe novos elementos que apontam para a origem do genoma B<sup>1</sup> ou B<sup>1'</sup> envolvendo os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*. No entanto, a ancestralidade do genoma B, presente na tetraploide *U. brizantha* (genoma BBB<sup>1</sup>B<sup>1</sup>), permanece desconhecida. Futuros estudos genômicos utilizando a GISH devem investigar a origem do genoma B, considerando outros acessos diploides identificados para *Urochloa*.

Um série de características, tais como: i) as diferenças entre os genomas dos acessos diploides e tetraploides de *U. brizantha* e *U. decumbens*; ii) a confirmação da alopoliploidia segmental para *U. brizantha* 4x e *U. decumbens* 4x; iii) o comportamento meiótico observado nas espécies tetraploides e híbridos interespecíficos; iv) a restrição do fluxo gênico entre diploides e tetraploides e as diferenças no modo de reprodução (diploides – sexuais e

tetraploides – apomíticas) são evidências importantes para considerar tanto *U. brizantha* 2x e 4x quanto *U. decumbens* 2x e 4x como táxons distintos, fazendo-se necessária uma revisão taxonômica para o grupo.

Um resumo das inter-relações entre os acessos de *Urochloa* avaliados, incluindo número cromossômico, tamanho do genoma e proporção de hibridização da GISH está apresentado na figura 5.

**Figura 5:** Esquema de inter-relações entre espécies de *Urochloa* mostrando porcentagem de hibridização, número cromossômico, tamanho do genoma e composição genômica em *U. brizantha*, *U. decumbens* e *U. ruziziensis*.



Fonte: do autor. (\*) Dados obtidos por Paula *et al* (2017).

## 6 CONCLUSÕES

Os acessos diploides de *U. brizantha* e *U. decumbens* apresentaram número cromossômico e quantidade de DNA nuclear conforme o esperado a partir dos acessos tetraploides, sendo o maior genoma pertencente à *U. brizantha*.

Com base nos resultados da GISH, os acessos diploides de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* apresentam constituição genômica B<sup>1</sup>B<sup>1</sup> e B<sup>1</sup>'B<sup>1</sup>', havendo uma maior diversidade de sequências no genoma de *U. brizantha*.

Os acessos diploides *U. brizantha* e *U. decumbens* são potenciais ancestrais dos alotetraploides, que apresentam o genoma B<sup>1</sup> ou B<sup>1</sup>' em sua composição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Relatório de Exportações Brasileiras de Carne Bovina. Associação Brasileira das Industrias Exportadoras de Carne Bovina, p. 1–20. Brasília, 2018.

AKIYAMA, Yukio; YAMADA-AKIYAMA, Hitomi; EBINA, Masumi. Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. *Grassland Science*, v. 56, n. 4, p. 217–223. Nasushiobara, 2010.

ALVIM, Maurílio José; BOTREL, Milton de Andrade; XAVIER, Deise Ferreira. As principais espécies de *Brachiaria* utilizadas no País. *Embrapa gado de Leite*, p. 3–6. Juíz de Fora, 2002.

AMBIEL, Ana Claudia et al. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *brachiaria* por RAPD. *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 30, n. 4, p. 457–464. Viçosa, 2008.

AMBIEL, Ana Claudia et al. *Brachiaria* germplasm dissimilarity as shown by RAPD markers. *Crop breeding and applied biotechnology*, v. 10, p. 55–64. Viçosa, 2010.

ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. et al. Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.*, v. 79, p. 721–728. Norwich, 1990.

ASSIS, G. M. L. et al. Genetic divergence in *Brachiaria* species. *Crop breeding and applied biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 331–338. Campo Grande, 2002.

AZEVEDO, A L S et al. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, n. 4, p. 3530–3538. Juiz de Fora, 2011.

BARTLETT, J. M. S. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Blood Reviews*, v. 7, n. 2, p. 127–134. Totowa, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327>>.

BASAPPA, G P; MUNIYAMMA, M; CHINNAPPA, C C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. *Canadian Journal of Botany*, v. 65, p. 2297–2309. Calgary, 1987.

BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E. Evolutionary dynamics and chromosomal distribution of repetitive sequences on chromosomes of *Aegilops speltoides* revealed by genomic in situ hybridization. *Heredity*, v. 86, n. 6, p. 738–742. Haifa, 2001.

BENABDELMOUNA, A et al. Genomic in situ hybridization (GISH) discriminates between

the A and the B genomes in diploid and tetraploid *Setaria* species. *Genome*, v. 44, p. 685–690. Dijon, 2001.

BENNETZEN, Jeffrey L.; MA, Jianxin; DEVOS, Katrien M. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 127–132. Athens, 2005.

BISCOTTI, Maria Assunta; OLMO, Ettore; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, v. 23, n. 3, p. 415–420. Arcona, 2015.

BOLDRINI, Kellen Regina et al. Meiotic behavior as a selection tool in the breeding of *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Euphytica*, v. 182, n. 3, p. 317–324. Maringá, 2011.

CAO, Mingshu et al. Genomic in situ hybridization ( GISH ) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. *Genome*, v. 43, p. 398–403. Michigan, 2000.

CLAYTON, W. D. et al. World Checklist of Poaceae, Facilitated by Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://wmsp.science.kew.org/>>. Acesso em: 18 out. London, 2018.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. *Genera Graminum. Grasses of the World*. Development, v. 13, n. 87, p. 389. London, 1986.

DOBIGNY, Gauthie. Cytogenetics and Cladistics. *Systematic Biology*, v. 53, n. 3, p. 470–484. Paris, 2004. Disponível em: <<http://sysbio.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1080/10635150490445698>>.

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

DOYLE, James A.; ENDRESS, Peter K. Morphological Phylogenetic Analysis of Basal Angiosperms: Comparison and Combination with Molecular Data. *International Journal of Plant Sciences*, v. 161, n. 6, p. 121–153. New York, 2000.

EMBRAPA. *Brachiaria - BRS RB 331 Ipyorã*. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/4048/brachiaria--brs-rb-331-ipyora>> Campo Grande, 2017.

ERMOLAEVA, MD et al. The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Molecular Biology*, v. 51, p. 859–866. Rockville, 2003.

FERREIRA, Rebecca C U et al. Microsatellite loci for *Urochloa decumbens* Stapf) R.D. Webster and cross-amplification in other *Urochloa* species. *BMC Research Notes*, v. 9, n. 1, p. 152. Londrina, 2016.

FLAVELL, R. B. et al. Molecular organization of genes and repeats in the large cereal genomes and implications for the isolation of genes by chromosome walking. *Chromosomes today*, p. 199–213. Norwich, 1993.

GAUT, BS et al. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 7008–7015. Irvine, 2000.

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

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems*, v. 146, n. 3, p. 703–710. Pernambuco, 2012. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263504.2012.717973>.

HAND, Melanie L; KOLTUNOW, Anna M G. The Genetic Control of Apomixis : Asexual Seed Formation. *Genetics*, v. 197, p. 441–450. Osmond, 2014.

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

IBGE. Censo Agropecuário. Ministério do Planejamento, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília, 2017.

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

ISHIGAKI, Genki et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multiplo-shoot clumps and seedlings. *Grassland Science*, v. 55, p. 164–170. Miyazaki, 2009.

JANK, Liana et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. *Crop and Pasture Science*, v. 65, p. 1132–1137. Campo Grande, 2014.

JENKINS, G et al. Prospects for functional Genomics in a new model grass. *Plant Functional Genomics*. London, 2004.

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, p. 698–709. Campinas, 2010.

KOPECKÝ, D. et al. Chromosome pairing of individual genomes in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), its progenitors, and hybrids with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 124, p. 170–178. Olomouc, 2009.

- LEITCH, I. J. et al. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany*, v. 95, n. 1, p. 207–217. Weinheim, 2005.
- LI, CB et al. Identification of genome constitution of *Oryza malampuzhaensis*, *O. minuta*, and *O. punctata* by multicolour genomic in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 103, p. 204–211. New York, 2001.
- LING, Hong Qing et al. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature*, v. 496, n. 7443, p. 87–90. London, 2013.
- LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, Manuel A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Repetitive DNA*, v. 7, p. 1–28. Olomouc, 2012.
- LUTTS, S; NDIKUMANA, J; LOUANT, B. P. Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic behavior, pollen viability and seed set. *Euphytica*, v. 57, p. 267–274. Louvain, 1991.
- MAASS, B L. Identifying and naming *Brachiaria* species. In: MILES, J. W.; VALLE, C. B. (Org.). *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. [S.l: s.n.]. New York, 2004. p. ix–xii.
- MAJKA, Joanna et al. Similarities and differences in the nuclear genome organization within Pooideae species revealed by comparative genomic in situ hybridization (GISH). *Journal of Applied Genetics*, v. 58, n. 2, p. 151–161. Poznan, 2017.
- MALUSZYNSKA, J.; HASTEROK, R. Identification of individual chromosomes and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 109, n. 1–3, p. 310–314. Katowice, 2005.
- MENDES-BONATO, Andrea Beatriz; PAGLIARINI, Maria Suely; et al. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Euphytica*, v. 125, p. 419–425. Maringá, 2002a.
- MENDES-BONATO, Andrea Beatriz et al. Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). *Genetics and Mole*, v. 29, n. 4, p. 711–714. Maringá, 2006a.
- MENDES-BONATO, Andrea Beatriz et al. Meiotic instability in invader plants of signal grass *Brachiaria decumbens* Stapf (Gramineae). *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 619–625. Maringá, 2001.
- MENDES-BONATO, Andrea Beatriz; JUNQUEIRA FILHO, Roberto Gargione; et al. Unusual cytological patterns fo microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biology*

International, v. 26, n. 7, p. 641–646. Maringá, 2002b.

MENDES-BONATO, Andrea Beatriz; PAGLIARINI, Maria Suely; VALLE, Cacilda Borges. Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 122–125. Maringá, 2006b.

MENDES, Daniela Vieira et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 150, p. 441–446. Maringá, 2006.

MILES, J. W. et al. *Brachiaria* grasses. Warm-season (C4) grasses. [S.l.: s.n.]. p. 1–9. London, 2004.

MORRONE, Osvaldo; ZULOAGA, Fernando O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los generos *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Darwiniana*, v. 31, n. 1/4, p. 43–109. San Isidro, 1992.

NANI, Thaís Furtado et al. Physical map of repetitive DNA sites in *Brachiaria* spp.: Intravarietal and interspecific polymorphisms. *Crop Science*, v. 56, n. 4, p. 1769–1783. Madison, 2016.

NDIKUMANA, J. Etude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre *Brachiaria*. Université Catholique de Louvain, p. 134-146. Belgium, 1985.

NIELEN, Stephan et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. *Sexual Plant Reproduction*, v. 23, n. 1, p. 45–51. Madison, 2009.

PAULA, Cristina Maria Pinto De; SOUZA SOBRINHO, Fausto; TECHIO, Vânia Helena. Chromosomal distribution of H3K4me2, H3K9me2 and 5-methylcytosine: variations associated with polyploidy and hybridization in *Brachiaria* (Poaceae). *Plant Cell Reports*, n. 6, p. 1359–1369. Madison, 2016.

PAULA, Cristina Maria Pinto De; SOUZA SOBRINHO, Fausto; TECHIO, Vânia Helena. Genomic constitution and relationship in *Urochloa* (Poaceae) species and hybrids. *Crop Science*, v. 57, n. 5, p. 2605–2616. Madison, 2017.

PENTEADO, Maria Isabel de Oliveira et al. Determinação de poliploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies de gênero *Brachiaria*. *Boletim de Pesquisa Embrapa*, v. 11. Campo Grande, 2000.

PEREIRA, Roselaine Cristina et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. *Ciência Rural*, v. 42, n. 7, p. 1278–

1285. Campo grande, 2012. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782012000700023&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700023&lng=pt&tlng=pt)>.
- PESSOA-FILHO, Marco; MARTINS, Alexandre Magalhães; FERREIRA, Márcio Elias. Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 516. London, 2017.
- PINHEIRO, A. A. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. *Plant Cell Report*, v. 18, n. 3, p. 274–278. London, 2000.
- RENNY-BYFIELD, Simon; WENDEL, Jonathan F. Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany*, v. 101, n. 10, p. 1711–1725. New York, 2014.
- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. B.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. *Brachiaria: biology, agronomy and improvement*. [S.l: s.n.], p. 1–15. Madrid, 1996.
- RICCI, Gleia Cristina L et al. Chromosome numbers and meiotic analysis in the pre-breeding of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Indian Academy of Sciences*, v. 90, n. 2, p. 289–294. Maringá, 2011.
- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research*, v. 5, n. 4, p. 837–845. Campo Grande, 2006.
- ROA, Fernando; GUERRA, Marcelo. Non-Random Distribution of 5S rDNA Sites and Its Association with 45S rDNA in Plant Chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 146, n. 3, p. 243–249. Campo Grande, 2015. Disponível em:  
<<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000440930>>.
- SALARIATO, Diego 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. London, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.02.009>>.
- SALINA, Elena A. et al. Isolation and sequence analysis of the wheat B genome subtelomeric DNA. *BMC Genomics*, v. 10, n. 1, p. 414. Oxford, 2009.
- SCHNABLE, Patrick S. et al. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science*, v. 326, n. 5956, p. 1112–1115. New York, 2009.
- SCHWARZACHER, Trude. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome*, v. 43, n. 6, p. 953–962. Olomouc, 2003.

- SHARMA, A. K.; KOUR, S. Chromosome number reports LXIX. *Taxon*, v. 06, n. 5, p. 861–872. Paris, 1980.
- SHARMA, M. L.; SHARMA, K. Cytological Studies in the North Indian Grasses. *Cytologia*, v. 44, p. 861–872. Madrid, 1979.
- SILVA, G S; SOUZA, M M. Genomic in situ hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n. 3, p. 2953–2965. Ribeirão preto, 2013.
- SIMIONI, Carine; VALLE, Cacilda Borges. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A . Rich .) Stapf allows intraspecific crosses. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 9, p. 328–334. Viçosa, 2015.
- SMARDA, Petr; BURES, Petr. Understanding intraspecific variation in genome size in plants Co víme o vnitrodruhové variabilitě velikosti genomu u rostlin. v. 82, p. 41–61. *Preslia*, 2010.
- SOUZA SOBRINHO, Fausto. Melhoramento de gramíneas forrageiras na EMBRAPA Gado de Leite. *Simpósio de Forragicultura e Pastagens*. [S.l: s.n.]. p. 98–111. Juiz de Fora, 2009
- SPIES, J.J et al. Basic chromosome numbers and polyploid levels in some South African and Australian grasses (Poaceae). *Bothalia*, v. 21, n. 2, p. 163–170. Cape Town, 1991.
- SWENNE, A; LOUANT, B. P; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminee). *Agronomie Tropicale*, v. 36, p. 114–134. Paris, 1981.
- TIMBO, Ana Luiza de Oliveira et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. Viçosa, v. 43, n. 3, p. 127–131, 2014.
- TIMBÓ, Ana Luiza de Oliveira et al. Nuclear DNA content and chromosome numbereira in *Brachiaria* spp. genotypes. *Revista Ciencia Agronomica*. v. 45, n. 1, p. 62–67. Fortaleza, 2014.
- TORRES GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. London, v. 37, n. 1, p. 36–44, 2005.
- TRIVIÑO, Narda Jimena et al. Genetic Diversity and Population Structure of *Brachiaria* Species and Breeding Populations. *Crop Science*, v. 57, n. 5, p. 2633–2644. Madison, 2017.
- VALLE, C. B.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Melhoramento genético de *Brachiaria*. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. [S.l: s.n.]. New York, 2009. v. 56. p. 460–472. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226808013>>.
- VALLE, C. B.; SINGH, R. J; MILLER, D. A. Pachytene Chromosomes of *Brachiaria*

ruzizensis Germain et Evrard. *Plant Breeding*, v. 98, p. 75–78. Berlin, 1987.

VALLE, Cacilda Borges; PAGLIARINI, Maria Suely. *Biology, Cytogenetics, and Breeding of Brachiaria. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement*. [S.l: s.n.]. v. 2. p. 103–143. London, 2009

VELDKAMP, J. F. *Miscellaneous notes on mainly Southeast Asian Gramineae*. *Reinwardtia*, v. 12, p. 135–140. Jakarta, 2004.

WATSON, J. Matthew; RIHA, Karel. *Comparative biology of telomeres: Where plants stand*. *FEBS Letters*, v. 584, n. 17, p. 3752–3759. Wincosin, 2010.

YU, Yan et al. *Karyotype Software*. *Taxon*. v. 65. p. 586-592. Olomouc, 2016.

ZHAO, Meicheng et al. *Novel genomes and genome constitutions identified by GISH and 5S rDNA and knotted1 genomic sequences in the genus Setaria*. *BMC Genomics*, v. 14, n. 244. Madison, 2013.