



ISABELLA DE CAMPOS MORAES

**CARACTERIZAÇÃO DA ANEUPLOIDIA EM HÍBRIDO
ENTRE *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. &Evrard) Crins E
Urochloa decumbens (Stapf) R. D. Webster**

LAVRAS – MG

2018

ISABELLA DE CAMPOS MORAES

**CARACTERIZAÇÃO DA ANEUPLOIDIA EM HÍBRIDO ENTRE *Urochloa ruziziensis*
(R. Germ. &Evrard) Crins E *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster**

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

Prof^ª Dr^ª Vânia Helena Techio
Orientadora

Dr. Fausto de Souza Sobrinho
Coorientador

LAVRAS – MG

2018

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

Moraes, Isabella de Campos.

Caracterização da aneuploidia em híbrido entre *Urochloa
ruziziensis* (R. Germ.&Evrard) Crins e *Urochloa decumbens* (Stapf)
R. D. Webster / Isabella de Castro Moraes. - 2018.
43 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Fausto de Souza Sobrinho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Brachiaria. 2. Trissomia. 3. Bandamento cromossômico. I.
Techio, Vânia Helena. II. Sobrinho, Fausto de Souza. III. Título.

ISABELLA DE CAMPOS MORAES

**CARACTERIZAÇÃO DA ANEUPLOIDIA EM HÍBRIDO ENTRE *Urochloa ruziziensis*
(R. Germ. &Evrard) Crins E *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster**

**CHARACTERIZATION OF ANEUPLOIDY IN HYBRID BETWEEN *Urochloa*
ruziziensis (R. Germ. &Evrard) Crins AND *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster**

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

Aprovada em 13 de julho de 2018.

Profª Drª Ana Emília Barros e Silva UFPB

Profª Drª Giovana Augusta Torres UFPA

Profª Drª Vânia Helena Techio
Orientadora

Dr. Fausto de Souza Sobrinho
Coorientador

LAVRAS – MG

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu saúde e determinação para a realização de mais um sonho.

À Universidade Federal de Lavras, lugar que tanto estimo, pela oportunidade em realizar mais uma etapa da minha formação acadêmica em um ambiente sólido e de qualidade.

Ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas pela disponibilidade de recursos. Agradeço também aos professores e profissionais do programa, pela partilha dos conhecimentos e ensinamentos.

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

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

À Vânia, pessoa que tive o privilégio de ter como orientadora. Obrigada por acreditar no meu trabalho, me propor desafios e me proporcionar imenso crescimento.

À professora Lisete, que me apresentou a citogenética, e à professora Giovanna, pelos ensinamentos e contribuições.

Não poderia deixar de agradecer à Gabi, minha mãe científica da graduação, obrigada por todo o conhecimento transmitido e por me mostrar a beleza da citogenética.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética, por tornarem nossos dias de laboratório mais agradáveis. Em especial à Yasmim, Ana Luiza, Marco Túlio, Caio, Laiane, Alex, Cris, Ana Gabriela, Mara Jane, Thaíse, Raquel e Gleicy, obrigada por todos os momentos juntos e por compartilharem do amor pelo nosso trabalho.

Ao Gabriel, pelas ótimas lâminas e pelo auxílio na conclusão desse estudo.

Às amigas maravilhosas que o curso de Biologia me presenteou, Thaísa, Nat, Gi e Thaís. Mesmo seguindo caminhos diferentes, sei que estamos torcendo umas pelas outras. Guardo vocês no coração!

Obrigada também à República ardidada, família que me acolheu em Lavras durante a graduação. À Maraca, Mestre, Fadiga e às outras meninas com quem não tive a oportunidade de conviver tanto. Um espacinho especial merece a minha amiga Trapaia, que está deixando Lavras para trilhar um belo caminho, obrigada por sempre me escutar, me aconselhar e, acima de tudo, por se fazer presente.

Aos meus pais, Marcelo e Márcia, fonte de toda a minha inspiração. Obrigada por todo o amor e apoio. Vocês são meus maiores exemplos na vida. É graças a vocês que eu cheguei até aqui e também é por vocês que quero continuar crescendo.

Ao meu irmão Caio, pela amizade e amor, pelos conselhos e pelo incentivo de sempre.

À minha querida, amada e linda irmã Giovanna, por “entender” minha ausência e, mesmo assim, sempre me querer por perto. Te amo!

Também gostaria de agradecer às minhas avós, Aracy e Aparecida, por todo carinho e vivência.

Por fim, ao meu grande amor, Camilo Antônio. Obrigada por ser esse parceiro incrível, por apoiar minhas escolhas e estar ao meu lado em todos os momentos. Sei que a distância por mais alguns anos vai ser difícil, mas a gente tira de letra.

RESUMO

O gênero *Urochloa* destaca-se por englobar forrageiras de grande importância para a agropecuária. Em trabalhos recentes, híbridos interespecíficos aneuploides foram encontrados em cruzamentos envolvendo genótipos de *Urochloa ruziziensis* (tetraploidizada artificialmente) com *Urochloa decumbens* e *Urochloa brizantha*. Nos vegetais, a aneuploidia desempenha um importante recurso para o mapeamento genético e estudos de dosagem gênica. O objetivo do presente estudo foi caracterizar o tipo de aneuploidia presente no híbrido H963 e confirmar a procedência dos cromossomos adicionais por meio da análise comparativa dos cariótipos do híbrido e dos parentais *U. ruziziensis* e *U. decumbens*. Meristemas radiculares foram coletados, pré-tratados e fixados para a obtenção de C-metáfases. As lâminas foram preparadas através da técnica de dissociação de células e secagem ao ar. Técnicas de bandamento C e CMA/DAPI foram empregadas para a diferenciação dos cromossomos. Para os genótipos parentais foram confirmados 36 cromossomos. O híbrido interespecífico apresentou plantas com $2n=4x=36+2$ cromossomos e plantas $36+1$ cromossomos. Bandas C foram identificadas na região pericentromérica dos cromossomos de todos os genótipos avaliados. O genótipo tetraploidizado de *U. ruziziensis* apresentou quatro bandas CMA e C em posição terminal nos cromossomos. Em *U. decumbens*, quatro cromossomos apresentaram bandas CMA terminais e oito cromossomos foram discriminados pelo bandamento C com bandas terminais. Para o híbrido H963, bandas CMA foram encontradas em cinco cromossomos e bandas C em posição terminal em sete cromossomos. O padrão de bandas obtido associado aos dados morfométricos dos cromossomos permitiram identificar os cromossomos adicionais presente no híbrido. Foi identificada uma trissomia nos pares 3' e 4' nas plantas híbridas com $36+2$, caracterizando a aneuploidia como trissomia dupla. O cariótipo das plantas híbridas com $36+1$ cromossomos indicou a eliminação do cromossomo adicional identificado no par 4' e a persistência da trissomia no par 3'. A análise comparativa dos cariótipos, obtidos por técnicas de bandamento e morfometria cromossômica, indicam que os cromossomos adicionais que caracterizam a trissomia foram herdados do parental *U. ruziziensis* (autotetraploidizado artificialmente). Um padrão comum em grande parte das angiospermas, relacionado à distribuição das bandas heterocromáticas, foi observado para os genótipos avaliados.

Palavras-chave: *Brachiaria*. Trissomia. Cariótipo. Bandamento cromossômico.

ABSTRACT

Urochloa is a genus known for comprehending grasses of great importance for crop and livestock production. In recent studies, aneuploid interspecific hybrids were found in crossings between the species *Urochloa ruziziensis* (artificial tetraploid) with *Urochloa decumbens* and *Urochloa brizantha*. In plants, aneuploidy represents an important asset for genetic mapping and gene dosage studies. The aim of the present study is to characterize the aneuploidy in the Hybrid H963 and to confirm the origin of the additional chromosomes via comparative analysis of the hybrid's and its parents' karyotypes. Root tips were pretreated and fixed in methanol:acetic acid (3:1) in order to obtain C-metaphases. Slides were prepared using cell dissociation technique and air dried. C-Banding and CMA/DAPI techniques were performed for a better chromosome sorting. The parental genotypes were confirmed with 36 chromosomes. The interspecific hybrid presented individuals with $2n=4x=36+2$ and $2n=4x=36+1$ chromosomes. C-bands were found on the chromosomes' pericentromeric region in all assessed genotypes. The tetraploid genotype of *U. ruziziensis* presented four CMA and C-bands, all located on the chromosome's terminal region. *Urochloa decumbens* presented four chromosomes with terminal CMA-bands and eight chromosomes with terminal C-bands. The H963 hybrid presented terminal CMA bands in five chromosomes and terminal C-bands in seven chromosomes. The banding pattern and the morphometric data allowed the identification of the hybrid's additional chromosomes. A trisomy was identified in the pairs 3' and 4' of the hybrids with $36+2$ chromosomes, which characterizes the aneuploidy as a double trisomy. The karyotype of the hybrids with $36+1$ chromosomes pointed to the elimination of the additional chromosome previously identified in the pair 4' and the persistency of the pair 3' trisomy. The karyotype comparative analysis indicates that the additional chromosomes characterizing the trisomy were inherited from the parent *U. ruziziensis* (artificial autotetraploid). A common pattern in many angiosperms, regarding the distribution of heterochromatic bands, was observed in the assessed genotypes.

Keywords: *Brachiaria*. Trisomy. Karyotype. Chromosome banding.

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 Importância econômica, caracterização geral e citogenética de <i>Urochloa</i>	9
2.2 A importância dos aneuploides para os estudos citogenéticos e o melhoramento genético	13
2.3 Identificação citogenética de cromossomos adicionais	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Local	18
3.2 Material vegetal	18
3.3 Preparo das lâminas	18
3.4 Bandamento CMA/DAPI.....	19
3.5 Bandamento C.....	19
3.6 Morfometria cromossômica	20
4 RESULTADOS	21
5 DISCUSSÃO.....	29
5.1 Análise cariotípica comparativa entre parentais e híbrido (<i>U. ruziziensis</i> x <i>U. decumbens</i>)	29
5.2 Distribuição da heterocromatina em espécies e híbridos de <i>Urochloa</i>	33
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

As espécies do gênero *Urochloa* P. Beauv. (sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) são amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, com grande concentração na África, região considerada como seu centro de origem (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). *Urochloa* engloba espécies forrageiras de grande importância para a agropecuária em países de clima tropical, sendo o gênero mais cultivado no Brasil (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006). Os limites taxonômicos entre *Brachiaria* e *Urochloa* ainda não estão completamente estabelecidos e uma nova nomenclatura tem sido sugerida para algumas espécies de *Brachiaria*, incluindo-as no gênero *Urochloa* (NGUYEN, 1966; WEBSTER, 1987; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VELDKAMP, 1996; 2004; TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005; SALARIATO et al., 2010). Portanto, *Brachiaria* e *Urochloa* serão utilizadas como sinônimos nesse estudo.

Quanto à citogenética, existem relatos para o número básico cromossômico de $x=6, 7, 8, 9$ e 10 , mas $x=9$ é o que predomina entre as espécies do gênero (DARLINGTON; WYLIE, 1955; CHRISTOPHER; ABRAHAM, 1976; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006). Espécies com $2n=14$ a $2n=90$ cromossomos já foram relatadas por Valle e Pagliarini (2009) e níveis de diploide a decaploide, com variação intra e interespecíficas e tendência a tetraploidia para a maioria das espécies descritas (PENTEADO et al., 2000). As plantas poliploides geralmente caracterizam-se por serem apomíticas, enquanto que as diploides são, predominantemente, sexuais (VALLE; SAVIDAN, 1996; VALLE; PAGLIARINI, 2009). As espécies consideradas de maior interesse econômico são *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (sin. *Brachiaria decumbens* Stapf), *Urochloa brizantha* (Hocst. ex. A. Rich.) R. D. Webster (sin. *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich)), *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (sin. *Brachiaria humidicola* Rendle) e *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & Evrard) Crins (sin. *Brachiaria ruziziensis* (R. Germ & Evrard)).

Uma das estratégias do melhoramento é a realização de cruzamentos interespecíficos (SOUZA SOBRINHO, 2005; VALLE; PAGLIARINI, 2009), com o objetivo de obter híbridos persistentes que reúnam características desejáveis dos genitores (PEREIRA et al., 2001). Uma vez que os acessos de *U. decumbens* e *U. brizantha* são, em sua maioria, apomíticos, os melhoristas têm envolvido *U. ruziziensis* como genitor feminino nos cruzamentos. Para viabilizar esses cruzamentos, utilizam-se genótipos autotetraploidizados artificialmente (SWENNE et al., 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014).

Em trabalhos recentes, Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017) identificaram híbridos que apresentam dois cromossomos adicionais ($2n=4x=36+2$ cromossomos). No híbrido 963, proveniente do cruzamento entre *U. ruziziensis* (tetraploidizada artificialmente, $2n=4x=36$) x *U. decumbens* ($2n=4x=36$), esses autores observaram, por meio da GISH, dois cromossomos inteiramente marcados com a sonda de DNA genômico de *U. ruziziensis*, que podem representar os cromossomos excedentes observados. A hipótese de que estes dois cromossomos sejam provenientes do parental *U. ruziziensis* é reforçada por outros argumentos: o envolvimento do genótipo em outro cruzamento que também gerou um híbrido aneuploide e a sua origem autoploidice (TIMBÓ et al., 2014). Apesar das evidências, é importante confirmar a procedência dos cromossomos adicionais e caracterizá-los por meio de outras marcas genéticas e citogenéticas.

Esses híbridos aneuploides podem ser importantes em programas de melhoramento de *Urochloa*, pois são importantes materiais para estudos sobre a composição gênica e herança de diferentes cromossomos. Nesse sentido, a identificação confiável dos cromossomos é de extrema importância. Para tal, o campo da citogenética oferece técnicas eficientes na caracterização cromossômica e determinação da identidade dos cromossomos adicionais, dentre as quais se destacam as técnicas de bandamento cromossômico. Nos vegetais, os bandamentos C e fluorescente com a combinação dos fluorocromos CMA (cromomicina A) e DAPI (4'6-diamino-2-phenylindol) são as técnicas comumente e eficientemente empregados para a diferenciação cromossômica (GUERRA, 2000).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o tipo de aneuploidia presente em um híbrido aneuploide (*U. ruziziensis* tetraploidizada x *U. decumbens*) e identificar a origem parental dos cromossomos adicionais, por meio da comparação dos cariótipos com marcas de bandas C e CMA/DAPI do híbrido e parentais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica, caracterização geral e citogenética de *Urochloa*

A pecuária é uma das atividades econômicas mais importantes do Brasil. Com um rebanho de 211,3 milhões de cabeças, o país ocupa a sexta posição na produção de leite do mundo, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2016). Em 2012, a produção de leite representou para o país o maior valor de produção dentre os produtos de origem animal (IBGE, 2012). Além disso, o Brasil também é considerado o segundo maior produtor mundial de carne bovina (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2016). As demandas por leite e carne crescem anualmente e, nesse sentido, as forrageiras possuem um importante papel na agropecuária, visto que inúmeras características forrageiras, como valor nutritivo e vigor de rebrota, entre outras propriedades, podem ser correlacionadas com a produção animal (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

Para formação de uma pastagem, a escolha da gramínea forrageira deve ser bastante criteriosa, visando obter variedades forrageiras com boa palatabilidade, adaptação às condições adversas, resistentes a doenças, mais produtivas e de melhor qualidade nutricional (PEREIRA et al., 2001, 2003). Dentre as espécies de forrageiras mais importantes economicamente destacam-se as do gênero *Urochloa* que, sem dúvidas, é o gênero mais cultivado no Brasil e em outras regiões tropicais (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

As gramíneas de *Urochloa* pertencem à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae e subtribo Melinidinae (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). Existe uma extensa discussão sobre os limites taxonômicos do gênero *Urochloa* (VELDKAMP, 2004). Muitas espécies agora incluídas em *Urochloa*, anteriormente eram consideradas como pertencentes ao gênero *Brachiaria*. Taxonomicamente, *Brachiaria* teve várias classificações (TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005). Foi descrita pela primeira vez por Trinius, em 1834, como uma subdivisão do gênero *Panicum*. Posteriormente foi elevada para a categoria de gênero por Grisebush, em 1853. Entretanto, vários autores questionaram a validade de classificá-la como gênero e realocaram quase todas as espécies que constituem o grupo para o gênero *Urochloa* (NGUYEN, 1966; WEBSTER, 1987; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VELDKAMP, 1996; 2004; TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005; SALARIATO et al., 2010).

As definições que separavam *Brachiaria* de *Urochloa* estavam relacionadas às espiguetas. Enquanto o primeiro grupo apresentaria espiguetas arranjadas em racemos unilaterais com a gluma inferior adjacente à ráquis, ou seja, na posição adaxial (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996), as espécies de *Urochloa* deveriam possuir espiguetas na orientação abaxial, com a primeira gluma oposta ao ráquis (CLAYTON; RENVOIZE, 1986). Entretanto, essa separação só funciona para espiguetas únicas nos ramos primários, quando as espiguetas estão pareadas, ambos os gêneros possuem orientação adaxial (WEBSTER, 1987; MORRONE; ZULOAGA, 1992). Além disso, essas características não são consistentes em todas as espécies e, muitas vezes, o real posicionamento das espiguetas é difícil de distinguir (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

Como atualmente entendido, *Urochloa* abrange aproximadamente 136 espécies (CLAYTON; HARMAN, 2008), amplamente distribuídas em países tropicais e subtropicais, com grande concentração na África, região considerada como seu centro de origem (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

A história de *Urochloa* no Brasil iniciou-se na época colonial, trazida involuntariamente em navios negreiros, pois era utilizada como leito para os escravos e, devido às condições de algumas regiões do Brasil semelhantes à África, sua disseminação foi favorecida (MITIDIERI, 1988). Como forrageira, a introdução oficial foi com o acesso de *U. decumbens* em 1952 e outras espécies foram introduzidas entre os anos de 1960 e 1970. A capacidade de adaptação aos solos ácidos e de baixa fertilidade, sobretudo nos cerrados brasileiros, resultou na ampla expansão do gênero (SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971).

Em relação ao número básico de cromossomos Darlington e Wylie (1955) determinaram $x=7$ e $x=9$, com predominância de $x=9$, embora existam relatos com $x=8$ e $x=10$ (CHRISTOPHER; ABRAHAM, 1976; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987). Adicionalmente, Risso-Pascotto, Pagliarini e Valle (2006) encontraram em *U. dictyoneura*, o número básico de $x=6$. Valle e Pagliarini (2009), através de uma revisão, relataram espécies com $2n=14$ a $2n=90$ cromossomos, níveis de ploidia com variação inter e intraespecífica, apresentando acessos diploides, tetraploides, pentaploides, hexaploides, heptaploides, octaploides e decaploides, com tendência à tetraploidia para a maioria das espécies (PENTEADO et al., 2000).

A poliploidia em *Urochloa* está intimamente relacionada com a apomixia, enquanto o modo de reprodução sexual é normalmente associado ao nível diploide (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Isso porque, plantas poliploides apresentam geralmente meiose

bastante irregular, levando a baixa fertilidade do pólen (NITTHAISONG et al., 2015). As plantas diploides, por sua vez, apresentam pareamento e divisão cromossômica regular, gerando pólenes viáveis (VALLE; SAVIDAN, 1996; VALLE; PAGLIARINI, 2009). A apomixia descrita para o gênero é do tipo apospórica, com o saco embrionário do tipo *Panicum* contendo quatro núcleos, enquanto que as plantas sexuais apresentam sacos embrionários do tipo *Polygonum*, com oito ou mais núcleos (VALLE; GLIENKE; LEGUISAMON, 1994).

Dentre as espécies do gênero mais exploradas e, conseqüentemente, de maior importância econômica, encontram-se *U. decumbens*, *U. brizantha*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis*. O melhoramento genético concentra-se nessas espécies através da avaliação e seleção de genótipos superiores, além de cruzamentos interespecíficos (SOUZA SOBRINHO, 2005; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Urochloa decumbens possui genótipos naturalmente diploides e tetraploides, com $2n=18$ e $2n=36$ cromossomos respectivamente (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009). *U. brizantha* inclui plantas com nível de ploidia variando de diploide a hexaploide e números cromossômicos iguais a 18, 36, 45 e 54 (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009). Para *U. humidicola*, Bernini e Marin-Morales (2001) encontraram $2n=4x=36$, $2n=7x=42$ e $2n=6x=54$. *U. ruziziensis* tem se mostrado tipicamente diploide com $2n=2x=18$ cromossomos (BERNINI; MARIN-MORALES, 2001), com representantes tetraploides obtidos por indução de duplicação cromossômica com colchicina (SWENNE et al., 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014).

A fim de fornecer subsídios para os programas de melhoramento e elucidar a taxonomia do gênero, inúmeros estudos buscaram determinar as relações filogenéticas entre as espécies através de análises morfológicas, citogenéticas ou moleculares (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; ADAMOWSKI; PAGLIARINI; VALLE, 2008; AMBIEL et al., 2008; 2010; SALARIATO et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011; NANI ET AL., 2016; PESSOA-FILHO; MARTINS; FERREIRA, 2017; TRIVIÑO et al., 2017). Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017) propuseram a constituição genômica de algumas espécies, em que *U. brizantha* foi caracterizada por ter genoma BBB_1B_1 , *U. decumbens* $B_1B_1B_2B_2$ e *U. ruziziensis* B_2B_2 . Os genomas B, B_1 e B_2 foram considerados homeólogos, com menor afinidade entre B e B_2 . Além disso, *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* tradicionalmente são consideradas por formarem um complexo agâmico, grupo que inclui

espécies diploides sexuais e poliploides apomíticos, reprodutivamente isoladas por níveis de ploidia e apomixia (VALLE; SAVIDAN, 1996; CARRILO et al., 2010).

Os cruzamentos que utilizam como parentais *U. decumbens* e *U. brizantha* poliploides são mais complexos pelo fato dessas espécies serem apomíticas. A fim de explorar a variabilidade genética, os melhoristas têm envolvido *U. ruziziensis*, que apresenta modo de reprodução sexual, como genitor feminino nos cruzamentos. Para tornar esse cruzamento possível, tendo em vista que *U. ruziziensis* é diploide, utilizam-se genótipos tetraploidizados artificialmente com colchicina (SWENNE et al., 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014).

Em análises com híbridos interespecíficos de *Urochloa*, Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017) identificaram dois cromossomos adicionais em um híbrido (acesso H963), proveniente do cruzamento entre *U. ruziziensis* tetraploidizada e *U. decumbens*. Nesse híbrido, todas as metáfases apresentaram $2n=4x=36 + 2$, o que representou um acréscimo de 0,29 pg de DNA em relação à média de DNA dos genitores (3,33pg). O híbrido também apresentou um sítio de rDNA 45S a mais que o esperado, considerando o número de sítios observado nas espécies parentais. Aplicando a técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH) no híbrido, os autores encontraram dois cromossomos completamente marcados com sonda de DNA genômico de *U. ruziziensis*, e sugeriram que estes podem representar os dois cromossomos adicionais. Um fator considerado por Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017) é o fato de que o genótipo de *U. ruziziensis*, utilizado como genitor feminino nos cruzamentos, foi obtido recentemente por indução de duplicação cromossômica com colchicina. A colchicina é uma substância que pode causar distúrbios na divisão celular, podendo levar à produção de gametas não balanceados na planta que foi submetida ao tratamento para indução de duplicação cromossômica. Esses gametas, após fertilização, podem dar origem a plantas aneuploides (SINGH, 2017).

Em outro híbrido (H10.6) proveniente do cruzamento entre *U. ruziziensis* tetraploidizada e *U. brizantha*, também foram observadas metáfases com $2n=4x=36+2$ cromossomos (PAULA, dados não publicados), corroborando a hipótese de que os dois cromossomos excedentes possam ter sido herdados do parental *U. ruziziensis*.

Esses híbridos podem ser importantes para programas de melhoramento de *Urochloa*, visto que a ocorrência de cromossomos extras pode representar um aumento na variabilidade e na base genética do gênero (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017).

2.2 A importância dos aneuploides para os estudos citogenéticos e o melhoramento genético

O termo aneuploidia refere-se a desvios de um ou mais cromossomos em relação ao genoma somático de cromossomos de um indivíduo, que podem ser adições ou subtrações de cromossomos inteiros e individuais, ou seja, representam mudanças no cariótipo que não são múltiplos exatos do complemento cromossômico da espécie (APPELS et al., 1998; TORRES; WILLIAMS; AMON, 2008; SHELTER; AMON, 2011). Como consequência, a aneuploidia envolve também desvios no conteúdo de DNA e ganho ou perda de informação genética (ESCUADERO et al., 2014).

Apesar da possibilidade de ocorrência em qualquer organismo eucarioto, a viabilidade de uma aneuploidia depende de vários fatores, incluindo o tipo de organismo, nível de ploidia, tipo de aneuploidia, qual o cromossomo afetado e *background* genético (APPELS et al., 1998). Em mamíferos, a adição ou perda de cromossomos tem efeitos graves e muitas vezes causam a letalidade no início do ciclo de vida, enquanto que em plantas esses acontecimentos podem ser mais tolerados, particularmente nos poliploides, pois produzem um menor desvio do genoma e assim resultam em efeitos fenotípicos menores (APPELS et al., 1998; BIRCHLER, 2013).

Quando um ou mais cromossomos estão ausentes no cariótipo normal, a aneuploidia corresponde ao tipo hipoploidia, enquanto que a hiperploidia caracteriza-se por apresentar um ou mais cromossomos adicionais ao cariótipo somático da espécie correspondente (SYBENGA, 1992). São inúmeras as subclassificações possíveis dentro de cada categoria e, em relação à hiperploidia, os cromossomos em adição são geralmente referenciados como trissômicos (SINGH, 2017).

O número de diferentes trissomias é teoricamente ilimitado e a classificação correta de uma planta hiperploide depende da análise crítica do observador (SYBENGA, 1992). Uma planta com cariótipo $2n = X + 2$ pode possuir tetrassomia, quando os dois cromossomos adicionais são homólogos e, em consequência, ela tem quatro doses de um cromossomo em comparação a duas doses dos outros cromossomos; ou então envolver alterações de dosagem em mais de um cromossomo, apresentando assim uma trissomia dupla, com uma dose extra de dois cromossomos não-homólogos (APPELS et al., 1998).

A principal fonte da hiperploidia é a não disjunção dos cromossomos durante a meiose, o que resulta em gametas desbalanceados ($n + 1$, $n + 2$, $n + 3$, ...). Quando esses

gametas são fecundados, originam-se plantas aneuploides ($2n + 1$, $2n + 2$, $2n + 3$, ...) (SINGH, 2017). As condições responsáveis pelas irregularidades meióticas e consequente formação de aneuploides são várias, dentre as quais se destacam: mutações nos genes que controlam o pareamento meiótico e a segregação (mutantes assinápticos e dessinápticos), cruzamentos entre espécies relacionadas e de diferentes níveis de ploidia, estresses ambientais, químicos inibidores ou perturbadores das fibras do fuso, entre outros (APPELS et al., 1998; SINGH, 2017).

Os cromossomos adicionais podem afetar várias características no desenvolvimento e na diferenciação durante todo o ciclo de vida do indivíduo, tanto externamente quanto internamente (APPELS et al., 1998; SHELTZER; AMON, 2011). As plantas possuem um *background* genético que permite o desenvolvimento e funcionamento normal do organismo. Entretanto, quando a dosagem gênica é alterada com a adição de cromossomos, o equilíbrio genético é afetado e, conseqüentemente, o indivíduo portador da trissomia apresentará traços característicos que o difere do indivíduo normal (BIRCHLER, 2013; SINGH, 2017). As diferenças podem ser morfológicas, anatômicas, citológicas, fisiológicas ou genéticas e o cromossomo adicional refletirá o conteúdo diferencial de genes (SINGH, 2017).

Desde sua descoberta, os aneuploides têm sido amplamente estudados geneticamente e, em relação às plantas, desempenham um importante recurso para o mapeamento genético e estudos em dosagem de genes (SYBENGA, 1992; APPELS et al., 1998; BIRCHLER, 2013; SINGH, 2017), além de consistirem em importantes ferramentas para futuras construções especiais (SYBENGA, 1992). Bridges (1921) foi o primeiro pesquisador a utilizar um indivíduo trissômico para determinar a ocorrência de um gene a um cromossomo específico em *Drosophila melanogaster*, desde então a associação de genes a grupos de ligação de cromossomos utilizando aneuploides tem sido realizada em vários organismos (SINGH, 2017).

Em Poaceae, os estudos se concentram nas espécies mais conhecidas citologicamente. No milho (*Zea mays*), Lee, Darrah e Coe (1996) identificaram regiões cromossômicas associadas a caracteres morfológicos e quantitativos através de indivíduos monossômicos e trissômicos. Os autores também verificaram que a perda de cromossomos na espécie é mais drástica que a adição de cromossomos, embora ambos tenham resultado na queda de vigor. Em *Triticum*, extensos conjuntos aneuploides foram produzidos, permitindo além da atribuição de genes a cromossomos específicos, inferências sobre a tendência de cada genoma gerar aneuploidias (SEARS, 1954; ZHANG et al., 2013). No arroz (*Oryza sativa*), o gene para

o aroma foi atribuído ao cromossomo oito em três variedades aromáticas a partir da análise de plantas trissômicas (DONG; TSUZUKI; TERAQ, 2001). Em *Setaria*, um gênero relativamente próximo de *Urochloa*, estudos envolvendo plantas trissômicas e tetrassômicas de *Setaria italica* (L.) Beauv. permitiram a identificação de genes responsáveis por características agrônômicas importantes e a localização dos mesmos nos cromossomos correspondentes (WANG et al., 2007).

2.3 Identificação citogenética de cromossomos adicionais

O sucesso no uso do germoplasma aneuploide para estudos genéticos depende da correta identificação do cromossomo adicional ou em falta no indivíduo portador da aneuploidia (JIANG et al., 2016). A caracterização cromossômica é de extrema importância e costumava ser uma tarefa muito difícil, mas que foi sendo aperfeiçoada e facilitada pelo desenvolvimento de técnicas específicas para diversas espécies na área vegetal (LUKASZEWSKI, 2015).

Apesar de as plantas com cromossomos adicionais geralmente diferirem morfológicamente das plantas normais, a confirmação só pode ser efetivada por meio de observações citológicas. A identificação de um número cromossômico inesperado é baseada primeiramente na contagem cromossômica e pode ser complementada pelo estudo das configurações meióticas e outras técnicas citogenéticas (SYBENGA, 1992; SINGH, 2017).

No monitoramento de cromossomos por meio do pareamento meiótico, os cromossomos adicionais podem apresentar diferentes comportamentos. Um tetrassômico pode formar um quadrivalente, um trivalente mais univalente ou dois bivalentes, e estas configurações podem resultar em uma variedade de tipos de gametas. No caso de trissomia dupla, cada trissômico pode formar configurações com um bivalente mais um univalente ou um trivalente. O univalente formado pode ser eliminado ou incluído nos gametas e o bivalente irá segregar normalmente, enquanto o trivalente pode se orientar de várias maneiras na metáfase-I (SYBENGA, 1992; APPELS et al., 1998; SINGH, 2017).

A verificação citológica e discriminação dos cromossomos em adição também podem ser feita pela análise do cariótipo, com a morfometria cromossômica (comprimento total, comprimento relativo, razão de braços) e presença de características estruturais específicas, tais como constrições secundárias ou outros marcadores citogenéticos (SYBENGA, 1992; SINGH, 2017). Entretanto, muitas espécies apresentam cromossomos morfológicamente

semelhantes, o que dificulta a simples análise do cariótipo para a identificação dos cromossomos (ZOSHCHUK; BADAIEVA; ZELENIN, 2003).

O campo da citogenética oferece inúmeras outras técnicas confiáveis para a caracterização cromossômica. As técnicas de bandamentos cromossômicos, desenvolvidas desde 1970 (CASPERSSON; ZECH; JOHANSSON, 1970), têm desempenhado papel importante na análise cromossômica, visto que facilitam a identificação de cromossomos individuais para a construção de cariótipos e detecção de cromossomos adicionais (ANDRAS et al., 2000; MOLNÁR-LÁNG; CEOLONI; DOLEŽEL, 2015). Não apenas os cromossomos e as regiões cromossômicas podem ser identificados através dos bandamentos, mas também as suas características estruturais e/ou citoquímicas podem ser determinadas (SUMNER, 1990).

Entre os bandamentos convencionais, a técnica de bandamento C é comumente o mais utilizado na área vegetal e considerado um marcador aceitável de segmentos cromossômicos específicos, pois revela um padrão diferenciado de bandas heterocromáticas ao longo do cromossomo, (SYBENGA, 1992; JELLEN, 2016; SINGH, 2017). A técnica foi desenvolvida acidentalmente em 1970, por Pardue e Gall, em um experimento envolvendo hibridização *in situ* e coloração com Giemsa em cromossomos de camundongos. Posteriormente, uma série de metodologias foi publicada e, apesar de algumas variações, envolvem basicamente a solubilização diferencial da eucromatina, através do tratamento sequencial das lâminas em solução ácida, solução alcalina e solução salina, seguida de coloração dos cromossomos com corante Giemsa, evidenciando então as regiões de heterocromatina constitutiva (HOLMQUIST, 1979; JELLEN, 2016).

Desde o desenvolvimento da técnica, o bandamento C permitiu grandes avanços na identificação e caracterização cromossômica de espécies importantes, tais como *Vicia faba* (SCHWEIZER, 1973), *Secale cereale* (SHARMA; NATARAJAN, 1973), *Triticum aestivum* (ZURABISHVILI; IORDANSKII; BADAIEV, 1974), *Zea mays* (WARD, 1980) e *Coffea Canephora* (PIEROZZI et al., 1999) e ainda hoje continua sendo uma importante ferramenta da citogenética, visto que apresenta a vantagem de ser uma técnica de baixo custo e que produz resultados confiáveis (JELLEN, 2016). Trabalhos recentes utilizaram o bandamento C como marcador citogenético na caracterização do cariótipo e detecção de polimorfismos cromossômicos em diversas espécies, como *Aegilops uniaristata* (GONG et al., 2014), *Brassica napus* (AMOSOVA et al., 2014) e *Echinacea purpúrea* (JIANG et al., 2016). Badaeva et al. (2015) utilizaram eficientemente o bandamento C para detectar alterações cariotípicas associadas à evolução e domesticação do trigo poliploide.

Além destes, outros bandamentos para a microscopia de campo claro são encontrados na literatura, como os bandamentos R (DUTRILLAUX; LEJEUNE, 1971), G (SUMNER; EVANS; BUCKLAND, 1971) e Ag-NOR (APPELS et al., 1998), os quais marcam, respectivamente, regiões eucromáticas, heterocromáticas e RONS (regiões organizadoras do nucléolo) ativas.

Técnicas de bandamentos cromossômicos também foram desenvolvidas para microscopia de fluorescência, tornando-se uma ferramenta valiosa nas análises citogenéticas (ANDRAS et al., 2000). Após a coloração com o fluorocromo quinacrina revelar bandas-Q reproduzíveis em cromossomos mitóticos, evidenciando regiões ricas em AT (CASPERSSON; ZECH; JOHANSSON, 1970), outras técnicas surgiram, dentre as quais se destacam CMA/DAPI (SCHWEIZER, 1976) e CPD (HANSON et al., 1995).

A dupla coloração de cromomicina A (CMA) com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) é a técnica de bandamento fluorescente mais utilizado em plantas para diferenciar os cromossomos (GUERRA, 2000). Ela permite diferenciar a heterocromatina em regiões ricas em CG (CMA⁺) e regiões ricas em AT (DAPI⁺) (SCHWEIZER, 1981). Como a técnica é baseada na afinidade dos fluorocromos a regiões específicas do DNA, tal bandamento não requer pré-tratamentos químicos para a formação das bandas, gerando resultados rápidos e confiáveis (SUMMER, 1990).

O uso da coloração CMA/DAPI já foi realizado em espécies do gênero *Urochloa*, por Nani et al. (2016). No trabalho, *U. ruziziensis* (2n=2x=18) e *U. brizantha* (2n=4x=36) apresentaram duas bandas terminais CMA⁺, enquanto *U. decumbens* (2n=4x=36) apresentou quatro bandas terminais CMA⁺. Não foram evidenciadas bandas DAPI⁺ nas três espécies. Além disso, os autores verificaram que todas as bandas CMA⁺ correspondiam aos sítios de rDNA 45S.

A citogenética molecular fornece ainda outras ferramentas para a identificação de cromossomos e para desvendar a organização cromossômica em nível molecular (PEDERSEN; LANGRIDGE, 1997). As técnicas de hibridização *in situ* (HIS) baseiam-se na hibridização entre sondas marcadas e sequências de DNA ou RNA. A HIS é empregada para localizar genes e sequências repetitivas ao longo do cromossomo ou no núcleo interfásico (FISH), ou para individualizar os genomas de cada um dos parentais (GISH) (GUERRA, 2004). Entretanto, o potencial para identificar as sequências ou os genomas depende da disponibilidade de sondas adequadas e exige uma divergência genômica substancial (RIESEBERG; BAIRD; GARDNER, 2000; REY; MOLNÁR; DOLEŽEL, 2015).

Cariótipos detalhados podem ser instrumentos importantes no mapeamento genético, podendo contribuir na determinação de grupos de ligação a cromossomos específicos (LIM et al., 2001). Portanto, as técnicas de bandamento podem fornecer informações valiosas na área vegetal, tanto na identificação de certos cromossomos para a construção do cariótipo e para a localização e orientação de genes de interesse, quanto para estudos sobre a evolução e organização de genomas (SHE; LIU; SONG, 2006).

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

As avaliações citogenéticas foram realizadas em genótipos de *U. ruziziensis* “Iracema” tetraploidizada por Timbó et al. (2014), *U. decumbens* cv. Basilisk (naturalmente tetraploide) e no híbrido (H963) proveniente do cruzamento entre as duas espécies. O material botânico foi cedido pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG. As plantas foram mantidas em vasos, em casa de vegetação alocada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. As plantas híbridas foram propagadas a partir de perfilhos de uma planta matriz e, portanto, constituem-se de clones.

3.3 Preparo das lâminas

Para a obtenção de C-metáfases, as raízes foram coletadas e submetidas a pré-tratamento com solução de ciclohexamida ($12,5 \text{ mg.L}^{-1}$) por 2 horas, a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$). Posteriormente foram lavadas em água destilada, fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) por 24 horas em temperatura ambiente e armazenadas em etanol 90% à -20°C até o momento do uso.

Os meristemas foram submetidos à digestão enzimática em um mix de enzima, contendo celulase “Onozuka R10” (0,7%), celulase Sigma-Aldrich (0,7%), pectoliase Sigma-

Aldrich (1%) e citohelicase Sigma-Aldrich (1%) por aproximadamente 1 h e 30 minutos, a 37°C. As lâminas foram preparadas por dissociação de células e secagem ao ar (CARVALHO; SARAIVA, 1993). A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de campos claro na objetiva de 40X e aquelas contendo as melhores metáfases foram selecionadas.

3.4 Bandamento CMA/DAPI

O procedimento foi baseado no protocolo de Guerra e Souza (2002) com algumas modificações. Lâminas envelhecidas de sete a quinze dias foram lavadas em tampão McIlvaine (pH 7,0) por 20 minutos, secas e incubadas em solução de cromomicina A (CMA) 0,5 mg/mL, com MgCl₂ 2.5M, por 1 hora e 30 minutos. Em sequência, foram lavadas rapidamente em tampão McIlvaine e secas. As lâminas foram montadas em Vectashield antifade com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) na concentração de 1.5µg/mL e armazenadas em compartimento escuro, na geladeira (4°C), por pelo menos três dias.

As preparações foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 equipado com câmara QImaging Retiga EXi CCD refrigerada. As observações e as fotografias foram realizadas utilizando filtros de excitação/emissão 495/515 para o CMA e 358/461 para o DAPI. O contraste final nas imagens capturadas foi realizado com as ferramentas do software Photoshop CS.

3.5 Bandamento C

Para a obtenção das bandas C foi empregado o protocolo de Schwazacher, Ambros e Schweizer (1980) com pequenas adaptações. Lâminas envelhecidas foram hidrolisadas em ácido acético 45% a 60°C por 5 minutos, lavadas em água destilada e secas. Após a desnaturação em solução saturada de hidróxido de bário 5%, a temperatura ambiente, por 8 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente por 20 minutos e incubadas em SSC 2x, a 60°C, por 40 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada, secas, coradas em corante Giemsa 5% por 45 minutos e montadas em Entellan®.

As metáfases foram capturadas em microscópio de campo claro Axio Lab A1 Zeiss acoplado a uma câmera AxioCan ICc 1. As imagens foram processadas usando o software Photoshop CS.

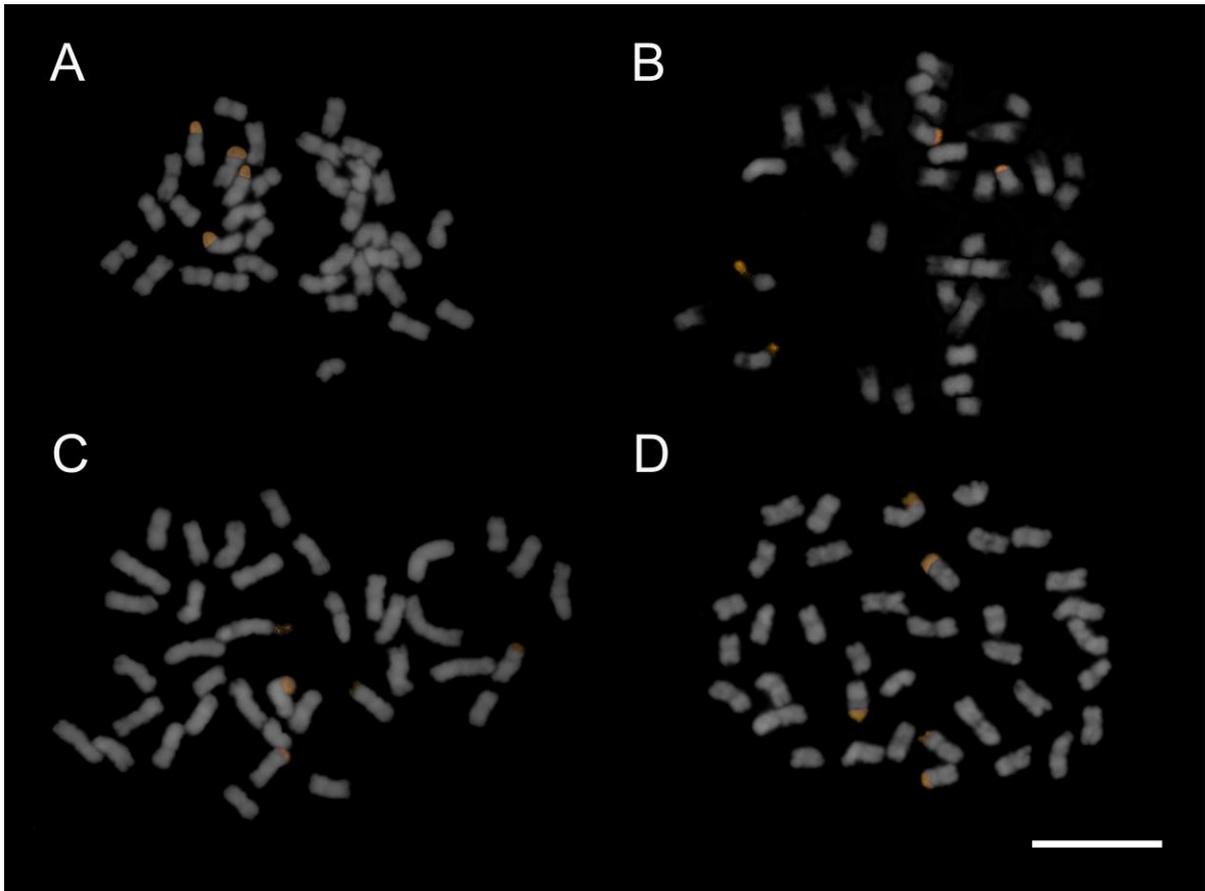
3.6 Morfometria cromossômica

As medições foram realizadas através do software livre KaryoType (YU et al., 2015; ALTINORDU et al., 2016). Os dados morfométricos de cada espécie foram obtidos a partir de cinco metáfases após o procedimento de coloração CMA/DAPI. Os parâmetros utilizados foram: CT (comprimento total cromossômico – μm); L (comprimento do braço longo – μm); S (comprimento do braço curto – μm); CR (comprimento relativo - %); RB (relação de braços) e CTLH (comprimento total do lote haploide – μm). O índice de assimetria cariotípica e a descrição da morfologia cromossômica foram determinados de acordo com os parâmetros de Stebbins (1958) e Levan et al. (1964), respectivamente. As bandas foram classificadas quanto à posição como pericentromérica, intersticial ou terminal, segundo Heslop-Harrison e Schwarzacher (2011). Além disso, foram medidos os comprimentos relativos das bandas CMA comparadas ao comprimento do braço cromossômico. Os cariogramas foram montados com auxílio do software Adobe Photoshop.

4 RESULTADOS

Para os genótipos de *U. ruziziensis* “Iracema” e *U. decumbens* cv. Basilisk foram confirmados 36 cromossomos, sendo que quatro cromossomos exibiram bandas CMA (regiões ricas em CG) na posição terminal (Figura 1 A e B). Para o híbrido interespecífico H963 foi confirmado o número de $2n=36 + 2$ cromossomos (Figura 1 C), entretanto, alguns clones apresentaram metáfases com $2n=36 + 1$ cromossomos (Figura 1 D). Além disso, bandas CMA foram observadas na região terminal de cinco cromossomos, em ambos os casos (Figura 1 C e D). Bandas DAPI (regiões ricas em AT) não foram visualizadas nos cromossomos dos genótipos avaliados.

Figura 1 - Metáfases de *Urochloa ruziziensis* “Iracema” ($2n=4x=36$) (A), *Urochloa decumbens* ($2n=4x=36$) (B) e híbrido interespecífico H963 com 36+2 cromossomos (C) e 36+1 cromossomos (D) após bandamento fluorescente. Bandas CMA representadas em amarelo. Barra: 10 μm .



Fonte: Do autor (2018).

Para *U. ruziziensis* “Iracema”, genótipo tetraploidizado artificialmente, a fórmula cariotípica foi determinada como $2n=4x=36m$ e o cariótipo foi classificado como simétrico na categoria 1A de Stebbins (1958). Os comprimentos relativos do maior e do menor pares de cromossomos corresponderam a 13,25% e 8,46% do comprimento total do lote haploide, respectivamente (Tabela 1). As bandas CMA foram identificadas no braço curto do par cromossômico 3, com tamanho variando de 33,67% a 51,47% em relação ao braço cromossômico.

Tabela 1 – Morfometria média dos cromossomos de *Urochloa ruziziensis* (Iracema): L (comprimento do braço longo); S (comprimento do braço curto); CT (comprimento total do cromossomo); CR (comprimento relativo); RB (relação de braço); M (morfologia cromossômica, de acordo com Levan (1964), onde m=metacêntrico) e CTLH (comprimento total do lote haploide).

Crom	L (µm)	S (µm)	CT (µm)	CR (%)	RB (L/S)	M
1	1,97	1,60	3,57	13,25	1,23	m
2	1,87	1,56	3,43	12,7	1,20	m
3*	1,76	1,61	3,37	12,51	1,09	m
4	1,76	1,36	3,12	11,59	1,29	m
5	1,65	1,31	2,96	10,96	1,26	m
6	1,60	1,35	2,95	10,94	1,19	m
7	1,52	1,22	2,74	10,17	1,24	m
8	1,38	1,16	2,54	9,42	1,19	m
9	1,21	1,08	2,29	8,46	1,12	m

CTLH: 26,97

* Par cromossômico com banda CMA

Fonte: Do autor (2018).

A fórmula cariotípica determinada para a *U. decumbens* cv. Basilisk foi $2n=4x=36m$ e seu cariótipo foi classificado como simétrico, na categoria 1B de Stebbins (1958). O maior par cromossômico apresentou comprimento relativo de 7,66% em contraste com 4,01% do menor par (Tabela 2). O par cromossômico 3 apresentou heteromorfismo em relação ao comprimento total e a morfologia dos cromossomos (Tabela 2 e Figura 2B). O maior cromossomo do par sempre apresentou uma constrição terciária no braço longo, a qual estava ausente no seu homólogo. Para o ordenamento do par, apenas o comprimento médio do maior cromossomo foi considerado. Esse par de cromossomos apresentou bandas CMA, que foram

identificadas no braço curto, com tamanho relativo ao braço cromossômico variando de 42,25% a 77,88% no maior cromossomo e 56,96% a 63,06% no menor cromossomo. O par 10 também apresentou bandas CMA, com tamanho relativo das bandas variando entre 38,10% e 72% em relação ao braço cromossômico.

Tabela 2 – Morfometria média dos cromossomos de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk: L (comprimento do braço longo); S (comprimento do braço curto); CT (comprimento total do cromossomo); CR (comprimento relativo); RB (relação de braço); M (morfologia cromossômica, de acordo com Levan (1964), onde m=metacêntrico) e CTLH (comprimento total do lote haploide).

Crom	L (µm)	S (µm)	CT (µm)	CR (%)	RB (L/S)	M
1	1,95	1,68	3,63	7,66	1,16	m
1'	1,74	1,42	3,16	6,67	1,23	m
2*	1,68	1,46	3,14	3,31	1,15	m
2*¥	0,97	1,56	2,53	2,67	1,61	m
2'	1,75	1,37	3,12	6,59	1,27	m
3	1,75	1,35	3,10	6,54	1,30	m
3'	1,69	1,24	2,93	6,18	1,36	m
4	1,53	1,32	2,85	6,02	1,16	m
4'	1,53	1,22	2,75	5,80	1,26	m
5	1,52	1,16	2,68	5,66	1,31	m
5*	1,36	1,20	2,56	5,40	1,13	m
6	1,36	1,19	2,55	5,38	1,15	m
6'	1,31	1,14	2,45	5,17	1,14	m
7	1,30	1,07	2,37	5,01	1,21	m
7'	1,20	1,08	2,28	4,81	1,11	m
8	1,17	1,02	2,19	4,62	1,14	m
8'	1,06	0,98	2,04	4,31	1,08	m
9	1,05	0,93	1,98	4,18	1,13	m
9'	1,01	0,89	1,90	4,01	1,13	m

CTLH: 47,38

* Pares cromossômicos com bandas CMA

¥ Cromossomo heteromórfico sem a constrição terciária

Fonte: Do autor (2018).

O híbrido interespecífico H963 foi caracterizado como um aneuploide hiperploide, com fórmulas cariotípicas $2n=4x=36m+2m$ e $2n=4x=36m+1m$. Os cariótipos foram classificados como simétrico na categoria 1B de Stebbins (1958). A tabela de dados e os cariogramas do híbrido H963 (Tabela 3 e Figuras 2C e D) foram baseados na presença de cromossomos marcadores com bandas CMA, mantendo-se a mesma posição observada nos parentais.

Nas metáfases do H963 com 36+2 cromossomos, o comprimento relativo do maior e menor pares de cromossomos foi de 7,69% e 3,85%, respectivamente (Tabela 3). Bandas CMA foram encontradas em cinco cromossomos, os quais estavam em estado de hemizigose nos pares 2 e 5 (Figura 2 C). As características morfológicas dos cromossomos indicam que estes dois pares devem ter sido herdados de *U. decumbens*, com comprimento da banda CMA em relação ao braço variando entre 46% - 58% e 34,5% - 65%, respectivamente. Especificamente, o cromossomo 2 (com banda CMA) apresenta uma constrição terciária no braço longo, assim como observado no respectivo cromossomo do parental *U. decumbens* (Figura 2 B). Levando em consideração o tamanho médio e a morfologia dos cromossomos em todas as metáfases analisadas, os outros três cromossomos com banda CMA provavelmente foram herdados de *U. ruzizensis*, caracterizando uma trissomia no par 3' (Figura 2 C) e com tamanho relativo das bandas com variação entre 26,04% e 52,63%. Como foi evidenciada apenas uma banda CMA adicional ao número observado nos parentais, pode-se inferir que o outro cromossomo adicional pertença a outro par cromossômico, tratando-se, portanto, de uma trissomia dupla. A segunda trissomia foi localizada no par cromossômico 4' (Figura 2 C) e, presumivelmente, esse cromossomo extra foi herdado de *U. ruzizensis*. Nas plantas que apresentaram metáfases com 36+1 cromossomos, a trissomia foi observada somente no par 3' (Figura 2 D).

Tabela 3 – Morfometria média dos cromossomos do híbrido H963 com 36 +2 cromossomos: L (comprimento do braço longo); S (comprimento do braço curto); CT (comprimento total do cromossomo); CR (comprimento relativo); RB (relação de braço); M (morfologia cromossômica, de acordo com Levan (1964), onde m=metacêntrico) e CTLH (comprimento total do lote haploide).

Crom	L (µm)	S (µm)	CT (µm)	CR (%)	RB (L/S)	M
1	2,56	2,32	4,88	7,69	1,10	m
1'	2,53	2,13	4,66	7,34	1,19	m
2*¥	2,25	2,07	4,32	6,81	1,09	m
2'	2,17	1,99	4,16	6,56	1,09	m
3	2,04	1,79	3,83	6,04	1,14	m
3'* ^T	1,94	1,75	3,69	5,81	1,11	m
4	1,91	1,61	3,53	5,56	1,18	m
4' ^T	1,94	1,66	3,61	5,69	1,17	m
5*¥	1,77	1,56	3,33	5,25	1,14	m
5'	1,77	1,59	3,36	5,30	1,11	m
6	1,81	1,52	3,33	5,25	1,19	m
6'	1,80	1,51	3,31	5,22	1,19	m
7	1,76	1,51	3,28	5,16	1,17	m
7'	1,70	1,45	3,16	4,98	1,17	m
8	1,60	1,47	3,07	4,84	1,09	m
8'	1,46	1,32	2,78	4,38	1,11	m
9	1,44	1,28	2,71	4,28	1,13	m
9'	1,28	1,16	2,44	3,85	1,10	m

CTLH: 63,43

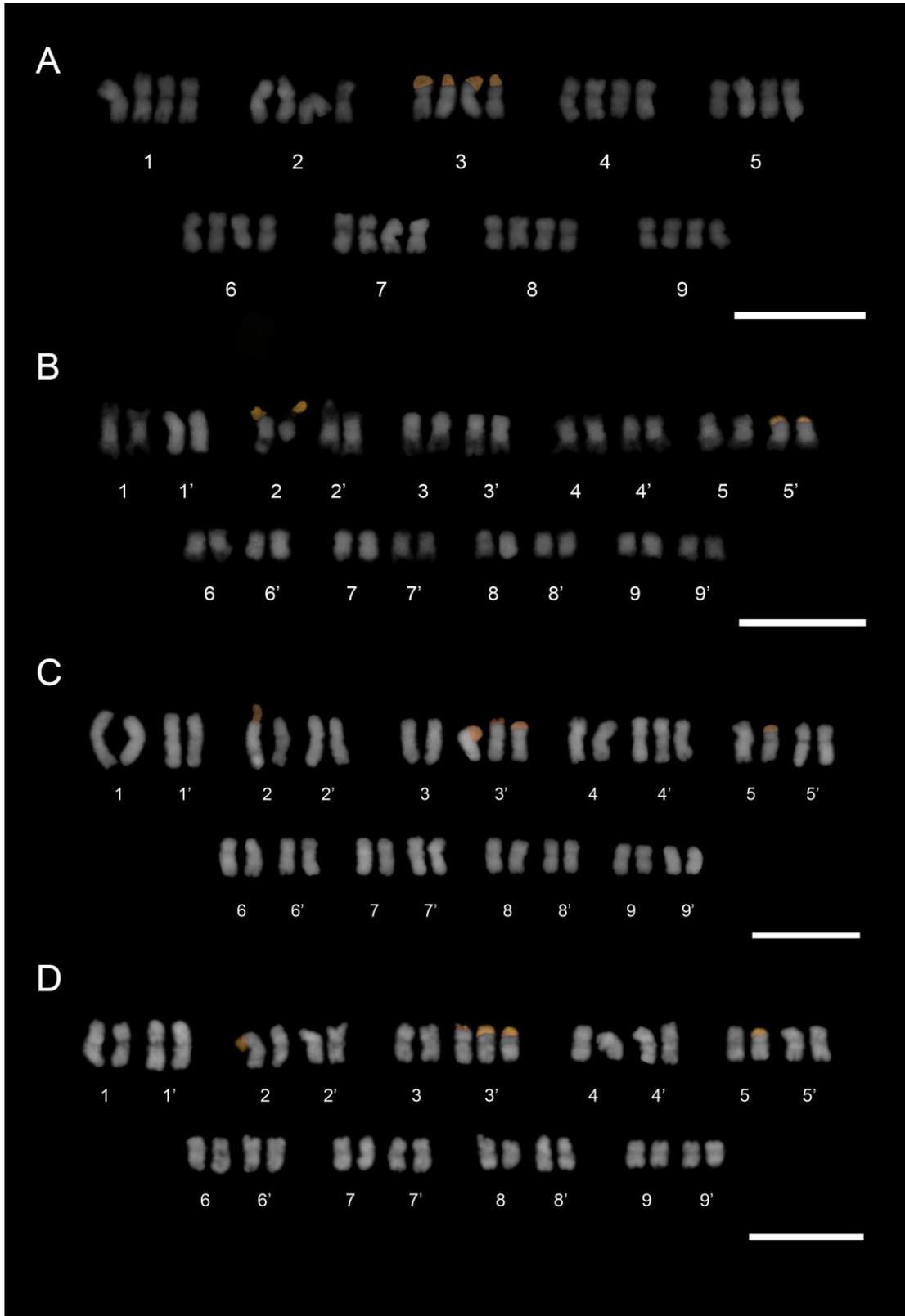
* Pares cromossômicos com bandas CMA

¥ Par cromossômico em hemizigose para a banda CMA

^T Par cromossômico com trissomia

Fonte: Do autor (2018).

Figura 2 – Cariograma de *Urochloa ruziziensis* “Iracema” (A), *Urochloa decumbens* (B) e híbrido interespecífico H963 com 36+2 cromossomos (C) e 36+1 cromossomos (D). Bandas CMA representadas em amarelo. Barra: 10 μ m.



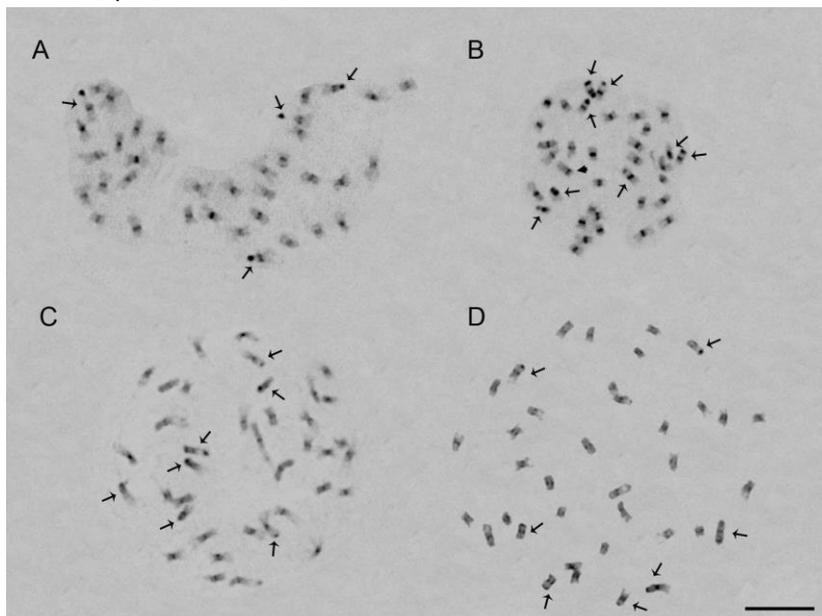
Fonte: Do autor (2018).

Em relação ao bandamento C, técnica que permite evidenciar heterocromatina constitutiva, foi encontrado bandas na região pericentromérica de todos os cromossomos dos parentais e do híbrido (Figura 3 e Tabela 4). Em *U. ruziziensis* “Iracema”, além das bandas pericentroméricas, quatro cromossomos foram discriminados por apresentarem também bandas C terminais (Figura 4A). Ao comparar a morfologia cromossômica, presume-se que estes quatro cromossomos devem corresponder aos cromossomos marcados com as bandas CMA (Figura 2A e 4A).

No outro parental, *U. decumbens* cv. Basilisk, sete cromossomos foram diferenciados por apresentarem bandas C pericentroméricas e terminais, um cromossomo apresentou somente banda terminal e outro cromossomo sempre apresentou três bandas C (pericentromérica + terminal em ambas as extremidades) (Figura 4B). Este último possivelmente corresponde ao cromossomo com banda CMA e constrição terciária (par cromossômico 2, Figura 2B).

No híbrido, a análise comparativa da morfologia dos cromossomos e padrão de bandas permitiu identificar a correspondência de alguns cromossomos dos parentais no cariótipo do híbrido (Figura 4 C e D).

Figura 3 - Metáfases de *Urochloa ruziziensis* “Iracema” ($2n=4x=36$) (A), *Urochloa decumbens* ($2n=4x=36$) (B) e híbrido interespecífico H963 com 36+2 cromossomos (C) e 36+1 cromossomos (D) após bandamento C. Setas indicam cromossomos diferenciados nas regiões terminais e pericentroméricas. Ponta de seta indica cromossomo com apenas uma banda terminal em *U. decumbens*. Barra: 10 μm .



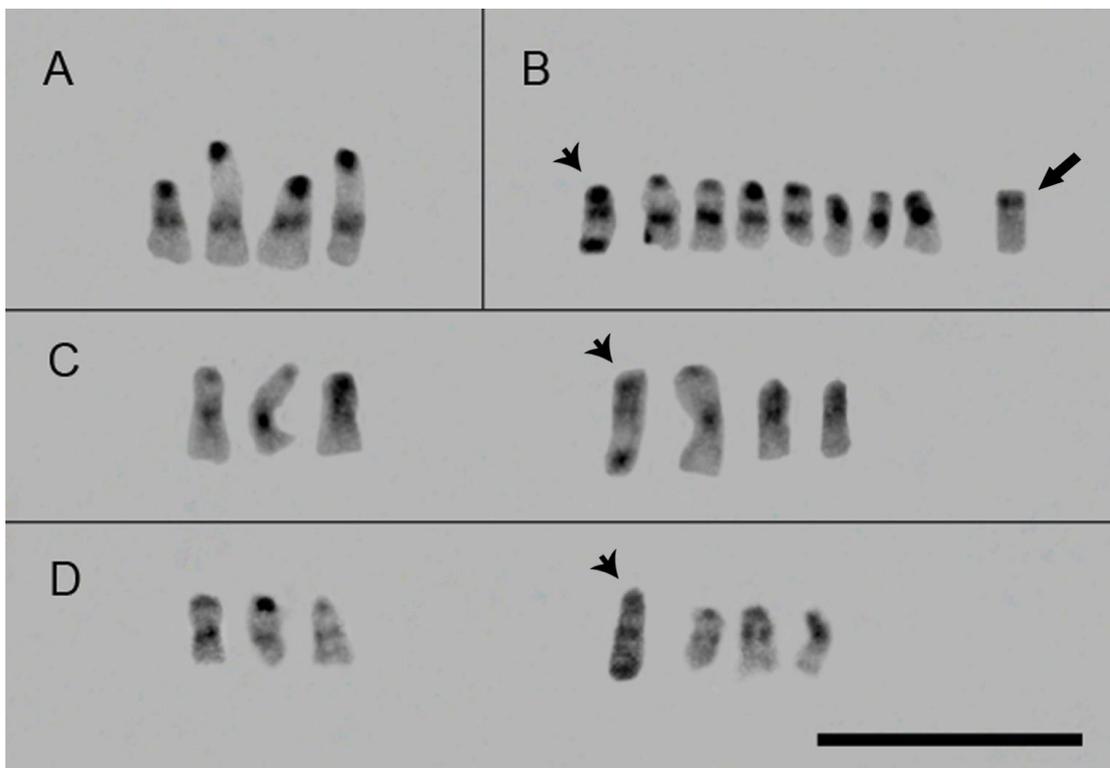
Fonte: Do autor (2018).

Tabela 4 – Número de bandas C identificadas nos genótipos de *Urochloa ruziziensis* “Iracema”, *Urochloa decumbens* cv. Basilisk e híbrido interespecífico H963 com 36+2 e 36+1 cromossomos: pericen – [banda na região pericentromérica]; pericen + 1T – [banda pericentromérica e uma banda terminal]; pericen + 2T – [banda pericentromérica e duas bandas terminais]; T/ST (banda terminal ou subterminal).

Genótipos	n° de cromossomos com bandas C			
	pericen	pericen + 1 T	pericen+ 2 T	T/ST
<i>U. ruziziensis</i>	32	4	0	0
<i>U. decumbens</i>	27	7	1	1
H963 – 36+2c	31	6	1	0
H963 – 36+1c	30	6	1	0

Fonte: Do autor (2018).

Figura 4 – Cromossomos discriminados pelo bandamento C em regiões terminais e pericentroméricas dos parentais *Urochloa ruziziensis* “Iracema” (A), *Urochloa decumbens* cv. Basilisk (B) e cromossomos correspondentes nas metáfases do híbrido interespecífico H963 com 36+2 cromossomos (C) e 36+1 cromossomos (D). Seta indica o único cromossomo com banda terminal. Ponta de seta indica cromossomo com banda centromérica e terminal em ambas extremidades. Barra: 10 μ m.



Fonte: Do autor (2018).

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise cariotípica comparativa entre parentais e híbrido (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*)

A classificação do cariótipo (categoria 1A de Stebbins), a fórmula cariotípica de 36m e a observação de quatro bandas CMA para *U. ruziziensis* tetraploidizada condizem proporcionalmente com a duplicação dos 18 cromossomos metacêntricos e as duas bandas CMA observadas em genótipos diploides dessa espécie, avaliados por Nani et al., 2016. Esses autores também mostraram que em *U. ruziziensis* diploide, os sítios de rDNA 45S se colocalizam com as bandas CMA. Em outro estudo com o genótipo tetraploide “Iracema”, Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017) descreveram quatro sítios de rDNA 45S localizados terminalmente, coincidindo com o número e a posição de bandas CMA observadas em nosso estudo.

O posicionamento do cromossomo portador da banda CMA no par 3 difere do relatado em estudos anteriores. Em análises meióticas, Valle et al. (1987) descreveram que a RON está localizada no par 7, enquanto que Bernini, Marin-Morales (2001), via coloração convencional, e Nani et al. (2016), por meio da FISH, identificaram o par 8 como o portador da RON e dos sítios de rDNA 45S, respectivamente. Algumas razões podem contribuir para essas discrepâncias e precisam ser consideradas. As variações intraespecíficas nos sítios de rDNA são comumente relatadas para híbridos artificiais, poliploides e espécies cultivadas (CERBAH et al., 1999; ROSATO et al., 2008) e podem estar relacionadas ao intenso processo de seleção agrônômica (PEDROSA-HARAND et al., 2006) ou à origem artificial dos genótipos (CERBAH et al., 1999; ROSATO et al., 2008). Comparativamente, no estudo cariotípico realizado por Nani et al. (2016) foi avaliada a cultivar Kennedy de *U. ruziziensis* ($2n=2x=18$), enquanto que o genótipo utilizado neste estudo é um autotetraploide sintético obtido de plantas matrizes de uma população originada do segundo ciclo de seleção recorrente intrapopulacional (TIMBÓ et al., 2014).

Outro aspecto refere-se ao comportamento típico dos cromossomos de *Urochloa*, os quais apresentam condensação tardia nas regiões terminais e frequentemente apresentam fibra de cromatina estendida, especialmente nos cromossomos portadores do rDNA 45S (NANI et al., 2016). De acordo com esses autores, isso pode contribuir para superestimar o tamanho dos cromossomos e interferir na definição exata dos pares cromossômicos. Para minimizar esses

efeitos, as metáfases utilizadas no presente estudo foram selecionadas com padrão similar de condensação e, quando obtida as medições cromossômicas, a extensão/gap entre o cromossomo e o respectivo sinal de CMA foi desconsiderado.

Por último, é preciso considerar o efeito dos bloqueadores mitóticos empregados nos pré-tratamentos. Nani et al. (2016) utilizaram 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 3mM, 5h a 4°C e Bernini e Marin-Morales (2001) combinaram 8HQ 0,002mM com DMSO 0,5% por 27h a 9°C. Ambos diferem quanto ao tipo de bloqueador e tempo de exposição empregado em nossas análises. Os agentes químicos empregados para a obtenção de C-metáfases possuem diferentes modos de ação sobre o ciclo celular e sobre os cromossomos (PLANCHAIS, 2000), que podem ter resultado em diferenças nos padrões de condensação, os quais se refletiram no tamanho dos cromossomos e no comprimento total do lote haploide entre os diferentes estudos. Em um estudo comparativo do efeito da colchicina, paradiclorobenzeno e 8-HQ, Ekong, Akpan e Udo (2014) demonstraram que cada inibidor químico induz uma condensação diferencial nos cromossomos que se refletiram em variações no comprimento cromossômico de *Allium cepa*.

Para *U. decumbens*, a classificação da morfologia de todos os cromossomos como metacêntricos está de acordo com os relatos de Bernini e Marin-Morales (2001), que descreveram tal ocorrência em dois genótipos da espécie, um diploide e um tetraploide. Um terceiro genótipo de *U. decumbens* avaliado pelos autores apresentou a classificação de um cromossomo como submetacêntrico, o que também foi reportado por Nani et al. (2016) para a cultivar Basilisk. Entretanto, essa diferença na classificação de um cromossomo como metacêntrico e submetacêntrico entre os dois estudos possivelmente também é resultado de diferenças na condensação dos cromossomos nas metáfases, visto que o menor cromossomo do par 3 apresentou relação de braços de 1,61, valor bem próximo do estabelecido por Levan (1964) como submetacêntrico (1,70). Adicionalmente, Bernini e Marin-Morales (2001) consideraram que a diversidade cariotípica entre genótipos de *U. decumbens* possa ser resultado de alterações estruturais ou possível hibridação entre diferentes genótipos da espécie.

Os dados obtidos para *U. decumbens* confirmam o heteromorfismo em um dos pares com banda CMA, no qual o maior cromossomo apresenta uma constrição terciária que não é observada no menor cromossomo, relatado anteriormente por Nani et al. (2016). Entretanto, existem divergências no posicionamento desse par entre os dois estudos. Nani et al. (2016) determinaram o par 11 como o portador da banda CMA/rDNA 45S e da constrição terciária,

aqui apresentado no par 3. Essa diferença se deve principalmente ao fato de que, no presente estudo, apenas o comprimento médio do maior cromossomo foi considerado para a disposição dos pares. Essa opção foi baseada na hipótese proposta também por Nani et al. (2016) de que teria ocorrido uma deleção na região da constrição terciária originando o menor cromossomo e o seu homólogo teria mantido a estrutura original (NANI et al., 2016). A diferença no posicionamento do outro par com banda CMA/45S entre dois estudos pode ser interpretada pelas mesmas considerações feitas anteriormente para *U. ruziziensis*.

Quanto ao híbrido interespecífico H963, a fórmula cariotípica determinada corrobora com a ocorrência de todos os cromossomos metacêntricos nos genitores. A confirmação de plantas híbridas apresentando 36+2 cromossomos (duplo trissômico – pares 3' e 4') e a ocorrência de plantas com 36+1 (trissômico, par 3') indica a eliminação de um dos cromossomos adicionais, identificado como sendo o cromossomo 4' neste segundo híbrido. As cinco bandas CMA observadas nas metáfases das plantas híbridas correspondem ao número de sítios de rDNA 45S descrito por Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017). Os autores haviam proposto que o maior número de sítios encontrado no híbrido, considerando o número de sítios observado nos genitores, estaria relacionado ao cromossomo adicional, o que foi comprovado no presente estudo pela trissomia no par 3' mantida em ambos os híbridos.

A variação somática no número de cromossomos em híbridos recém-sintetizados já foi relatada em outros gêneros da família Poaceae, como *Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum* (REIS et al., 2016). A combinação de dois ou mais genomas em um híbrido alopoliploide causa conflitos nucleares intergenômicos, que resultam em alterações dinâmicas do genoma, como instabilidade epigenética, ativação de elementos transponíveis, alterações estruturais e perda de cromossomos (JONES; HEGARTY, 2009). Segundo Comai (2005), a aneuploidia é um estado instável que, muitas vezes, leva a estados de poliploidia mais estáveis.

A caracterização da aneuploidia presente no híbrido H963, bem como a definição dos pares portadores da trissomia é inédita e, se associadas a métodos de fenotipagem, pode representar avanços em estudos para o mapeamento genético em espécies de *Urochloa*. O uso de trissômicos para a determinação de genes a cromossomos específicos é algo relativamente comum entre as gramíneas, como em *Zea mays* (LEE; DARRAH; COE, 1996), *Oryza sativa* (DONG; TSUZUKI; HIROYUKI, 2001), e *Setaria italica* (WANG et al., 2007).

Esses híbridos também possuem o potencial de serem utilizados em retrocruzamentos visando a construção de bibliotecas de cromossomos únicos e a introgressão de características

úteis em espécies de *Urochola*, como já relatado para *Lolium* (HUMPHREYS; CANTER; THOMAS, 2003) e *Triticum* (MOLNÁR-LÁNG; CEOLONI; DOLEŽEL, 2015). Em relação ao emprego do H963, existem ainda algumas restrições, tais como a baixa taxa de viabilidade polínica (cerca de 36% - PAULA et al., dados não publicados) e a necessidade de avaliar a sua estabilidade genética/cromossômica ao longo das gerações. A comparação do rendimento de matéria fresca do H963 com outros híbridos oriundos do cruzamento com os mesmos parentais (SOUZA SOBRINHO, dados não publicados) indicaram que os cromossomos adicionais não promoveram alterações significativas nessa característica, sendo necessária a avaliação de outros caracteres morfológicos, anatômicos ou fisiológicos para a detecção do possível efeito do conteúdo diferencial dos genes.

Os kariogramas do híbrido foram baseados na identificação de cromossomos marcadores específicos considerando a mesma ordem observada nos kariótipos dos parentais, como tem sido realizado em outros estudos com híbridos interespecíficos, como em *Passiflora* (SILVA et al., 2018). Dessa forma, foi possível determinar a procedência do(s) cromossomo(s) extra(s) do parental identificado no híbrido. Assim como proposto por Paula, Souza Sobrinho e Techio (2017), as análises comparativas dos kariótipos apontam *U. ruziziensis* como o parental doador dos cromossomos associados à aneuploidia. Outras evidências reforçam essa proposição: 1. A autopoliploidia do genótipo parental *U. ruziziensis*, que provém de uma duplicação artificial do genoma com colchicina (TIMBÓ et al., 2014). Em análises meióticas de seis genótipos de *U. ruziziensis* tetraploidizados artificialmente, o genótipo “Iracema” apresentou a maior taxa de anormalidades e uma alta viabilidade polínica (PAULA et al., 2016), validando a transmissão das anormalidades; 2. O envolvimento desse genótipo em outro cruzamento, com *U. brizantha*, que também produziu híbridos com 36+2 (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017); 3. Análises com a GISH no H963 identificaram dois cromossomos inteiramente marcados com a sonda de *U. ruziziensis* (PAULA; SOUZA SOBRINHO; TECHIO, 2017).

Além disso, vale ressaltar que, normalmente em plantas, a transmissão de anormalidades via gametas masculinos é rara. Isso porque, mesmo que sejam produzidos grãos de pólen desbalanceados e viáveis, eles muitas vezes não conseguem competir com grãos de pólen normais, pois as oosferas são preferencialmente fecundadas por gametas normais (SYBENGA, 1992; APPLES et al., 1998; SINGH, 2017). Essa mesma explicação pode se aplicar à transmissão preferencial do cromossomo com constrição terciária (cromossomo 2) de *U. decumbens*, observado no complemento cromossômico do híbrido pelo

bandamento CMA e C, visto que o menor cromossomo seria portador de uma deleção e o gameta para o qual ele segregaria seria preterido na fertilização.

Apesar de o presente estudo corroborar as evidências de que *U. ruziziensis* seja o parental doador dos cromossomos adicionais, um aspecto que deve ser considerado é que o parental *U. ruziziensis* (genoma B₂B₂B₂B₂) possui cromossomos que estão representados também no genoma B₂ de *U. decumbens* (B₁B₁B₂B₂). Portanto, é importante incluir análises com novos marcadores cromossômicos para melhor caracterizar a trissomia, incluindo a avaliação da sua manutenção em outros clones ou em outros híbridos gerados.

5.2 Distribuição da heterocromatina em espécies e híbridos de *Urochloa*

O padrão de distribuição de regiões heterocromáticas nos cromossomos sempre foi um parâmetro utilizado nas espécies vegetais, seja em estudos taxonômicos, detecção de variações inter ou intrapopulacionais ou ainda na identificação cromossômica em híbridos (ZOSHCHUK; BADAIEVA; ZELENIN, 2003). Todas as bandas aqui observadas com a coloração CMA/DAPI foram evidenciadas pelo bandamento-C, entretanto, nem todas as bandas C foram diferenciadas com o bandamento fluorescente. Situação similar já foi relatada em *Habrantus robustus* (BARROS e SILVA; GUERRA, 2010). Essas diferenças ocorrem porque, dentre as técnicas citogenéticas, as bandas reveladas pelo bandamento C correspondem à concepção mais geral de heterocromatina, coincidindo com os sítios de replicação tardia do DNA e sequências de DNA organizadas em *tandem*, enquanto que os bandamentos fluorescentes permitem avaliar os diferentes tipos de heterocromatina (GUERRA, 2000).

No padrão de bandas C observado nos genótipos, todos os cromossomos apresentaram bandas pericentroméricas (com exceção de um cromossomo com uma banda terminal em *U. decumbens*). Em alguns cromossomos, além de pericentroméricas, foram evidenciadas também bandas terminais, o que está de acordo com a distribuição de heterocromatina esperada para espécies com cromossomos pequenos/médios (FUKUI, NAKAYAMA, 1996; GUERRA, 2000). Fukui e Nakayama (1996) classificaram os cromossomos em dois tipos: pequenos, para aqueles com até três micrômetros, e grandes, para os que apresentam mais que oito micrômetros. O comprimento total médio dos cromossomos nos genótipos variou de 1,90 a 4,88 e, portanto, estariam enquadrados como cromossomos de tamanho pequeno-médio. Segundo esses autores, os cromossomos pequenos exibem um padrão simples de bandas C,

localizadas frequentemente em regiões centroméricas e/ou terminais, como observado nesse estudo. Guerra (2000), através de uma compilação de dados, avaliou a distribuição da heterocromatina em cromossomos de 105 espécies de plantas e registrou a tendência da região centromérica em manter bandas heterocromáticas. O autor propôs o termo “bandas generalizadas” para as bandas que ocorreram em mais de 80% dos cromossomos de um cariótipo e relatou que, muitas vezes, as bandas proximais generalizadas são conservadas nas espécies de um gênero, como constatado nos genótipos avaliados.

Em relação às bandas terminais, os quatro cromossomos observados em *U. ruziziensis* com bandas C foram considerados como os mesmos cromossomos marcados pelas bandas CMA. Essa consideração é validada por Guerra (2000), que relata que a heterocromatina da RON (região organizadora do nucléolo) é frequentemente evidenciada pelo bandamento C e por fluorocromos com afinidade para regiões ricas em CG. Quanto ao posicionamento dessas bandas, aparentemente as espécies do gênero também seguem um padrão de distribuição dos sítios de rDNA 45S observado em angiospermas, pois segundo Roa e Guerra (2012), em grande parte das espécies esses sítios são preferencialmente distribuídos no braço curto dos cromossomos, principalmente nas regiões terminais.

O maior número de cromossomos com bandas C na região terminal em relação ao número encontrado com bandas CMA e que também não foram detectados com bandas DAPI, para os genótipos de *U. decumbens* e H963, provavelmente é devido a essas regiões heterocromáticas apresentarem repetições em proporções iguais ou muito semelhantes de bases AT e CG, reagindo neutralmente com os fluorocromos (GUERRA, 2000). Mesma explicação pode ser dada para a não detecção das bandas C pericentroméricas no bandamento com fluorocromos. A inexistência de longos trechos de DNA ricos em AT foi considerada por Nani et al. (2016) uma possível explicação para não a detecção de bandas DAPI nos genótipos de *Urochloa*. Além disso, em algumas espécies, nem toda a heterocromatina rica em AT ou CG reage com o fluorocromo de afinidade, resultando em colorações neutras (GUERRA, 2000).

6 CONCLUSÃO

O híbrido interespecífico H963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*) apresenta aneuploidia com plantas trissômicas e duplo trissômicas.

A análise comparativa dos cariótipos obtidos por técnicas de bandamento e morfometria cromossômica indicam que os cromossomos adicionais que caracterizam a trissomia foram herdados do parental *U. ruziziensis* (autotetraploidizado artificialmente).

REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. de V.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, vol. 87, n. 1, p. 33-38, April 2008.
- ALTINORDU, F. et al. A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType. **Taxon**, Viena, v. 65, n. 3, p. 586-592, June 2016.
- AMBIEL, A. C. et al. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, PR, v. 30, n. 4, p. 457-464, 2008.
- AMBIEL, A. C. et al. *Brachiaria* germplasm dissimilarity as shown by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 1, p. 55-64, March 2010.
- AMOSOVA, A. V. et al. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers. **Journal of Genetics**, Bangalore, vol. 93, n. 1, p. 133-143, April 2014.
- ANDRAS, S. C. et al. Combined PI-DAPI staining (CPD) reveals NOR asymmetry and facilitates karyotyping of plant chromosomes. **Chromosome Research**, Heidelberg, v. 8, p. 387-391, March 2000.
- APPELS, R. et al. **Chromosome biology**. New York: Springer Science + Business Media, 1998. 401 p.
- 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**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 3530-3538, November 2011.
- BADAEVA, E. D. et al. Chromosomal Changes over the Course of Polyploid Wheat Evolution and Domestication. In: OGIHARA, Y. et al. (Eds.). **Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field**. Suíça: Springer International Publishing, p. 83-89, 2015.
- BARROS e SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, Louisville, v. 85, n. 2, p. 115-125, April 2010.
- BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2297-2309, November 1987.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios Journal**, Cambridge, v. 104, p. 157-171, January 2001.
- BIRCHLER, J. A. Aneuploidy in plants and flies: The origin of studies of genomic imbalance. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, p. 315-319, February 2013.

BRIDGES, C. B. Triploid intersexes in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v.54, p. 252–254, September 1921.

CARRILO, A. R. Q. et al. Apomixis importance for tropical forage grass selection and breeding. Review. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, Cidade do México v.1, p. 25-42, March 2010.

CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, Grã-Bretanha, v. 70, p. 515-519, May 1993.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res**, v. 60, p. 315-319, June 1970.

CERBAH, M. et al. FISH chromosome mapping allowing karyotype analysis in *Medicago truncatula* lines Jemalong J5 and R-108-1. **Mol Plant Microbe Interact.**, Saint Paul, v. 12, n. 11, p. 947-950, January 1999.

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

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

CLAYTON, W. D.; HARMAN, K. T. (2008) GrassBase - The Online World Grass Flora. <http://grassworld.myspecies.info/en/content/generic-descriptions/> acessado em: 10 de agosto de 2018.

COMAI, L. THE ADVANTAGES AND DISADVANTAGES OF BEING POLYPLOID. **Nature Reviews Genetics**, Springer Nature Switzerland, v. 6, p. 836-846, November 2005.

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

DONG, Y.; TSUZUKI, H.; TERAOKA, H. Trisomic genetic analysis of aroma in three Japanese native rice varieties (*Oryza sativa* L.). **Euphytica**, v. 117, p. 191–196, February 2001.

DUTRILLAUX, B.; LEJEUNE, J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype human. **C. R. Acad. Sci.**, Paris, v. 272, p. 2638-2640, 1971.

EKONG, N. J.; AKPAN, G. A.; UDO, I. J. Comparative effects of colchicine, 8-hydroxyquinoline and paradichlorobenzene on arm ratio of mitotic chromosomes of *Allium cepa* L. **Int. J. Mod. Alt. Med. Res.**, v. 2, p. 21-26, August 2014.

ESCUADERO, M. et al. Karyotypic Changes through Dysploidy Persist Longer over Evolutionary Time than Polyploid Changes. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 9, p. 1-7, January 2014.

- FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. *Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. Boca Raton: CRC Press, 1996. 288p.
- GONG, W. et al. Cytogenetic and molecular markers for detecting *Aegilops uniaristata* chromosomes in a wheat background. **Genome**, Canadá, v. 57, 489-497, November 2014.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 1029-1041, December 2000.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. D. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 201 p.
- GUERRA, M. **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p.
- GUETG, C., SANTORO, R. Formation of nuclear heterochromatin: the nucleolar point of view. **Epigenetics**, Barcelona, v. 7, n. 8, p. 811-814, June 2012.
- HANSON, R. E. et al. Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. **Genome**, Canada, v. 38, p. 646-651, August 1995.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Organization of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, Nova Jersey, v. 66, p. 18-33, April 2011.
- HOLMQUIST, G. The Mechanism of C-Banding: Depurination and β -Elimination. **Chromosoma**, Berlim, v. 72, p. 203-224, April 1979.
- HUMPHREYS, M. W.; CANTER, P. J.; THOMAS, H. M. Advances in introgression technologies for precision breeding within the *Lolium - Festuca* complex. **Ann. appl. Biol.**, UK, v. 143, p. 1-10, August 2003.
- IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 40, 68 p., 2012.
- ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Japão, v. 5, p. 164-170, August 2009.
- JELLEN, E. N. C-Banding of Plant Chromosomes. In: KIANIAN, S. F.; KIANIAN, P. M. A. (eds.). **Plant Cytogenetics: Methods and Protocols**. Springer Science+Business Media, Nova York, v. 1429, p. 1-5, 2016.
- JIANG, W. et al. A C-banded karyotype of mitotic chromosomes in diploid purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). **Hereditas**, Londres, 153:14, November 2016.
- JONES, R. N.; HEGARTY, M. Order Out of Chaos in the Hybrid Plant Nucleus. **Cytogenet Genome Res.**, Basileia, v. 126, p. 376-389, December 2009.

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

LEE, E. A.; DARRAH, L. L.; COE, E. H. Dosage effects on morphological and quantitative traits in maize aneuploids. **Genome**, Canadá, v. 39, p. 898-908, October 1996.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Landskrona, v. 52, p. 201-220, December 1964.

LIM, K.-B. et al. Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* and *Lilium rubellum* by chromosome banding and fluorescence in situ hybridization. **Genome**, Canadá, v. 44, p. 911-918, October 2001.

LUKASZEWSKI A. J. Introgressions Between Wheat and Rye. In: MOLNÁR-LÁNG, M.; CEOLONI, C.; DOLEŽEL, J. (Eds.). **Alien introgression in wheat: Cytogenetics, molecular biology, and genomics**. Suíça: Springer International Publishing, 2015. p. 163-189.

MITIDIERI, J. **Manual de gramíneas e leguminosas para pastos tropicais**. São Paulo: Nobel, 1988. 198 p.

MOLNÁR-LÁNG, M.; CEOLONI, C.; DOLEŽEL, J. (Eds.). **Alien introgression in wheat: Cytogenetics, molecular biology, and genomics**. Suíça: Springer International Publishing, 2015. 385 p.

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

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

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

NITTHAISONG, P. et al. Chromosome Number, Genomic Variation, and Molecular Markers to Assess Genetic Diversity of *Brachiaria* Species. **Crop Science**, Madison V. 56, p. 312–321, December 2015.

PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, Nova York, v. 168, p. 1356-1358, June 1970.

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

PAULA, C. M. P.; SOUZA SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. GENOMIC CONSTITUTION AND RELATIONSHIP IN *UROCHLOA* (POACEAE) SPECIES AND HYBRIDS. **Crop Science**, Madison, v. 57, p. 2605-2616, August 2017.

PEDERSEN, C.; LANGRIDGE, P. Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. **Genome**, Canadá, v. 40, p. 589-593, October 1997.

PEDROSA-HARAND, A. et al. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. **Theor Appl Genet.**, Heidelberg, v. 112, n. 5, p. 924-933, March 2006.

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

PEREIRA, A. V. et al. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L. et al. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PEREIRA, A. V. et al. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7, 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, September 2003, p. 36-63.

PESSOA-FILHO, M; MARTINS, A. M.; FERREIRA, M. E. Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. **BMC Genomics**, Londres, 18:516, July 2017.

PIEROZZI, N. I. et al. Characterization of somatic chromosomes of two diploid species of *Coffea* L. with acetic orcein and C-band techniques. **Caryologia**, Florença, v. 52, p. 1-8, 1999.

PLANCHAIS, S. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 476, p. 78-83, June 2000.

REIS, G. B. dos et al. Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* (Napier grass) and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) is caused by micronucleation. **Chromosome Research**, Holanda, v. 24, n. 3, p. 285-297, September 2016.

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

REY, E.; MOLNÁR, I.; DOLEŽEL, J. Genomics of Wild Relatives and Alien Introgressions. In: MOLNÁR-LÁNG, M.; CEOLONI, C.; DOLEŽEL, J. (Eds.). **Alien introgression in wheat: Cytogenetics, molecular biology, and genomics**. Suíça: Springer International Publishing, 2015. p. 347-381.

RIESEBERG, L. H.; BAIRD, S. J. E; GARDNER, K. A. Hybridization, introgression, and linkage evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, p. 205-224, February 2000.

- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Research and Crop Evolution**, Gatersleben, v. 53, p. 7-10, May 2006.
- ROA, F.; GUERRA, M.. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, Londres, 12:225, November 2012.
- ROSATO, M.; CASTRO, M.; ROSSELLO, J. A. Relationships of the woody *Medicago* species (section *Dendrotelis*) assessed by molecular cytogenetic analyses. **Ann Bot.**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 15-22, July 2008.
- SALARIATO, D. L. et al. Molecular phylogeny of the subtribe Melinidinae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 56, p. 355-369, July 2010.
- SCHWAZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. Application of Giemsa Banding to Orchid Karyotype Analysis. **Plant Systematics and Evolution**, Heidelberg, v. 134, p. 293-297, September 1980.
- SCHWEIZER, D. Differential staining of plant chromosomes with Giemsa. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 40, p. 307-320, September 1973.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 58:, p. 307-324, December 1976.
- SCHWEIZER, D. Counterstain-Enhanced Chromosome Banding. **Hum. Genet.**, v. 57, p. 1-14, March 1981.
- SEARS, E. R. **Aneuploids of common wheat**. Columbia, Mo. 1954, n. 572. 58p.
- SERRÃO, E. A.; SIMÃO NETO, M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *Brachiaria decumbens* Stapf e *Brachiaria ruziziensis* Germain e Everaed. **Boletim do Instituto de Pesquisa Experimental Agropecuária do Norte**, Belém, v. 1, n. 1, p. 1-31, November 1971.
- SHARMA, N. P.; NATARAJAN, A. T. Identification of heterochromatic regions in the chromosomes of rye. *Hereditas*, Londres, v. 74, p. 233-238, October 1973.
- SHE, C. W.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C. CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 81, n. 1, p. 13-21, January 2006.
- SHELTZER, J. M.; AMON, A. The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 27, n. 11, p. 446-453, November 2011.
- SILVA, G. S. et al. Identification and characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using FISH and GISH. **BMC Genetics**, Londres, 19:26, April 2018.
- SINGH, R. J. **Plant Cytogenetics**. Third edition. Boca Raton: Taylor & Francis, 2017. 528 p.

- SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: temas em evidência, 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2005.
- STEBBINS, G. L. Longevity habitat, and release of genetic variability in the higher plants. Cold Spring Harbor Symp. **Cold Spring harbor symposia on quantitative biology**, New York, n. 23, p. 365-378, 1958.
- SUMNER, A. T.; EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. A. A new technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biol**, v. 232, p. 31-32, July 1971.
- SUMNER, A. T. **Chromosome Banding**. Unwin Hyman, London, 1990. 434p.
- 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. 134-114, 1981.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. New York: Springer-Verlag, 1992. 469 p.
- TIMBÓ, A. L. de O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **R. Bras. Zootec.**, v. 43, n. 3, p. 127-131, March 2014.
- TORRES GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 37, p. 36-44, October 2005.
- TORRES, E. M.; WILLIAMS, B. R.; AMON, A. Aneuploidy: Cells Losing Their Balance. **Genetics**, Bethesda, v. 179, p. 737-746, June 2008.
- TRIVIÑO, N. J. et al. Genetic Diversity and Population Structure of *Brachiaria* Species and Breeding Populations. **Crop Science**, Madison, v. 57, p. 1-12, July 2017.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Cattle Selected Countries Summary**. Foreign Agricultural Service, 2016. Disponível em: <[https://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cattle Selected+Countries+Summary&hidReportRetrievalID=2575&hidReportRetrievalTemplateID=7](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cattle+Selected+Countries+Summary&hidReportRetrievalID=2575&hidReportRetrievalTemplateID=7)>. Acessado em: 20 out. 2016.
- VALLE, C. B.; SINGH, R. J.; MILLER, D. A. Pachytene chromosomes of *Brachiaria ruziziensis*. Ger. Et Evrard. **Plant Breeding**, Berlin, v. 78, p. 75-78, February 1987.
- VALLE, C. B.; GLIENKE, C.; LEGUISAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, Paris, v. 7, p. 42-43, 1994.
- VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Eds.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 147-163.

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

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

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

WANG, R.-Q. et al. Chromosome location and linkage analysis of a few agronomically important traits in foxtail millet. **Acta Agron. Sin.**, Pequim, v. 33, p. 9-14, November 2007.

WARD, E. J. Banding patterns in maize mitotic chromosomes. **Can. J. Genet. Cytol.**, Canadá, v. 22, p. 61-67, March 1980.

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

Yu, Y. et al. **KaryoType 2.0**. Available at <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/KaryoType>, 2015.

ZHANG, H. et al. Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat. **PNAS**, Washington, v. 110, n. 09, p. 3447–3452, February 2013.

ZOSHCHUK, N. V.; BADAIEVA, E. D.; ZELENIN, A. V. History of Mordern Chromosomal Analysis. Diferencial Staining of Plant Chromosomes. **Russian Journal of Developmental Biology**, Moscow, v. 34, p. 1-13, January 2003.

ZURABISHVILI, T. G.; IORDANSKII, A. B.; BADAIEV, N. S. Polykaryogram Assay for Chromosome Differential Staining Studies of *Triticum aestivum* L.. **Dokl. Akad. Nauk SSSR**, Moscow, v. 218, n. 1, p. 207-210, 1974.