



LUDMILA CAPRONI MORAIS

MICROSPOROGÊNESE COMPARATIVA ENTRE *Brachiaria ruziziensis* (R. Germ & Evrard) DIPLOIDE, TETRAPLOIDE E SUAS PROGÊNIES

**LAVRAS-MG
2017**

LUDMILA CAPRONI MORAIS

MICROSPOROGÊNESE COMPARATIVA ENTRE *Brachiaria ruziziensis* (R. Germ & Evrard) DIPLOIDE, TETRAPLOIDE E SUAS PROGÊNIES

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

Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora
Dr. Fausto Souza Sobrinho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

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

Morais, Ludmila Caproni.

Microsporogênese comparativa entre *Brachiaria ruziziensis* (R. Germ & Evrard) diploide, tetraploide e suas progênies : . / Ludmila Caproni Moraes. - 2017.

34 p.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Fausto Souza Sobrinho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Comportamento meiótico. 2. Viabilidade polínica. 3. Urochloa. I. Techio, Vânia Helena. II. Sobrinho, Fausto Souza. III. Título.

LUDMILA CAPRONI MORAIS

MICROSPOROGÊNESE COMPARATIVA ENTRE *Brachiaria ruziziensis* (R. Germ & Evrard) DIPLOIDE, TETRAPLOIDE E SUAS PROGÊNIES

COMPARATIVE MICROSPOROGENESIS AMONG DIPLOID AND TETRAPLOID GENOTYPES OF *Brachiaria ruziziensis* (R. Germ & Evrard) AND THEIR PROGENIES

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

APROVADA em 20 de fevereiro de 2017

Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Dra. Andrea Beatriz Mendes Bonato

UFLA
UEM

Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora
Dr. Fausto Souza Sobrinho
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

AGRADECIMENTOS

Agradeço os meus pais Sebastião e Maria Aparecida, meus irmãos Marina, Willian, Tais e Igor por todo amor e paciência, minha família, o querido Weliton e a comunidade Nossa Senhora de Fátima – Javé Nissi, grandes amigos que dispensaram todo apoio, oração e incentivo.

Sou grata à professora Vânia pela orientação; sua competência e dedicação me fizeram aprender e crescer muito tanto na vida profissional quanto pessoal. Seus ensinamentos foram marcados e com certeza irão refletir em toda minha história. Também à EMBRAPA Gado de Leite no nome do Dr. Fausto de Souza Sobrinho, pela disponibilidade de materiais e co-orientação.

Agradeço à toda equipe do laboratório de citogenética, cada um de meus colegas, desde os graduandos até os pós-doutorandos, que hoje posso chamar de amigos, que me incentivaram e encorajaram no dia a dia, que se dedicaram em tentar sanar cada um de minhas dúvidas, que não mediram esforços em me auxiliar nos momentos de dificuldade. Pelo companheirismo, conselhos e risadas que tornavam os dias sempre prazerosos.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Biologia, pelo cuidado e carinho com os estudantes.

Agradeço a UFLA e ao programa de Botânica Aplicada pela oportunidade, a cada um dos professores pela dívida do conhecimento e aos colegas que foram peças fundamentais para a construção do meu aprendizado.

Agradeço os órgãos de fomento pelo apoio financeiro, CAPES e CNPq.

E principalmente sou grata a Deus pelo dom da vida e por seu Espírito, sem o qual nada poderíamos fazer.

RESUMO

Os estudos de microsporogênese em *Brachiaria* tem se concentrado nas espécies *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* e seus híbridos por terem grande importância como forrageiras. Além do comportamento sexual, *B. ruziziensis* está dentre uma minoria de espécies diploides de *Brachiaria* ($2n = 2x = 18$), enquanto a maioria do gênero é tetraploide ($2n = 4x = 36$) e apomítica. *Brachiaria ruziziensis* é empregada em cruzamentos intra e interespecíficos. Para o êxito da hibridação interespecífica, faz-se necessário a tetraploidização artificial de *B. ruziziensis* e que os híbridos, apresentem meiose regular e alta taxa de viabilidade polínica. Diante deste cenário, o objetivo do presente trabalho foi comparar a microsporogênese em plantas de *B. ruziziensis* diploides e tetraploides artificiais e suas respectivas progênies. As análises foram feitas com material vegetal proveniente da EMBRAPA Gado de Leite, a partir da coleta de suas inflorescências, fixação em álcool etílico absoluto: ácido acético: ácido propiônico (6:3:2) e armazenamento a -4°C . Posteriormente utilizou-se a técnica de esmagamento com o corante Carmim Propiônico 1% para análises meióticas. Para viabilidade polínica, foi utilizado o corante Alexander. As anormalidades foram encontradas em todo processo de meiose nas famílias das plantas diploides e tetraploides e, de forma geral, a taxa foi considerada baixa, variando a porcentagem de acordo com o genótipo. A família diploide foi considerada mais estável. As progênies diploides e tetraploides apresentaram taxa de anormalidade meiótica semelhante às respectivas plantas mães, o que sugere que as combinações genéticas entre parentais ou a autofecundação foi estável. Para os acessos diploides, o índice de viabilidade polínica foi alto, atingindo até 88.3%. Ao passo que as plantas tetraploidizadas apresentaram valores inferiores, atingindo, no máximo, 61.1%.

Palavras-chave: Comportamento meiótico; Viabilidade polínica; *Urochloa*.

ABSTRACT

Studies on the microsporogenesis in *Brachiaria* have focused on *B. ruziziensis*, *B. decumbens* and *B. brizantha* species, and their interspecific hybrids for being especially important as fodder plants. Besides its sexual behavior, *B. ruziziensis* is among a minority of diploid species in *Brachiaria* ($2n = 2x = 18$), while most species of this genus are tetraploid ($2n = 4x = 36$) and apomictic. *B. ruziziensis* is used in intra and interspecific crosses. The success of interspecific hybridization depends on the artificial tetraploidization in *B. ruziziensis* and on the hybrids, both intra and interspecific crosses, that must present regular meiosis and high rate of pollen viability. Based on that, the aim of this work was to compare the microsporogenesis process in diploid and tetraploid individuals of *B. ruziziensis*, which were used as female genitors in breeding and their respective progenies. Analyses were conducted using plant material provided by EMBRAPA Dairy Cattle, from which inflorescences were sampled, fixed in an absolute ethyl alcohol: acetic acid: propionic acid solution (6:3:2) and stored at -4°C . Squash technique using 1% propionic carmine was used for meiotic analyses. For pollen viability, analyses consisted on Alexander's stain. Abnormalities were found throughout the meiotic process in diploid and tetraploid families, but in general, rate of abnormalities was considered low, with percentage varying according to the genotype analyzed. The diploid family was considered more stable. Diploid and tetraploid progenies and their respective mother plant showed similar rate of meiotic abnormalities, what suggests that genetic combinations used in crosses or self-fertilization were stable. For diploid accesses pollen viability was high, reaching up to 88.3%. On the other hand, tetraploid individuals showed lower rates, with a maximum of 61.1%.

Keywords: Meiotic behavior; Pollen viability; *Urochloa*.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA | 8 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 10 |
| 2.1 | Caracterização botânica e importância da <i>B. ruzizensis</i> | 10 |
| 2.2 | Aspectos citogenéticos de <i>B. ruzizensis</i> | 12 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 | Material vegetal | 15 |
| 3.2 | Coleta e fixação | 15 |
| 3.3 | Preparo das lâminas | 15 |
| 3.4 | Análise da meiose e da viabilidade do pólen | 15 |
| 4 | RESULTADOS | 17 |
| 5 | DISCUSSÃO | 23 |
| 6 | CONCLUSÃO | 28 |
| | REFERÊNCIAS | 29 |

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país que tem como uma de suas principais fontes de renda a pecuária. Para o sucesso de tal atividade econômica é necessário o cultivo de forrageiras de alta qualidade. Uma estimativa feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostrou que 170 milhões de hectares de áreas brasileiras são cultivados com gramíneas utilizadas como pastagens, que nutrem, em média, 170 milhões de bovinos (IBGE, 2006).

As forrageiras predominantemente utilizadas nestas áreas são de origem africana do gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach (sin. *Urochloa* P. Beauv.), que dominam 85% da área total plantada no país (MACEDO et.al, 2006). Tal fato relaciona-se com a característica do gênero que apresenta grande capacidade de produção sem muita exigência nutricional, o que permite a difusão da pecuária em qualquer tipo de solo existente na extensão do Brasil. As espécies mais cultivadas são *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, *B. humidicola* (Rendle) Schweick, *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* (R. Germ & Evrard) (VALLE et al., 2009).

Sendo assim, os programas de melhoramento genético, por meio da hibridação interespecífica e intraespecífica, tem trabalhado para a obtenção de plantas com características agronômicas superiores, tais como maior valor nutricional, alta produtividade e resistência à sua principal praga, a cigarrinha-das-pastagens, visando o aumento da qualidade das pastagens (SOUZA SOBRINHO, 2005).

Entretanto, a maioria das espécies, incluindo *B. brizantha* e *B. decumbens*, apresenta poliploidia ($2n = 4x = 36$) e ciclo de reprodução apomítico, enquanto que a *B. ruziziensis* é diploide ($2n = 2x = 18$) com reprodução sexual. Essa variação no nível de ploidia entre os genótipos é uma das limitações no processo de melhoramento via hibridação interespecífica. Desta forma, a tetraploidização artificial de *B. ruziziensis* diploide é realizada para possibilitar o cruzamento com as espécies tetraploides e apomíticas (PEREIRA et al., 2001; SOUZA SOBRINHO, 2005).

Timbó et. al. (2014) induziram a poliploidia em *Brachiaria*, a partir de sementes germinadas *in vivo*, utilizando a colchicina. Nesse trabalho, foram obtidas plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente capazes de serem empregadas em cruzamentos interespecíficos. Tanto as plantas tetraploidizadas quanto os híbridos obtidos vêm sendo avaliados para verificação de sua eficiência reprodutiva e observação de suas características citogenéticas.

Esse procedimento de observação do comportamento cromossômico é importante porque, dependendo da dosagem e tempo de exposição do material, as substâncias indutoras

de poliploidia, podem ser consideradas mutagênicas e provocarem alterações como perdas cromossômicas, mixoploidia, comprometimento na segregação e até mesmo esterilidade, tornando-se inviável sua utilização nos programas de melhoramento (LUCKETT, 1989; PEREIRA et al., 2012).

Diante deste cenário, o ideal é que as plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente manifestem uma microsporogênese regular, ou seja, apresentem baixas taxas de anormalidades na meiose, resultando na formação de grãos de pólen viáveis, tanto nas plantas mãe, como em suas progênes, garantindo o sucesso dos futuros cruzamentos.

Estudos realizados por Pagliarini et al. (2008), demonstraram uma média de anormalidades meióticas que variaram de zero a 24,46% nas plantas diploides e 5,20 a 54,71% nas tetraploidizadas. Em outro estudo conduzido por Paula et al. (2016) foi avaliado um genótipo de *B. ruziziensis* tetraploidizado artificialmente, um genótipo de *B. ruziziensis* oriundo de uma população obtida a partir do intercruzamento de oito plantas tetraploidizadas e quatro genótipos oriundos da autofecundação da planta tetraploidizada de *B. ruziziensis*. O comportamento meiótico desses genótipos foi considerado pouco afetado (4,43 a 11% de anormalidades) e a viabilidade polínica foi considerada alta (61 a 85%).

Até o momento, não foi avaliado comparativamente do comportamento meiótico das plantas mãe e das progênes. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é comparar a microsporogênese em plantas de *B. ruziziensis* diploides e tetraploides com as respectivas progênes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização botânica e importância da *B. ruziziensis*

O gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach é de origem africana, pertencente à família Poaceae, à tribo Paniceae e composto por cerca de 100 espécies. Os critérios taxonômicos utilizados na classificação das espécies deste gênero são baseados principalmente em estudos relacionados à biologia floral dos indivíduos cujas espiguetas ovais a oblongas são arranjas em racemos unilaterais, com a gluma inferior adjacente à ráquis, em posição adaxial. (PEREIRA et al., 2001).

No entanto, estas características não são consideradas bem definidas nos indivíduos além de serem de difícil distinção, assemelham-se muito com as características do gênero *Urochloa*, tornando-as inconsistentes para serem utilizadas como critério de classificação botânica. Sendo assim foi sugerida uma nova nomenclatura para algumas espécies, antes formalmente inseridas no gênero *Brachiaria*, incluindo-as, agora, no gênero *Urochloa*. Esta nova sistemática tem sido utilizada como forma de sinônimas para algumas espécies, sendo nomeadas *Urochloa brizantha*, *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis* até uma definição mais satisfatória para o grupo (TORRES GONZÁLEZ; MORTON, 2005).

Outras características que identificam as espécies de *Brachiaria* são plantas robustas, cespitosas, colmos inicialmente prostrados, rizomas geralmente muito curtos e retorcidos e as inflorescências podem atingir até 40 cm de comprimento, com 4 a 6 racemos, medindo de 7 a 10 cm de comprimento, e são geradas a partir de colmos eretos. Possuem bainhas pilosas e as lâminas foliares são linear-lanceoladas, esparsamente pilosas na face ventral e glabras na face dorsal (SEIFFERT, 1984). São monocotiledôneas com porte herbáceo, ausência de tecido lenhoso, capacidade de produção de sementes, presença de nós nos caules e folhas com bainhas (PEREIRA et al., 2001).

O gênero possui muitas espécies poliploides e apomíticas. A apomixia descrita é do tipo apospórica, e o saco embrionário do tipo *Panicum*, enquanto as plantas sexuais apresentam sacos embrionários do tipo *Polygonum* (PEREIRA et al., 2001).

As primeiras espécies a serem introduzidas no Brasil foram *B. mutica* e *B. plantaginea*, durante o período colonial de forma involuntária, porém, não apresentaram potencial forrageiro. Mais tarde outras espécies, como *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* foram integradas a institutos de pesquisa no país. Até os dias de hoje, as três espécies são muito utilizadas como forrageiras, sendo consideradas as principais na América

(PIZARRO et al., 1996; PEREIRA et al., 2001) e estão entre as principais forrageiras mais utilizadas para o desenvolvimento da pecuária em regiões tropicais. No Brasil, cultiva-se *Brachiaria* em cerca de 80 a 85% das áreas de pastagens (MACEDO et al, 2006).

Esta circunstância se dá pelo fato da espécie ser adaptada a solos de fertilidade baixa e acidez elevada, sendo tolerante a falta de P (fosfato) e Ca (cálcio) e a altos níveis de Al (alumínio), o que caracteriza, muitas vezes, os solos tropicais (RAO et al,1996). Outro aspecto importante é a ótima cobertura vegetal, pois o gênero apresenta intenso enraizamento, que evita a erosão em áreas de declive e também sua alta capacidade de rebrota sob condições de desfolha intensa (BOTREAL et al., 1987).

De acordo com Sendulsky (1977), *B. ruziziensis* é uma espécie perene, subereta apresentando 1 -1,5m de altura. Os nós inferiores possuem um aspecto radicante e de base decumbente. Apresenta rizomas com até 15 mm de diâmetro, resistentes, em formato de tubérculos esféricos. As folhas com média de 15 mm de largura e 100 - 200 mm de comprimento, pubescentes, verde amareladas e dispõe de ráquis largamente alada, arroxeadas com largura média de 4 mm. Espiguetas com parte apical pilosa, bisseriadas ao longo da ráquis com comprimento de 5mm. A gluma ínfera possui 3 mm de comprimento e desponta 0,5 a 1 mm sob a espiguetas. O fóscolo fértil tem 4 mm de comprimento. A propagação se dá por sementes ou ainda por propagação vegetativa.

A relação mais satisfatória entre folha/colmo do gênero acontece com a *B. ruziziensis*, por consequência ocasiona melhor aceitação pelos bovinos, em função do seu maior valor nutritivo e palatabilidade. De acordo com Souza Sobrinho (2005), as características de todas as partes das plantas avaliadas desta espécie foram consideradas superiores as demais espécies utilizadas como pastagem, tais como alta digestibilidade, alto valor absoluto de proteína bruta e baixas taxas de fibras. No entanto, ela é menos produtiva no período de seca e pouco resistente a baixas temperaturas, sua produção concentra-se no período das chuvas. Além de ser a mais exigente quando se trata de fertilidade do solo, a espécie é mais sensível ao ataque da praga cigarrinhas-das-pastagens. Outra característica constatada é que seu o valor nutritivo não diminuiu acentuadamente com o envelhecimento da planta, tal como ocorre nas demais espécies. Esta propriedade é relevante, pois uma vez ocorrido falhas no seu manejo, não influenciará na produtividade animal (ALVIM et al., 2002).

Para obter uma maior qualidade das pastagens, tem sido realizada a hibridação interespecífica e intraespecífica, na qual, os acessos mais promissores de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* são envolvidos no processo (SOUZA SOBRINHO, 2005). *B. brizantha* e *B. decumbens*, no entanto, fazem parte do grupo de espécies apomíticas, o que

significa que suas progênies são plantas clones e utilizadas como genitores masculinos, ou seja, doadoras de pólen. Nesse contexto se insere a importância da *B. ruziziensis*, pois sua característica sexual permite a realização de cruzamentos com as espécies apomíticas. Porém, a *B. ruziziensis* possui a metade do número cromossômico do que as demais espécies utilizadas na hibridação, tornando-se necessário, a duplicação cromossômica de seus acessos, equiparando-o ao número cromossômico das demais espécies, o que permite cruzamentos interespecíficos gerando descendentes férteis, onde a *B. ruziziensis*, é utilizada como genitor feminino, *B. brizantha* e *B. decumbens* como genitores masculinos (PEREIRA et al., 2001).

2.2 Aspectos citogenéticos de *B. ruziziensis*

Estudos citogenéticos com o gênero *Brachiaria* determinaram o número básico mais frequente sendo $x=9$ (GIUSSANI et al, 2001). No entanto existem relatos de $x=6$ (RISSO-PASCOTTO et al., 2006), $x=7$ (DARLINGTON, WYLIE, 1955) e $x=8$ (BASAPPA, 1987). A espécie *B. ruziziensis* é diploide ($2n = 2x = 18$), exclusivamente sexual, utilizada como genitor feminino nos processos de cruzamentos interespecíficos. Diferentemente da maioria das outras espécies de *Brachiaria*, que são poliploides, a maioria tetraploides ($2n = 4x = 36$) e se reproduzem de forma apomítica, sendo utilizadas apenas como genitores masculinos. Esta característica sexual da *B. ruziziensis* torna viável sua seleção, pois permite o aumento da variabilidade genética (SOUZA SOBRINHO et al., 2009). Porém, para ser utilizada no melhoramento via hibridação, faz-se necessário a tetraploidização artificial, que tornará viável o seu cruzamento com as outras espécies poliploides do gênero, tais como *B. brizantha* ($2n = 4x = 36$) e *B. decumbens* ($2n = 4x = 36$).

A indução da poliploidia é feita utilizando substâncias antimitóticas, tais como a colchicina, um alcaloide amplamente utilizado em espécies forrageiras (PEREIRA et al., 2012). Nesse sentido, vários trabalhos visando a poliploidização foram desenvolvidos em *Brachiaria ruziziensis*, a partir de sementes germinadas *in vivo* (SWENNE et al. 1981; TIMBÓ et al., 2014), pelo cultivo *in vitro* de sementes germinadas e múltiplos brotos (ISHIGAKI et al., 2009) e segmentos basais (SIMIONI; VALLE, 2009).

A equivalência no número cromossômico entre as espécies envolvidas no cruzamento é fundamental, pois permite novas combinações gênicas, onde os híbridos acumulam as melhores características da planta, desfrutando, por exemplo, da alta qualidade nutricional da *B. ruziziensis*, da rusticidade da *B. decumbens* e da resistência às cigarrinhas das pastagens de *B. brizantha* (VALLE et al., 2004).

Além da equitabilidade do número cromossômico, de acordo com Lutts et al (1991), outro ponto chave para o sucesso da hibridação é a necessidade da formação de pólen viável a partir de uma meiose regular. Segundo o autor, principalmente em plantas poliploides, a meiose é, muitas vezes, anormal, o que interfere na viabilidade dos gametas, gerando consequentemente uma baixa produção de sementes.

De acordo com Valle e Savidan (1996), o processo da meiose em acessos diploides de *B. ruziziensis* é, na maioria das vezes, regular. No entanto, quando há ocorrência de anormalidades, pode ser principalmente, resultante de falhas na segregação dos cromossomos/cromátides. Em um estudo envolvendo comportamento meiótico de plantas diploides e tetraploides de *B. ruziziensis*, Piaglarini et al. (2008) constataram uma média de anormalidades meióticas que variaram de zero a 24,46% e de 5,20 a 54,71% respectivamente. Alguns acessos não mostraram qualquer anormalidade, mas aqueles que apresentaram, as mais comuns foram relacionadas com a orientação e segregação cromossômica irregular, tal como migração precoce dos cromossomos para os pólos na metáfase I e II, bivalentes não congregados na placa metafásica, cromossomos retardatários em anáfases I e II, levando à formação de micronúcleos em telófases I e II e micrósporos na tétrade. As autoras ainda relataram que, entre os 16 acessos diploides analisados, 12 não apresentaram anormalidades nas tétrades. A ocorrência de tétrades normais, no entanto, não é uma garantia de formação de gametas férteis, porque podem ocorrer anormalidades pós-meióticas. Portanto há necessidade da avaliação tanto da meiose quanto da viabilidade do gameta gerado.

Nas plantas tetraploidizadas, Risso-Pascotto et al., (2005) observaram várias anormalidades meióticas relacionadas ao fracionamento do genoma, múltiplos fusos e celularização, levando a formação de políades. A esterilidade do pólen foi estimada em 61,38%.

No entanto, partir de análises realizadas com acessos de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente, Paula et al. (2014) constataram uma alta viabilidade do pólen, com valores médios variando entre 76,8 a 99,6%. Algumas plantas chegaram a apresentar taxas de viabilidade semelhantes a das plantas diploide, mostrando que a indução da duplicação cromossômica usando colchicina nem sempre leva à anormalidades na produção ou morfologia dos grãos de pólen.

Em um trabalho realizado posteriormente, os autores afirmaram que genótipos avaliados de híbridos de *B. ruziziensis* apresentam comportamento meiótico pouco afetado. Foi observada alta taxa de viabilidade polínica (61 a 85%), visto que a frequência de anormalidades meióticas variou de 4,43 a 11% (PAULA et al., 2016).

A posição do grão de pólen no racemo (basal, mediano e apical) também mostrou que há variações sobre a viabilidade do pólen. Foram observadas taxas de viabilidade maiores em grãos de pólen coletados a partir da região média e apical da inflorescência de *B. ruziziensis* (PAULA et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para as análises meióticas, foram avaliadas oito plantas de *Brachiaria ruziziensis*, divididas em duas famílias: diploide (planta mãe – genótipo M-779 e as progênes: P1-779, P2-779 e P3-779) e tetraploide (planta mãe – genótipo M-686 e as progênes P1-686, P2-686 e P3-686) oriundos do programa de melhoramento genético conduzido pela Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG. As progênes são resultantes de blocos de policruzamentos entre plantas com o mesmo nível de ploidia, onde se conhece o genitor feminino, mas o genitor masculino é desconhecido, podendo ocorrer polinização anemófila ou autopolinização. As mudas foram plantadas para vasos de seis litros, contendo terra: substrato (4:2). Foram adubadas a cada 10 dias com 1g de ureia e regadas com água diariamente.

3.2 Coleta e fixação

Para a análise meiótica, as inflorescências foram coletadas quando ainda estavam envolvidas na folha bandeira, fixadas em álcool etílico absoluto: ácido acético: ácido propiônico (6: 3: 2) e armazenadas à -4° C até o momento da avaliação.

3.3 Preparo das lâminas

Sob o microscópio estereoscópio, as anteras foram removidas e maceradas sobre uma lâmina com uma gota de corante carmim propiônico 1% para análises da meiose e corante de Alexander para análise da viabilidade do pólen. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento.

3.4 Análise da meiose e da viabilidade do pólen

As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Carl Zeiss, AxioLabA1) equipado com microcâmara (AxioCam ICc1). O comportamento meiótico foi avaliado/observado em cerca de 2800 células/planta.

Para viabilidade do pólen, foram avaliadas cinco lâminas/planta e 200 grãos de pólen/lâmina. Os grãos de pólen foram considerados viáveis quando apresentaram coloração

roxa e sem deformações e inviáveis quando corados de verde. A porcentagem de viabilidade foi obtida em função do número total de grãos de pólen avaliados e submetidos ao teste estatístico Scott-Knott do programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

4 RESULTADOS

Nas avaliações da meiose das plantas M-779, P1-779, P2-779 e P3-779 confirmou-se a diploidia ($2n=2x=18$), com diacineses e metáfases I apresentando nove bivalentes, sendo um deles ligado ao nucléolo ou ocasionalmente, dois deles ligados ao nucléolo (FIGURA 1 C e D). Em dois cromossomos paquitênicos observou-se um knob terminal, localizado no bivalente nucleolar, e um knob subterminal (FIGURA 1B). Outras regiões heterocromáticas menores, denominadas cromômeros também foram observadas posicionadas intersticialmente (FIGURA 1B).

Para as plantas M-686, P1-686, P2-686 e P3-686 confirmou-se a tetraploidia dos acessos ($2n=4x=36$), com diacineses e metáfases I apresentando configurações em univalentes, bivalentes e multivalentes. Devido à variação na ocorrência dessas configurações, não foi possível determinar exatamente o número de bivalentes ligados ao nucléolo (FIGURA 3 A e B).

Em relação às anormalidades, as plantas mães de *B. ruziziensis*, tanto diploide (M-779) quanto tetraploide (M-689), apresentaram meiose regular e taxas semelhante às suas progênes (TABELA 1 e FIGURAS 2 e 3). A maior parte das anormalidades foi observada a partir da metáfase I, mas configurações univalentes e multivalentes foram observadas nas diacineses das plantas tetraploides (TABELA 1).

Nos genótipos diploides, a porcentagem de metáfases I com cromossomos não orientados variou de 0 a 2.93% para as três progênes e 5.3% para a planta mãe (M-779). A progênie P2-779 não apresentou nenhum comportamento anormal nesta fase. Na anáfase I, com exceção da progênie P1-779 que não apresentou alterações, a porcentagem média de cromossomos perdidos foi de 3%. Durante telófase I e prófase II, foram observadas pontes e micronúcleos somente em P3-779. A presença de cromossomos não orientados na metáfase II variou entre 5 a 21%, sendo este último valor observado na planta mãe (M-779). Em relação às anáfases II, telófases II e tétrades, o índice de anormalidades foi baixo (inferior a 1%), representado por poucas células alteradas apenas em P1-779 e P3-779 (TABELA 1 e figura 2).

Nos genótipos tetraploides, a maior taxa de anormalidades foi observada na metáfase I devido a não orientação de diversos cromossomos na placa (figura 3 B) e stickiness (figura 3 C), variando de 7.32 a 14.97% entre as progênes e 32.04% para a planta mãe (M-686). Entre as anáfases I e prófases II, as taxas de alterações, incluindo cromossomos perdidos, micronúcleos e núcleos assincrônicos, atingiram cerca de 7%. Nas metáfases II, todos os

genótipos da família tetraploide apresentaram números elevados de alterações devido à taxa de núcleos assíncronicos, variando de 13.82% a 27.11% nas progênies P1-686 e P3-686, respectivamente. Com exceção das telófases II que não apresentaram anormalidades, os índices de alterações nas anáfases II e tétrades foram variáveis, com destaque para a progênie P2-686 que apresentou 10.34% de cromossomos/cromátides perdidos na anáfase II e P3-686 com 8.15% de alterações nas tétrades e a formação de tríades (TABELA 1 E FIGURA 3). Em relação ao número total de células quantificadas por genótipo, a planta mãe M-686 foi a que apresentou maior taxa de anormalidade na meiose, atingindo 6.22%.

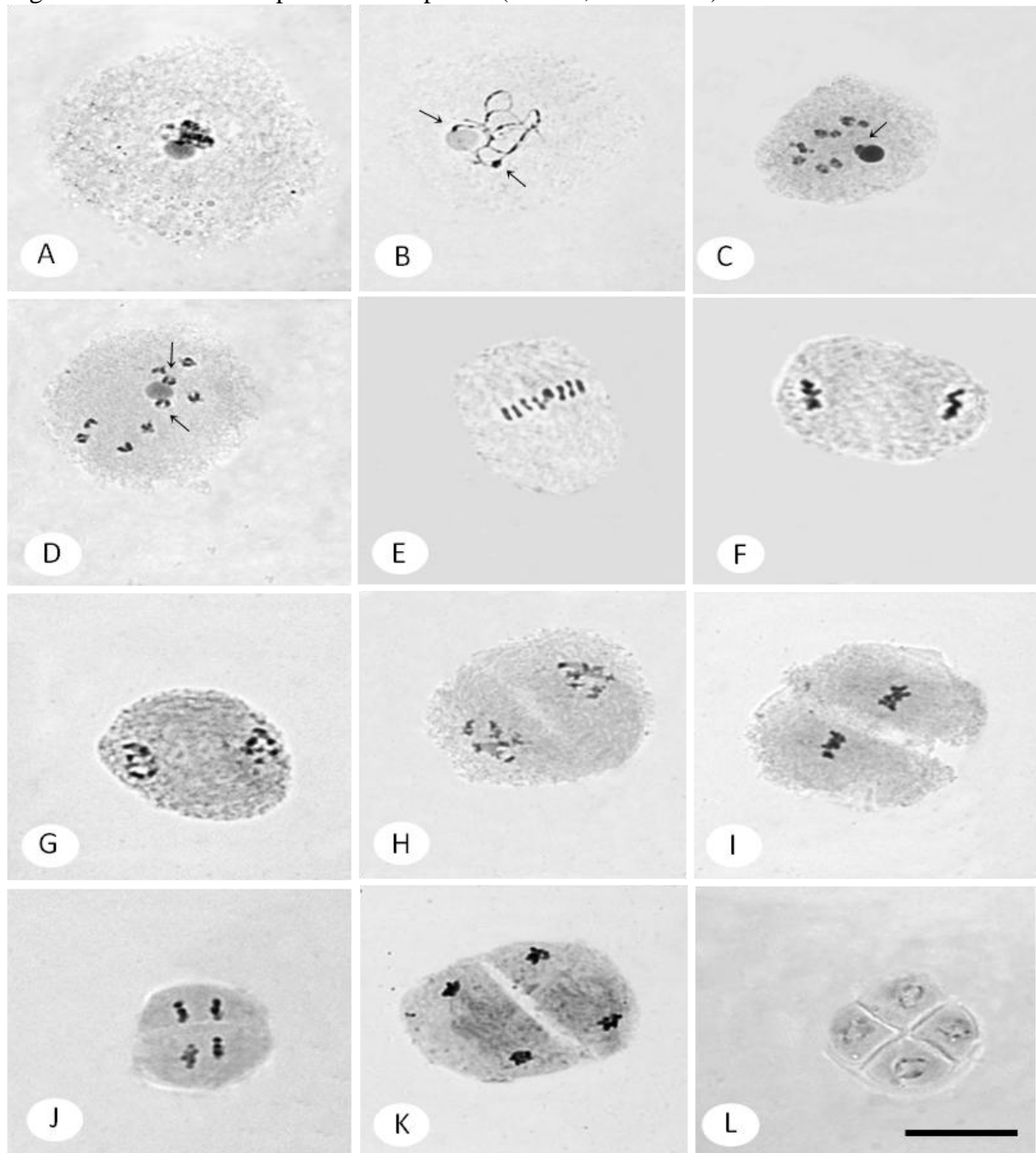
Tabela 1 – Número de células analisadas e porcentagem de células anormais (entre parênteses) durante a meiose em genótipos de *B. ruziziensis* diploide e tetraploide, sendo M as plantas mãe e P, as progênies.

| Fases | Diploides | | | | Tetraploides | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | M-779 | P1-779 | P2-779 | P3-779 | M-686 | P1-686 | P2-686 | P3-686 |
| PI | 1105 (0) | 1344 (0) | 891 (0.11) | 1086 (0) | 1325 (0.37) | 983 (0.3) | 2857 (0.14) | 1277 (0.31) |
| MI | 281 (5.3) | 239 (2.93) | 370 (0) | 538 (2.42) | 362 (32.04) | 374 (14.97) | 171 (7.6) | 164 (7.32) |
| AI | 48 (2.9) | 27 (0.0) | 32 (3.13) | 92 (3.26) | 32 (6.25) | 55 (7.27) | 4 (0) | 51 (0) |
| TI | 160 (0) | 158 (0) | 113 (0) | 295 (1.45) | 89 (1.12) | 110 (1.82) | 125 (3.2) | 84 (0) |
| PII | 356 (0) | 63 (0) | 145 (0) | 499 (1.7) | 134 (2.24) | 122 (2.45) | 327 (0.3) | 175 (0.57) |
| MII | 217 (21.2) | 221 (0) | 159 (5.03) | 156 (8.33) | 195 (15.38) | 94 (13.82) | 85 (23.53) | 118 (27.11) |
| AII | 32 (0) | 110 (0.9) | 35 (0) | 70 (0.0) | 99 (0) | 36 (0) | 29 (10.34) | 65 (1.54) |
| TII | 116 (0.0) | 172 (0.58) | 66 (0) | 122 (0.81) | 117 (0) | 64 (0) | 56 (0) | 117 (0) |
| Tet | 437 (0.0) | 932 (2.9) | 481 (0) | 332 (0) | 88 (0) | 417 (2.16) | 699 (1.72) | 221 (8.15) |
| Total de células analisadas (%anormalidades) | 2752 (2.25) | 3358 (1.34) | 2292 (0.39) | 3189 (1.44) | 2443 (6.22) | 2113 (4.11) | 4354 (1.21) | 2072 (3.08) |

Legenda: PI = prófase I; MI = metáfase I, AI = anáfase I; TI = telófase I; PII = prófase II; MII = metáfase II, AII = anáfase II; TII = telófase II; Tet = tétrade.

Fonte: Do autor (2017)

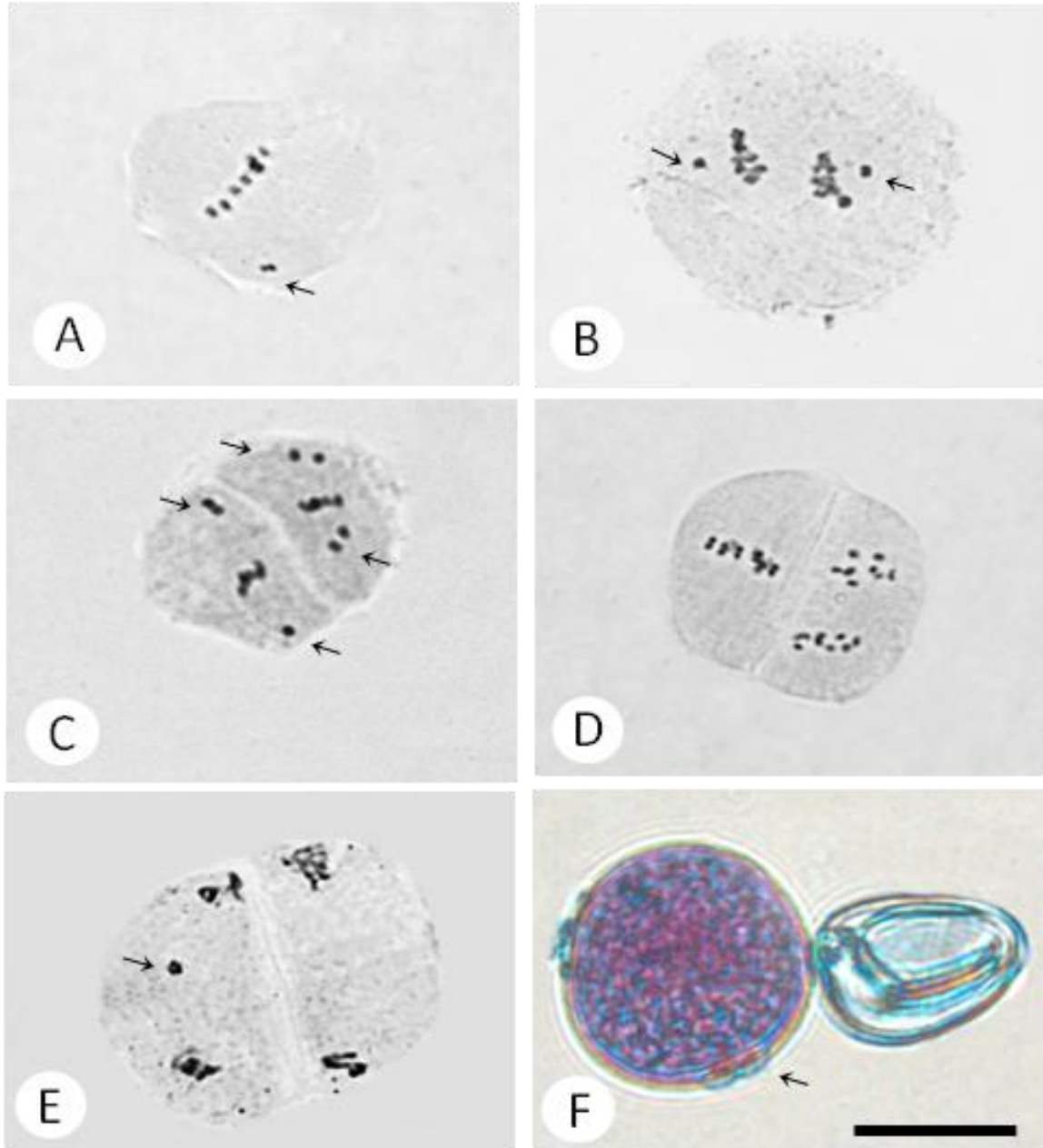
Figura 1 – Meiócitos da planta mãe diploide (M-779, $2n=2x=18$) de *Brachiaria ruziziensis*.



Legenda: A) Zigóteno; B) Paquíteno; (setas indicam knobs terminal e subterminal); C) Diacinese com nove bivalentes, sendo um bivalente associado ao nucléolo (seta); D) Diacinese com nove bivalentes, sendo dois bivalentes associados ao nucléolo (seta); E) Metáfase I; F) Anáfase I; G) Telófase I; H) Prófase II; I) Metáfase II; J) Anáfase II; K) Telófase II; L) Tétrade. Barra 50 μm .

Fonte: Do autor (2017)

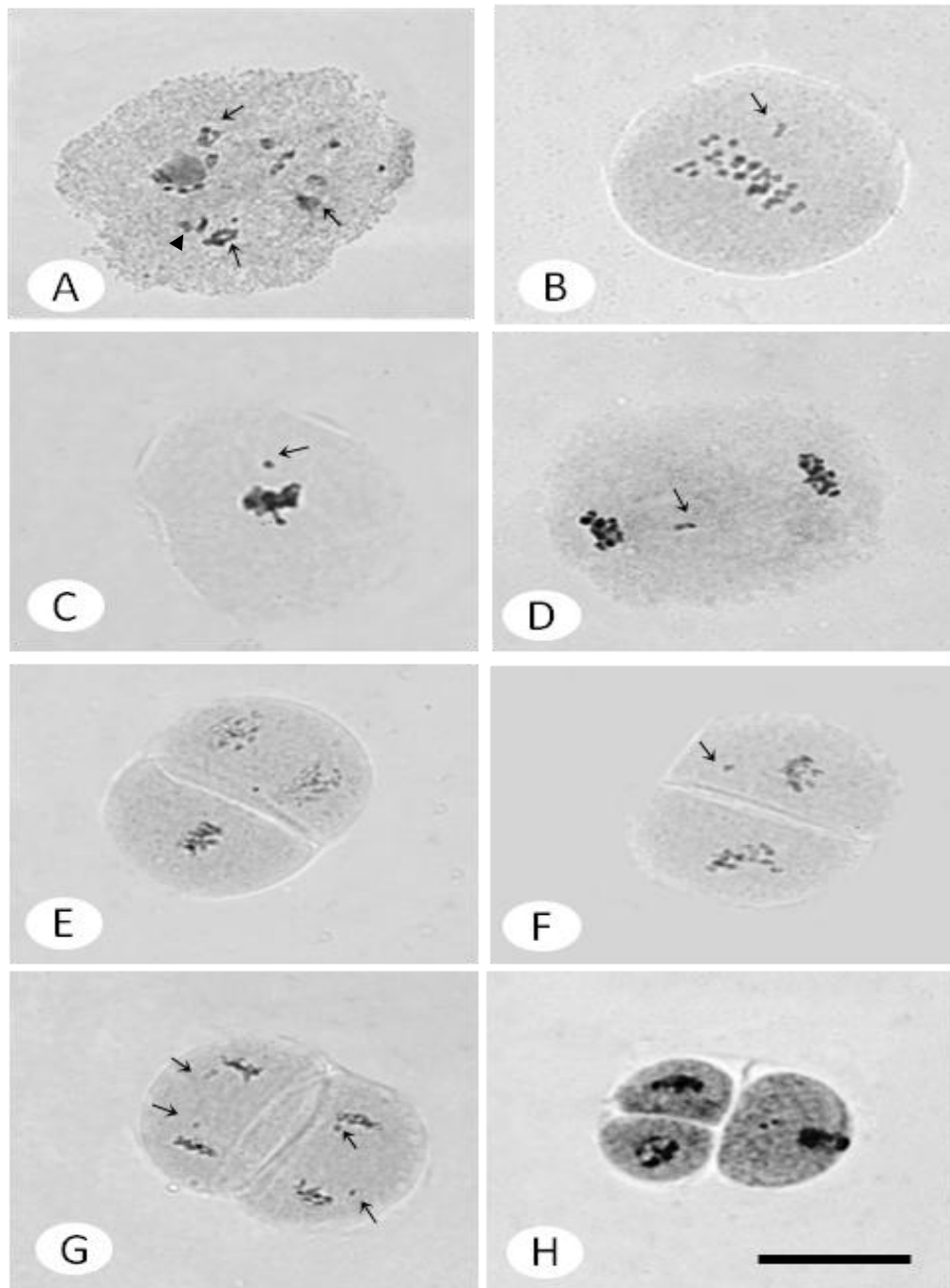
Figura 2 – Principais anormalidades observadas nos meiócitos das plantas diploides de *Brachiaria ruziziensis* e grãos de pólen.



Legenda: A) Metáfase I com cromossomo não orientado (seta); B) Anáfase I com cromossomos perdidos; C) Metáfase II com cromossomos não orientados; D) Metáfase II com núcleos assincrônicos; E) Telófase II com micronúcleo (seta); F) Grãos de pólen viável (seta) e inviável corado com corante de Alexander. Barra 50 μm .

Fonte: Do autor (2017)

Figura 3 – Principais anormalidades observadas nos meiócitos das plantas tetraploides de *Brachiaria ruziziensis*.



Legenda: A) Diacinese com multivalentes (setas) e univalentes (ponta de seta); B) Metáfase I com cromossomo não orientado (seta), C) Metáfase I com stickiness e cromossomo não orientado (seta), D) Telófase I com micronúcleo (seta) E) Metáfase II com núcleos assincrônicos, F) Metáfase II cromossomos não orientados (seta), G) Anáfase II com cromossomos perdidos (setas); H) Tríade. Barra 50 µm.

Fonte: Do autor (2017)

O teste de viabilidade polínica apontou os genótipos da família diploide com taxas de variando de 37,8 (P3-779) a 88,3% (P1-779) A progênie P3-779 (37,8%) apresenta menor

viabilidade do grão de pólen ($p < 0,05$), significativamente diferente da planta mãe M-779 e das outras duas progênies (P1-779 e P2-779) (TABELA 2).

Nos genótipos tetraploides, os valores variaram de 35.5 (M-686) a 61.1% (P3-686). A progênie (P3-686), apresentou a maior taxa de viabilidade, estatisticamente diferente em relação as demais progênies e a planta mãe. (TABELA 2).

Tabela 2 – Viabilidade polínica, expresso em porcentagem (%), usando teste colorimétrico com o corante Alexander para plantas diploides e tetraploides de *B. ruziziensis* e respectivas progênies.

| Corante | Diploide | | | | Tetraploide | | | |
|-----------|----------|--------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------|
| | M-779 | P1-779 | P2-779 | P3-779 | M-686 | P1-686 | P2-686 | P3-686 |
| Alexander | 88a | 88.3a | 77.7a | 37.8b | 35.5b | 44.4b | 52,7b | 61.1a |

Legenda: Letras minúsculas diferentes nas linhas para cada família mostram diferenças significativas pelos testes de Scott e Knott ($p < 0,05$).

Fonte: do autor (2017)

5 DISCUSSÃO

Os estudos de microsporogênese em *Brachiaria* tem se concentrado nas espécies de maior importância forrageira (*B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*) e respectivos híbridos. A ênfase é dada para a descrição e frequência das anormalidades, assim como de suas consequências (MENDES-BONATO et al., 2002; MENDES-BONATO et al., 2006a; RISSO-PASCOTTO et al., 2003a; RISSO-PASCOTTO et al., 2005; PAGLIARINI et al., 2008; PAULA et al. 2016). Nesse estudo, plantas diploides e tetraploides de *B. ruziziensis* e suas progênies foram avaliadas comparativamente quanto ao comportamento meiótico e formação do grão de pólen. Em uma análise geral, tanto para a família das plantas diploides quanto para a das tetraploides há uma tendência de redução da frequência total das anormalidades nas progênies, em comparação com a planta mãe. Essa resposta indica que as combinações dos cruzamentos aleatórios ou a autofecundação entre as plantas com mesmo nível de ploidia foram favoráveis, pois geraram plantas com menor taxa de irregularidades.

Nas plantas diploides, a variação no número de bivalentes (de 1 a 2) ligados ao nucléolo não havia sido relatada. Um estudo anterior realizado por VALLE et al., (1987) com oito acessos de *B. ruziziensis* citou a presença da região organizadora do nucléolo (RON) no par de cromossomo 7, o qual foi reconhecido por apresentar o braço curto inteiramente heterocromático durante o paquíteno. Posteriormente, Bernini e Marin-Morales (2001), em avaliação do cariótipo, mencionaram a presença do satélite na região terminal do braço curto do par de cromossomos 8. Recentemente, Nani et al. (2016) empregou as técnicas AgNOR e FISH com sondas de rDNA 45S, confirmaram o locus no par cromossômico 8, sendo que apenas um deles estava ativo (AgNOR+).

O registro de dois bivalentes nucleolares em *B. ruziziensis* diploide é inédito e pode indicar a ocorrência de um locus extra de rDNA 45S nesses genótipos, os quais poderão ser confirmados com a FISH, usando sondas de rDNA 45S em cromossomos mitóticos e meióticos. Variações intraespecíficas e intravarietais para o número de RONS já foram descritas em outras gramíneas, tais como *Setaria sphacelata* (NANI et al., 2015), *Lolium multiflorum* (BUSTAMANTE et al., 2014), *Lolium perenne* (KSIĄŻCZYK et al., 2010), e mesmo em *Brachiaria brizantha* (NANI et al., 2016).

A presença de cromômeros nos cromossomos paquítenicos de *B. ruziziensis* diploide já havia sido descrita por Valle et al. (1987) nos nove pares cromossômicos, sendo a maioria deles localizados em posição proximal. Nas plantas diploides avaliadas

em nosso estudo, devido ao maior tamanho, dois deles localizados em posição terminal e subterminal foram designados knobs e, possivelmente, resultam da fusão de um ou mais cromômeros.

Ghaffari et al. (2013) em seu estudo com os knobs encontrados em cromossomos de milho, descreveram-nos como regiões heterocromáticas constituídas de DNA repetitivo, que se apresentam em número, local e tamanhos altamente variados dependendo do genoma estudado. Os autores ainda sugeriram que alguns knobs podem reduzir a taxa de recombinação, dependendo do seu tamanho, em até duas vezes.

A maioria dos knobs podem ser visíveis ao longo do ciclo celular e nas fases iniciais da meiose e têm sido amplamente utilizados como marcadores citológicos para estudar a história filogenética da cultura do milho (McClintock, 1987) e também podem ser usados para análises de alterações estruturais, tais como deleções, translocações, e duplicações, entre outras. Entretanto, sua presença em *Brachiaria* ainda é pouco explorada.

Em relação à variação na taxa de anormalidades nas plantas diploides, os eventos mais comuns foram aqueles relacionados à orientação e segregação cromossômica irregular, como cromossomos não orientados nas metáfases e cromossomos perdidos nas anáfases, levando à formação de micronúcleos em telófases em duas progênies avaliadas, o que corrobora os dados de Pagliarini et al. (2008), porém o índice de anormalidade nos 16 acessos avaliados em seu trabalho foi mais expressivo, atingindo até 24%.

A segregação irregular dos cromossomos também já foi relatada em outras espécies do gênero como em acessos de *B. brizantha* (Mendes-Bonato, et al., 2002), *B. jubata* (Mendes-Bonato et al., 2006b), além do trabalho de Risso-Pascotto et al., (2003a e 2003b) e Paula et al. (2016) com *B. ruziziensis*. Entretanto, tal comportamento cromossômico não é esperado em acessos diploides, uma vez que o pareamento ocorre em bivalentes. Portanto sugere-se que estas anormalidades sejam resultantes de divergências no tempo de terminalização dos quiasmas ou dificuldade dos microtúbulos do fuso em acessar os cinetócoros (PAGLIARINI et al., 2008).

Assim como Pagliarini et al. (2008), observou-se que a maior parte dos eventos de irregularidades aconteceram na meiose I e há uma grande redução nas fases finais até as tétrades, com exceção do acesso P1-779. Sugere-se então, que a maioria dos cromossomos que apresentavam comportamento irregular retornaram à sua posição normal ao longo da divisão e foram incorporados aos núcleos. Esse comportamento corrobora a descrição de Mendes-Bonato et al. (2002), ao afirmarem que, em geral, os acessos diploides

apresentam algumas anormalidades na primeira divisão, mas a segunda divisão meiótica é sempre muito mais regular e o produto final da meiose é normal. A exceção é um comportamento citológico atípico descrito por Risso-Pascotto et al. (2003b) em um acesso de *B. ruziziensis* diploide. Nos resultados obtidos, os autores observaram algumas anormalidades na meiose I, como esperado. No entanto, na meiose II, a frequência aumentou de forma inesperada. Alguns cromossomos não conseguiram alcançar a placa equatorial e houve assincronia entre a divisão das duas células irmãs. As células com cromossomos não alinhados na placa não receberam o sinal para prosseguir em divisão. Os autores sugeriram que este acontecimento seja proveniente de erros que afetam o “ponto de checagem do fuso”, ou seja, na ligação dos cinetócoros com as fibras do fuso, interrompendo a segunda divisão meiótica.

Em relação à viabilidade de pólen, de acordo com Souza et al. (2002), valores acima de 70% são considerados um percentual alto para viabilidade polínica. Considerando esse indicador, apenas o genótipo P3-779 apresentou baixa taxa de viabilidade na família diploide avaliada. Em um estudo feito por Lutts et al. (1991) e Paula et al. (2014), os acessos diploides chegaram a atingir respectivamente, 82,4% (obtido com o corante carmim acético 1%) e 99,3% (obtido com o corante de Alexander) de viabilidade polínica, o que se assemelha aos dados encontrados para a maioria acessos diploides avaliados no presente trabalho.

Nas análises feitas com os acessos tetraploides observou-se irregularidades na diacinese relacionadas ao pareamento cromossômico, cujas configurações variaram entre univalentes, bivalentes e multivalentes, o que dificultou a confirmação do número de bivalentes associados ao nucléolo. Estes dados corroboram Pagliarini et al (2008) que também observaram cromossomos que se pareavam em bivalentes ou em associações múltiplas nos acessos tetraploidizados de *B. ruziziensis* avaliados.

A presença de univalentes representa falta de homologia entre os cromossomos e menor afinidade entre eles, o que conseqüentemente leva a segregação irregular e formação de gametas desbalanceados. Como as progênies resultam de autofecundação ou de cruzamento intraespecífico, mas que envolveram plantas tetraploidizadas artificialmente com colchicina, sugere-se que a presença de univalentes seja consequência dos efeitos deste alcaloide sobre o pareamento. Driscoll e Barber (1967) e Dover e Riley (1973) já demonstraram que tratamentos pré-meióticos com colchicina (0,5-1%) reduzem o pareamento homólogo, induzindo à sinapse parcial. Em outro estudo, Feldman e Avivi (1988) relataram que a colchicina não suprime o pareamento e o crossing over, mas

interfere no arranjo aleatório dos cromossomos na intérfase, um evento pré-sináptico que é necessário para a regularidade do pareamento.

A presença de multivalentes, por sua vez, indica homologia entre três ou mais cromossomos que também pode acarretar eventos desfavoráveis à segregação na meiose podendo desencadear problemas de esterilidade (JUDD et al., 2009). De acordo com Sybenga (1992), os trivalentes podem segregar II + I ou como III. Os tetravalentes podem segregar como II + II ou como IV. A segregação como II + II é desejável porque pode resultar em gametas balanceados.

Em estudo realizado por Risso-Pascotto et al. (2005), algumas plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas, atingiram mais de 50% de anormalidades na meiose. O índice de anormalidades constatado nas plantas tetraploidizadas avaliadas no presente estudo, assim como nos acessos diploides foi inferior comparado com os dados de Risso-Pascotto et al. (2005), Pagliarini et al. (2008) e Paula et al. (2016).

Apesar das variações nas frequências, os eventos de anormalidades observados nas plantas tetraploides foram semelhantes aos encontrados em acessos diploides, tais como segregação cromossômica irregular. Este tipo característico de anormalidade foram os mesmos relatados por Risso-Pascotto et al. (2005), Pagliarini et al. (2008) e por Paula et al. (2016) em acessos de *B. ruziziensis* tetraploidizados e também foram constatados em outras espécies do gênero. De acordo com Mendes-Bonato et al. (2009) a frequência de segregação cromossômica irregular varia entre acessos e espécies.

A presença de stikiness na metáfase I foi elevada no acesso tetraploide M-686, porém não foram encontrados relatos desta anormalidade em outros estudos com *B. ruziziensis*. As tríades foram observadas em baixa frequência.

Com relação à viabilidade polínica, Paula et al. (2016) relataram uma taxa média de 73 a 85% em acessos tetraploides de *B. ruziziensis* com testes feitos com o corante Alexander, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo, onde o índice médio de viabilidade foi inferior (taxa média de 48,4%). O percentual máximo alcançado pelos acessos tetraploides avaliados em nosso estudo (61,1%) aproxima-se mais dos dados obtidos por Lutts et al. (1991) que obtiveram o percentual de 65,8 de viabilidade polínica, empregando o corante carmim acético 1%.

Assim como observado para os genótipos da família diploide, como não foi constatada uma alta taxa de anormalidade durante a meiose dos genótipos tetraploides, sugere-se que a baixa viabilidade em alguns genótipos possa estar relacionada a erros pós-

meióticos. Entretanto, análises complementares são necessárias para conferir os dados obtidos, tais como a germinação de grãos de pólen *in vivo* e *in vitro* (TECHIO et al. 2006).

O corante de Alexander empregado nesse estudo possui propriedades químicas básicas e ácidas e assim cora não somente os grãos viáveis como os inviáveis, nas cores roxas e verdes, respectivamente, o que sugere-se confiabilidade nas análises. Mas ainda existe uma variável que pode afetar os dados e viabilidade que é a etapa de fixação do grão de pólen, a qual pode interferir na conservação das características originais dos grãos e afetar a coloração (TECHIO et al. 2006).

De acordo com Techio et al. (2006) deve-se levar em consideração que a viabilidade do pólen pode variar significativamente entre indivíduos de uma mesma espécie assim como amostras vindas de um mesmo indivíduo. Também fatores abióticos e a diferença entre os genótipos podem contribuir para a divergência de dados obtidos nos trabalhos.

6 CONCLUSÃO

A microsporogênese dos genótipos diploides e tetraploides de *B. ruziziensis* avaliados nesse estudo foi regular, com baixas taxas de anormalidades.

As progênies das plantas diploides e tetraploides apresentaram comportamento meiótico semelhante às respectivas plantas mães.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, M. J.; BOTREL, M. ANDRADE de; Xavier, D. F.; **As principais espécies de *Brachiarias* utilizadas no país.** Comunicado Técnico.p. 3. ISSN.1678. 3131, Juiz de Fora, dezembro, 2002.
- BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n.11, p.2297, 1987.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, Cambridge,v. 104, n. 407, p. 157-172, jan 2001.
- BOTREAL, M.A.; ALVIM, M. J.; MOZZER, O. L. Avaliação agrônômica de gramíneas forrageiras sob pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 9/10, p. 1019-1025, set./out. 1987.
- BUSTAMANTE, F. O., ROCHA, L. C., TORRES, G. A., DAVIDE, L. C., MITTELMANN, A., TECHIO, V. H. Distribution of rDNA in Diploid and Polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and Fragile Sites in 45S rDNA Regions. **Crop Science**, Madison, 54(2), 617-625, 2014.
- DARLINGTON C. D.; WYLIE A. P.; **Chromossome atlas of flowering plants.** London: Allen and Unwin, 519p, 1995.
- DOVER, G. A.; RILEY, R. The effect to spindle inhibitors applied before meiosis on meiotic chromosome pairing. **Journal of. Cell. Science**, Cambridge., v. 12, p. 143-161, 1973.
- DRISCOLL, C. J.; BARBER, H. N. Effect of colchicine on meiosis of hexaploid wheat. **Nature**, Kensington, v. 216, p. 687-688, 1967.
- FELDMAN, M. AVIVI, L. Genetic control of bivalent pairing in common wheat. The mode of Ph1 action. **Kew chromosome conference III**, Brandham, p. 269-279, 1988.
- FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: **Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**, 45, 2000, São Carlos. Programa e Resumos. São Carlos: UFSCar, p.235, 2000.
- GHAFFARI, R., CANNON, E. K., KANIZAY, L. B., LAWRENCE, C. J., & DAWE, R. K. Maize chromosomal knobs are located in gene-dense areas and suppress local recombination. **Chromosoma**, Heidelberg 122(1-2), 67-75, 2013.
- GIUSSANI, L. M. et al., A molecular phylogeny of the Grass subfamily Panicoideae(Poaceae) shows multiple origins of C4 photosynthesis. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.88, p. 1993- 2012, 2001.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Senso Agropecuário 2006.** Sidra – Banco de dados agregados. Brasília: IBGE, 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>>. Acesso em: 20 set. 2015.

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

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., & DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora. 2009.

KSIAŻCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKI, Z. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. **Journal of applied genetics**, Wien, 51.4: 449-460, 2010

LUCKETT, D. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton,. **Euphytica**, Wageningen, v.42, n.1-2, p.177-182, 1989.

LUTTS,S.; NDIKUMANA,J.; LOUANT,B.P. Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interespecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic behavior, pollen viability and seed set, **Euphytica**, Wageningen. v.57, n. 3, p.267-274, sept. 1991.

MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R. A. **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. p.35-65, 2006.

MCCLINTOCK, B. Chromosome constitutions of Mexican and Guatemalan races of maize. In: **Moore J (ed) Genes cells and organisms**. Garland, New York, pp 395–406, 1987.

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

MENDES-BONATO, A. et al. Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 4, p. 711-714, 2006a.

MENDES-BONATO, A. et al. Cromosse number and meiotic behaviour in *B. jubata* (Gramineae). **Journal of genetics**, Bangalore, vol.85, n. 1, april, 2006b.

MENDES-BONATO, A. et al. Abnormal meiosis in tetraploid genotypes of *Brachiaria brizantha* (Poaceae) induced by colchicine: its implications for breeding. **Journal Applied Genetics**, Wien, v. 50, n. 2, p. 83–87, 2009.

NANI, T. F., CENZI, G., PEREIRA, D. L., DAVIDE, L. C.; TECHIO, V. H. Ribosomal DNA in diploid and polyploid *Setaria* (Poaceae) species: number and distribution. **Comparative cytogenetics**, Petersburg 9(4), 645, 2015.

NANI, T. F., PEREIRA, D. L., SOUZA SOBRINHO, F.,; TECHIO, V. H. Physical Map of Repetitive DNA Sites in spp.: Intravarietal and Interspecific Polymorphisms. **Crop Science**, Madison, v. 56, n. 4, p. 1769-1783, 2016.

PAGLIARINI, M. S.; RISSO-PASCOTTO, C.; SOUZA-KANESHIMA, A. M.; VALLE, C. B. do; Analysis of meiotic behavior in selecting potential genitors among diploid and

artificially induced tetraploid accessions of *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 64. p. 181–187, 2008.

PAULA, C. M. P. de; TECHIO, V. H.; BENITES, F. R. G.; SOUZA SOBRINHO; F. de; Intra-inflorescence pollen viability in accessions of *Brachiaria ruziziensis*. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences. Maringá, Apr.-June. v. 36, n. 2, p. 209-213, , 2014.

PAULA, C. M. P. de. 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, 2016.

PEREIRA, A. V. et al. Melhoramento de forrageiras Tropicais. In NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARESINGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso. p. 549-602, 2001.

PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, 2012.

PIZARRO, E. A. et al. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical América- Savannas. In: MILES, J.W.; MAAS, B.L.; VALLE, C.B. do (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy, an improvement**. Cali: CIAT. cap.15, p. 225-246, 1996.

RAO, I. M.; KERRIDGE, P.C.; MACEDO, M.C.M. Nutrition requirements of *Brachiaria* and adaptation to acid soils. In: MILES, J. W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. do (ed). **Brachiaria: biology, agronomy, an improvement**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Tropical Forages Program and Communications Unit; Campo Grande, Brazil, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, p.53-71 (CIAT Publication, n ° 259), 1996.

RISSO-PASCOTTO, C; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do; A mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. **Genome**, Canadá, v. 46, n.4. p. 724-728, 2003a.

RISSO-PASCOTTO, C.; MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Comportamento citológico atípico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens*. **Boletim de pesquisa e Desenvolvimento 16**: Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 29 p., 2003b.

RISSO-PASCOTTO, C.; VALLE, C. B. do. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant cell reports**, Coverage, 23(8), 522-527, 2005.

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

SENDULSKY, T. Chave para identificação de *Brachiaria*. **Jornal Agroceres**, São Paulo, v. 5, n. 56, p. 4-5, 1977.

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

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Chromosome duplication in *Brachiaria* (*A. rich.*) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, n. 4, p. 328-334, 2009.

SWENNE, A.; LOUANT, B.; DURJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agronomie Tropicale**, Paris, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forragens no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. 5. 2005, Lavras. **Anais...** Lavras UFLA/FAEPE, 2005.

SOUZA SOBRINHO F de, et al. Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite. In: **Simpósio de forrageiras e pastagens**, Anais. Lavras: UFLA, p 98•111, 2009.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera, e viabilidade polínica em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

SYBENGA, Jacob. **Cytogenetics in plant breeding**. Springer Science & Business Media, 1992.

TECHIO, V. H., DAVIDE, L. C., PEDROZO, C. Â., VANDER PEREIRA, A. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, 28(1), 7-12, 2006.

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

TORRES GONZÁLES 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, 2005.

VALLE, CB do; SINGH, R. J.; MILLER, D. A. Pachytene chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Plant breeding**, United Kingdom, 98.1: 75-78, , 1987.

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

VALLE, C. B. do; BONATO, A. L.V.; PAGLIARINI, M.S.; RESENDE, R. M. S.; JANK, L. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. (Org.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias e estudos de apomixia**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, v. 1, p. 47-65, 2004.

VALLE, C.B. DO; PAGLIARINI, M.S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*.
In: SINGH, R.J. (Ed.) **Genetic resources, chromosome engineering and crop
improvement**. Boca Raton, v.5, p.103-151. 2009.