



BRUNA NATALIA VELOSO DOS SANTOS

**ANÁLISE CITOGENÔMICA REVELA PADRÕES DE
SEQUÊNCIAS REPETITIVAS NOS CROMOSSOMOS DE
ESPÉCIES DO COMPLEXO 'HUMIDICOLA' DE *UROCHLOA*
P. BEAUV.**

**LAVRAS - MG
2024**

BRUNA NATALIA VELOSO DOS SANTOS

**ANÁLISE CITOGENÔMICA REVELA PADRÕES DE SEQUÊNCIAS
REPETITIVAS NOS CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES DO COMPLEXO
'HUMIDICOLA' DE *UROCHLOA P. BEAUV.***

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

Prof. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

**LAVRAS - MG
2024**

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

Santos, Bruna Natalia Veloso dos.

Análise citogenômica revela padrões de sequências repetitivas nos cromossomos de espécies do complexo '\humidicola' de Urochloa P. Beauv. / Bruna Natalia Veloso dos Santos. - 2024.
62 p.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.
Bibliografia.

1. Brachiaria. 2. satDNA. 3. poliploidia. I. Techio, Vânia Helena. II. Título.


BRUNA NATALIA VELOSO DOS SANTOS

**ANÁLISE CITOGENÔMICA REVELA PADRÕES DE SEQUÊNCIAS
REPETITIVAS NOS CROMOSSOMOS DE ESPÉCIES DO COMPLEXO
'HUMIDICOLA' DE *UROCHLOA P. BEAUV.***

**CYTOGENOMIC ANALYSIS REVEALS PATTERNS OF REPETITIVE
SEQUENCES IN CHROMOSOMES OF SPECIES OF THE 'HUMIDICOLA'
COMPLEX OF *UROCHLOA P. BEAUV.***

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

APROVADA em 28 de junho de 2024.
Dra. Giovana Augusta Torres, UFLA
Dr. Caio Túlio Rodrigues Corrêa - AAFC
Dra. Renata De Castro Nunes – AGROCROP
Dra. Magdalena Vaio Scvortzoff – Urep

Documento assinado digitalmente
 **VANIA HELENA TECHIO**
Data: 27/09/2024 14:33:34-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

**LAVRAS - MG
2024**

A todas que participaram e me
acompanharam nessa jornada

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho, sem o qual esta pesquisa não teria sido possível.

À Embrapa Gado de Corte e Gado de Leite, pela parceria e disponibilização das plantas.

A todos os professores e professoras do programa de Genética e Melhoramento de Plantas, por contribuírem com a minha formação.

Agradeço a professora Dra. Vânia Helena Techio, pela orientação, apoio, confiança e dedicação, atenção, disponibilidade, e todos os momentos que esteve presente me incentivando tanto durante a pandemia, e até os dias de hoje. Por todas as conversas e pessoas que me motivaram a chegar até aqui e a produzir este lindo trabalho com muito carinho e dedicação.

Obrigado ao Rafael, Ana Gabriela, Marco Túlio, Caio pelos vários momentos de troca de saberes. Em especial Rafael por me ajudar na confecção das lâminas durante todo trabalho.

Obrigado ao Caio pelas dicas de protocolo e pelas sondas compartilhadas. Obrigada pelas dicas e explicações sobre assuntos que envolvem bioinformática.

Aos meus amigos e amigas de Alta Floresta MT, em especial Vinícius Delgado, pelos 12 anos de amizade e convivência, participando de todas as minhas realizações e dificuldades.

Aos meus pais, em especial minha mãe, Florice de Jesus Veloso, por todo o amor e incentivo. Obrigada por sempre fazer de tudo para que eu realizasse meus sonhos e não medir esforços para que eu chegasse até aqui. Obrigada por todo aprendizado e todos os conselhos, obrigada pelo amor infinito e carinho. Mesmo longe sempre orando por mim e estando ao meu lado.

Ao meu esposo Otávio, pelos momentos que esteve ao meu lado me, por me apoiar e incentivar sempre, pelo carinho e companheirismo de sempre.

Por fim, obrigada a todos que participaram dessa trajetória!

RESUMO

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (*Brachiaria* (Trin.) Griseb.), conhecido por sua importância agronômica, inclui espécies como *Urochloa humidicola* e *Urochloa dictyoneura*, que formam o complexo 'humidicola'. Essas espécies são conhecidas por suas características morfológicas semelhantes, gerando debates taxonômicos sobre sua classificação. O objetivo deste estudo foi localizar sequências repetitivas satDNA nos cromossomos de acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, por meio de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a fim de contribuir para o conhecimento da estrutura e composição dos genomas. As análises revelaram variações significativas na distribuição, intensidade e padrão dos sinais de FISH entre os acessos avaliados. Os padrões de hibridização das sequências satDNA mostraram uma complexidade genômica substancial, refletindo rearranjos cromossômicos e variações no número de cópias das sequências repetitivas. A comparação entre *U. humidicola* e *U. dictyoneura* revelou a conservação de algumas sequências satDNA, alinhando-se ao "modelo de biblioteca", onde espécies relacionadas compartilham um repertório de satDNAs herdados de um ancestral comum. No entanto, variações interespecíficas também foram observadas, refletindo a rápida evolução desses elementos repetitivos. Os resultados deste estudo expandem significativamente o conhecimento sobre a estrutura e organização do genoma de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*. A identificação de padrões distintos de hibridização de satDNA entre os citótipos e espécies sugere que esses marcadores podem ser úteis na discriminação de cromossomos e na compreensão das relações evolutivas dentro do gênero *Urochloa*.

Palavras-chave: *Brachiaria*; satDNA; poliploidia; FISH.

ABSTRACT

The genus *Urochloa* P. Beauv. (Brachiaria (Trin.) Griseb.), known for its agronomic importance, includes species such as *Urochloa humidicola* and *Urochloa dictyoneura*, which form the 'humidicola' complex. These species are noted for their similar morphological characteristics, leading to taxonomic debates regarding their classification. The objective of this study was to locate satDNA repetitive sequences on the chromosomes of *U. humidicola* and *U. dictyoneura* accessions using fluorescence in situ hybridization (FISH) in order to enhance the understanding of the genome structure and composition. The analyses revealed significant variations in the distribution, intensity, and pattern of FISH signals among the evaluated accessions. The hybridization patterns of satDNA sequences demonstrated substantial genomic complexity, reflecting chromosomal rearrangements and variations in the copy number of repetitive sequences. The comparison between *U. humidicola* and *U. dictyoneura* revealed the conservation of certain satDNA sequences, consistent with the "library model," where related species share a repertoire of satDNAs inherited from a common ancestor. However, interspecific variations were also observed, reflecting the rapid evolution of these repetitive elements. The results of this study significantly expand the understanding of the genomic structure and organization of *U. humidicola* and *U. dictyoneura*. The identification of distinct satDNA hybridization patterns among cytotypes and species suggests that these markers can be useful in chromosome discrimination and in understanding the evolutionary relationships within the genus *Urochloa*.

Keywords: *Brachiaria*; satDNA; polyploid; FISH.

INDICADORES DE IMPACTO

Esta pesquisa conduziu uma análise citogenômica do complexo 'humidicola' de *Urochloa*, revelando padrões de sequências repetitivas dentro dos cromossomos. O trabalho teve como objetivo localizar sequências repetitivas satDNA nos cromossomos de acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, por meio hibridização in situ fluorescente (FISH), a fim de contribuir para o conhecimento da estrutura e composição dos genomas. As descobertas são essenciais para compreender a evolução e a variação genômica dessas espécies. Ao empregar FISH, localizamos sequências repetitivas de satDNA em *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, aprofundando nossa compreensão da estrutura e composição do genoma. Nosso estudo fornece uma base para aplicações em taxonomia, evolução e melhoria de gramíneas forrageiras, beneficiando regiões pastoris. Os resultados ressaltam a importância da pesquisa científica e das universidades no avanço da biotecnologia agrícola e no suporte aos programas de melhoramento de forrageiras. Este trabalho se alinha com o foco da Política Nacional de Extensão em educação, tecnologia e produção.

IMPACT INDICATORS

This research conducted a cytogenomic analysis of the *Urochloa* 'humidicola' complex, revealing repetitive sequence patterns within chromosomes. The objective was to localized repetitive satDNA sequences on the chromosomes of *U. humidicola* and *U. dictyoneura* accessions using fluorescence in situ hybridization (FISH), contributing to the understanding of genome structure and composition. The findings are essential for comprehending the evolution and genomic variation of these species. By employing FISH, we localized repetitive satDNA sequences in *U. humidicola* and *U. dictyoneura*, deepening our understanding of genome structure and composition. Our study provides a foundation for applications in taxonomy, evolution, and forage grass improvement, benefiting pastoral regions. The results highlight the importance of scientific research and universities in advancing agricultural biotechnology and supporting forage breeding programs. This work aligns with the focus of the National Extension Policy on education, technology, and production.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Aspectos botânicos, taxonômicos e filogenéticos de <i>Urochloa</i>	12
2.2 Características citogenéticas de <i>Urochloa</i>, com ênfase no complexo <i>humidicola</i>.	15
2.3 DNA repetitivo	18
2.3.1 Elementos Transponíveis	209
2.3.2 Elementos transponíveis classe I – transposição por RNA	20
2.3.3 Elementos transponíveis de Classe II – transposição por DNA	21
3. Sequências repetitivas em tandem	22
4. Aplicação de Sequências repetitivas para cariotipagem	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Material Vegetal	29
5.2 Extração de DNA, preparação e marcação das sondas	30
5.3 Preparações cromossômicas e FISH	31
6. RESULTADOS	34
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
DADOS SUPLEMENTARES	60

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Urochloa* P. Beauv. [syn. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.] inclui 102 espécies (Powo, 2024), originárias da África, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais e que desempenham um papel crucial na produção de forragem para alimentação do gado. O gênero tem se destacado entre as forrageiras devido às suas características desejáveis, como resistência a solos ácidos e secos, adaptação a uma variedade de climas e rápida capacidade de rebrota, (Jank *et al.* 2014; Ferreira *et al.* 2021; Simeão, 2021). Contudo, a complexidade genômica de suas espécies, marcada pela poliploidia e hibridização, dificulta a compreensão de suas relações evolutivas.

Três das espécies de *Urochloa* agronomicamente mais importantes, formam o complexo agâmico denominado 'brizantha', sendo estas: *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster e *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins. O segundo complexo, conhecido como 'humidicola', inclui *Urochloa humidicola* Morrone & Zuloaga e *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) (Lutts *et al.* 1991; Maass, 1996; Renvoize; Clayton; Kabuye, 1996).

As espécies do complexo 'humidicola', em particular, compartilham características morfológicas semelhantes, de forma que alguns autores propuseram se tratar da mesma espécie (Veldkamp, 1996; Sosef, 2016; Masters, 2021), inclusive a própria plataforma Plants of the World Online (Powo, 2024), considera *U. humidicola* como sinônimo de *U. dictyoneura*. No entanto, análises moleculares apontam para a existência de duas espécies distintas, (Torrez-Gonzales 2005; Salariato, 2010; Trivino, 2017). Essa divergência entre informações morfológicas e moleculares evidencia a necessidade de estudos mais detalhados para elucidar as relações entre as duas espécies. Nesse estudo, consideramos *U. humidicola* e *U. dictyoneura* como espécies distintas.

Os estudos citogenéticos das espécies de *Urochloa* surgem como um aliado para caracterização do germoplasma. Tanto *U. humidicola* e *U. dictyoneura* possuem $x = 6$ como número básico de cromossomos (Boldrini; Pagliarini; Valle, 2006; Risso-Pascotto *et al.* 2006; Boldrini *et al.* 2009a, 2009b). Em *U. humidicola*, há relatos de hexaploides, heptaploides e nonaploide, enquanto *U. dictyoneura* varia de tetraploide, heptaploide e nonaploide (Bernini; Marin-Morales, 2001; Penteado *et al.* 2000; Boldrini; Pagliarini; Valle, 2009; Jungmann *et al.* 2010; Damasceno *et al.* 2023). Até o momento não foram descritos indivíduos diploides, porém, a identificação de um indivíduo sexual e aneuploide em *U. humidicola* (H031, $2n=6x=36+1$)

por Damasceno *et al.* (2023), destacam a necessidade de estudos mais aprofundados para compreender a origem e a evolução dos diferentes níveis de ploidia neste grupo.

A caracterização citogenética de *U. humidicola* avançou com o estudo de Damasceno *et al.* (2023) com a montagem de idiogramas e mapeamento dos sítios de DNA ribossomal. Todavia, a complexidade genômica dessas espécies, especialmente devido aos altos níveis de poliploidia, demanda a utilização de sequências repetitivas, tais como os satélites (satDNA) para maior detalhamento dos cariótipos. Nesse contexto, as sequências satDNA representam uma promissora alternativa para identificar marcas espécie-específicas; genoma-específicas ou compartilhadas a fim de auxiliarem na detecção de rearranjos cromossômicos e relações entre as espécies de forma conclusiva (He *et al.* 2024).

Sob essa perspectiva, os estudos de Tomaszewska *et al.* (2023) e Corrêa *et al.* (dados não publicados) destacam o grande potencial das sequências repetitivas para esclarecer as relações filogenéticas em *Urochloa*. Embora o trabalho de Tomaszewska *et al.* (2023) não tenha analisado diferentes espécies nem comparado citótipos de *U. humidicola*, os resultados das marcações sugerem a presença dos genomas A, B e possivelmente C. Por outro lado, a análise bioinformática conduzida por Corrêa *et al.* (dados não publicados) no complexo "brizantha" revelou que o DNA repetitivo total varia entre 56,26% em *U. brizantha* 2x, 57,75% em *U. ruzizensis*, 62,48% em *U. decumbens* 2x, 64,78% em *U. decumbens* 4x e 65,52% em *U. brizantha* 4x.

Entre as sequências repetitivas, o DNA satélite (satDNA) se organiza em longos arranjos tandem, composto por famílias de sequências curtas, não codificantes e altamente repetitivas. O satDNA pode representar uma fração importante do genoma, variando de 2,62% a 3,86% em *Urochloa* (Corrêa *et al.* dados não publicados), sendo reconhecido como a mais variável do genoma eucarioto (Garrido-Ramos, 2017). Essas sequências são caracterizadas por sua instabilidade evolutiva, impulsionada por diversos mecanismos, como atividade transposicional, mutações e ampliações, refletindo sua rápida trajetória de mudanças evolutivas (Belyayev *et al.* 2019). Essa rápida evolução desses elementos repetitivos pode oferecer insights sobre a dinâmica evolutiva dentro e entre as espécies. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi localizar sequências repetitivas satDNA nos cromossomos de acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, por meio hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a fim de contribuir para o conhecimento da estrutura e composição dos genomas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos botânicos, taxonômicos e filogenéticos de *Urochloa*

Urochloa P. Beauv (sin. *Brachiaria* (Trin.) Grisebach) é um importante gênero paleotropical de gramíneas forrageiras pertencente à tribo Paniceae, subfamília Panicoideae e a família Poaceae. Atualmente, o gênero possui 102 espécies aceitas (Powo, 2024), das quais 12 são predominantemente encontradas em savanas africanas (Torres González; Morton, 2005). Destacam-se entre as espécies do gênero *Urochloa* aquelas amplamente cultivadas como forrageiras, incluindo *U. decumbens*, *U. ruziziensis*, *U. humidicola*, e *U. brizantha* (Valle; Pagliarini, 2009).

Urochloa é um gênero baseado na espécie *Urochloa panicoides* e foi primeiramente descrito por Palisot de Beauvois em 1812. *Brachiaria* foi inicialmente estabelecida como uma seção do gênero *Panicum* L. (Trinius, 1826), sendo posteriormente elevada ao status de gênero por Grisebach em 1853. Dada a significância econômica desse gênero, diversos estudos foram conduzidos para desenvolver chaves botânicas, realizar caracterizações morfológicas e conduzir análises moleculares, com o objetivo de delimitar e resolver as incertezas que cercam a distinção entre *Brachiaria* e *Urochloa*.

Um dos critérios fundamentais na diferenciação entre os gêneros *Brachiaria* e *Urochloa* tradicionalmente baseava-se na presença ou ausência de uma arista (prolongamento fino e pontiagudo da inflorescência das gramíneas), curta surgindo do topo do lema fértil e na posição da espiguetas (seja com a gluma inferior voltada para o eixo ou afastada dele). No entanto, as fronteiras entre os dois gêneros eram confundidas por um número de espécies intermediárias (Oulo; Van Der Zon; Sosef, 2023). Notavelmente, o trabalho de Webster (1987), Morrone e Zuloaga (1992) e Torres-González e Morton (2005), que abrange tanto pesquisa morfológica quanto filogenética, mostrou que sua distinção não pode ser mantida e propuseram a fusão dos dois gêneros (Oulo; Van Der Zon; Sosef, 2023).

Sendo *Urochloa* o nome genérico mais antigo, várias espécies foram realocadas de *Brachiaria* para *Urochloa* ou agrupadas em outros gêneros de Paniceae (Webster 1987; Morrone; Zuloaga 1992, 1993; Ashalantha; Nair 1997; Torres-González; Morton, 2005). Logo, as espécies de *Urochloa* são caracterizadas por uma inflorescência racemosa, com espiguetas comprimidas dorsi-ventralmente desarticuladas em sua base, que são circundadas pela gluma

inferior, e a pálea da florzinha superior delimitada em seu ápice pelo lema (Oulo; Van Der Zon; Sosef, 2023). Apesar da nova taxonomia, a maioria dos especialistas em gramíneas africanas ainda está relutante em adotar essa ideia. Como resultado, muitas espécies africanas anteriormente classificadas como *Brachiaria* ainda não foram renomeadas como *Urochloa*, o que contribui para aumentar as controvérsias (Oulo; Van Der Zon; Sosef, 2023).

As características específicas dentro do gênero *Urochloa* são frequentemente insuficientes, complexas ou demasiado sutis para sua delimitação precisa. Como resultado, a literatura tem relatado a distribuição de indivíduos e acessos com nomes incorretos. Entre as causas dos problemas taxonômicos em *Urochloa* estão: a) a semelhança com outras espécies de Poaceae, juntamente com pequenas diferenças na morfologia das flores, b) a descrição do grupo baseada em uma única espécie e c) a variação dos caracteres morfológicos entre as espécies (Morrone; Zuloaga, 1992).

As espécies de *Urochloa* foram inicialmente agrupadas por afinidades morfológicas da inflorescência, especialmente a espiguetas compartilhada entre as espécies. Essa organização resultou em nove grupos, dos quais o grupo 5 composto por *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* e o grupo 6 composto por *U. humidicola*, *U. dictyoneura* e *U. jubata* (Fig. Et De Not.) Stapf (Renvoize; Clayton; Kabuye, 1996).

Algumas espécies de *Urochloa* apresentam uma mistura de indivíduos sexuais e apomíticos, como *U. decumbens*, *U. humidicola*, *U. dictyoneura*, *U. jubata* e *U. brizantha*. Essas espécies frequentemente formam complexos agâmicos (Miles; Valle, 1996). O termo "complexo" refere-se a indivíduos com diferentes níveis de ploidia, incluindo genótipos diploides geralmente sexuais e poliploides apomíticos, permitindo a ocorrência de recombinação genética dentro do complexo agâmico (Valle; Savidan, 1996). Neste gênero, destacam-se dois complexos agâmicos (Renvoize; Clayton; Kabuye, 1996), o primeiro, denominado 'brizantha', composto por: *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster e *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins. O segundo complexo, conhecido como 'humidicola', inclui as espécies: *Urochloa humidicola* Morrone & Zuloaga e *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.). Por pertencerem ao mesmo complexo agâmico, pode haver fluxo gênico dada a proximidade filogenética entre essas espécies (Valle, 1990; Miles; Valle, 1996).

As espécies do complexo 'humidicola' compartilham características morfológicas muito semelhantes, tornando desafiadora sua identificação (Renvoize; Clayton; Kabuye, 1996), tanto, que alguns autores propuseram se tratar da mesma espécie (Veldkamp, 1996; Sosef, 2016; Masters, 2021). No entanto, divergências persistem na literatura, com autores mantendo a separação entre elas, como evidenciado por Roche; Menéndez; Hernández (1990) ao descrever suas características morfológicas. A incerteza taxonômica é ressaltada pelo reconhecimento, atualmente, por parte da plataforma Plants of the World Online (Powo, 2024), que considera *U. humidicola* como sinônimo de *U. dictyoneura*, destacando a complexidade e as questões em torno da taxonomia e identificação dessas espécies.

De acordo com os bancos de dados de nomenclatura do Jardim Botânico do Missouri (Tropicos), *U. dictyoneura* foi anteriormente classificada como *U. humidicola*, *Panicum dictyoneura* e *P. humidicola*. Por outro lado, *U. humidicola* já recebeu diversas denominações, incluindo *U. dictyoneura* subespécie *humidicola*, *U. dictyoneura* e *Brachiaria rautanenii*. Embora apresentem muitas semelhanças morfológicas e representem um desafio para o reconhecimento, *U. dictyoneura* se diferencia pela presença, na face abaxial, de um anel visível que resulta da união entre a bainha e o limbo, característica ausente em *U. humidicola* (Roche; Menéndez; Hernández, 1990; Morrone; Zuloaga, 1992).

Entre as características morfológicas, *U. dictyoneura* e plantas estoloníferas perenes que formam tufos e touceiras (Renvoize; Clayton; Kabuye, 1996), com ramos ascendentes de 38 a 100 cm de altura, seus estolões chegam a até 1,5 m de comprimento. Colmos eretos, delgados e duros. Os internos são de coloração verde a roxa, ovais. Nó verde claro a roxo escuro com anel piloso. Folhas pilosas, lígula ciliada membranosa. No lado externo ou abaxial na junção da lâmina e a bainha, apresenta um anel membranoso, rígido e saliente. A folha bandeira com 3 cm de comprimento, bainha de 16 a 28 cm, pouco pilosa na base. Inflorescência em panicola racemosa, raques verdes a roxa em forma de zigzag com pelos largos em ambos os lados. As espiculas obovoides e obtusas com tendência ao ápice de cor verde com sobretons roxos e dispostos em duas series. Gluma verde com sobretons roxos, glabra. Lema membranoso e piloso. A palea da flor inferior masculina e hialina. A flor superior é hermafrodita com a lema e a palea da mesma cor e textura (Roche; Menéndez; Hernández, 1990; Veldkamp, 1996).

U. humidicola apresenta plantas estoloníferas perenes, com ramos que variam de 38 a 60 cm de altura. Os estolões podem atingir 1,2 m de comprimento. Folhas com 3 a 10 cm de

comprimento e 1,0 a 1,2 cm de largura. Colmos eretos, finos e duros, glabros. Lâminas foliares lineares, glabra ou levemente peluda na base, duras e ásperas, estreitas, verdes e roxas nas bordas. A folha bandeira é pequena ou imperceptível de 0,1 a 3 mm de comprimento. Inflorescência em uma panícula racemosa, raquis finamente denticulados, glabro de cor verde a morado. Gluma inferior verde-clara a roxa, glabra e gluma superior verde-claro, um tanto peluda. Flor inferior masculina com lema ovóide de cor e textura semelhante à gluma superior com 5 veias, quase glabra. Flor superior hermafrodita. Lema obovóide, verde claro ou esbranquiçada, com rugosidade transversal. Palea semelhante em textura e cor ao lema fértil (Roche; Menéndez; Hernández, 1990; Morrone; Zuloaga, 1992).

Vários estudos confirmaram que *U. dictyoneura* e *U. humidicola* são filogeneticamente próximas. As reconstruções filogenéticas utilizando regiões ITS (internal transcribed spacer - ITS) de DNA ribossômico, sequências de genes cloroplastidiais (*rpl16*, *trnL intron*, *trnL-F spacer* e *ndhF*) e marcadores microssatélites mostraram que *U. dictyoneura* e *U. humidicola* são intimamente relacionadas (Torres González; Morton, 2005; Salariato *et al.* 2009; Vigna *et al.* 2011; Santos *et al.* 2015; Diamante *et al.* 2020). Visto a alta similaridade morfológica, a controvérsia em relação ao status taxonômico permanece. Contudo, há uma tendência na literatura botânica atual (Sosef, 2016; Masters, 2021; Oulo *et al.* 2023; Powo, 2024) em aceitar a proposta de Veldkamp (1996) de se tratar da mesma espécie, assumindo a nomenclatura como *U. dictyoneura* (Oulo *et al.* 2023; Powo, 2024).

2.2 Características citogenéticas de *Urochloa*, com ênfase no complexo *humidicola*.

Para o desenvolvimento de programas de melhoramento de *Urochloa* são necessárias informações citogenéticas que envolvam a determinação do nível de ploidia, número básico de cromossomos e comportamento meiótico com o intuito de direcionar os cruzamentos a fim de obter híbridos intra e interespecíficos (Valle; Pagliarini, 2009).

O modo de reprodução das espécies do gênero *Urochloa* é predominantemente por apomixia (Valle; Savidan, 1996;), um processo reprodutivo assexuado no qual os óvulos evitam a meiose e formam sementes sem fertilização, resultando em clones genéticos do progenitor feminino (Moraes *et al.* 2023). A apomixia presente em *Urochloa* é do tipo apospórica com pseudogamia, que requer a formação de gametas férteis para produção de sementes viáveis (Fuzinatto *et al.* 2012). A aposporia é caracterizada pela diferenciação de células nucelares

adjacentes em sacos embrionários não reduzidos, processo denominado apomeiose, seguido pelo desenvolvimento do óvulo não reduzido em um embrião sem fertilização (partenogênese) (Xiong *et al.* 2023).

A apomixia geralmente está associada às espécies poliploides, enquanto a sexualidade é mais comum em indivíduos diploides (Valle; Pagliarini, 2009). Frequentemente, essas espécies formam complexos agâmicos, como é o caso de *U. ruzizensis*, *U. decumbens* e *U. brizantha*, assim como *U. humidicola* e *U. dictyoneura* (Miles; Valle, 1996). Esse "complexo" refere-se a indivíduos com diferentes níveis de ploidia, incluindo genótipos diploides normalmente sexuais e poliploides apomíticos, nos quais a recombinação genética pode ocorrer (Valle; Savidan, 1996).

Em relação ao número básico de cromossomos, foram descritos para *Urochloa* $x = 5, 7, 8, 9, 10$ e 12 , porém $x = 9$ tem sido frequentemente encontrado entre as espécies estudadas (Hubbard, 1948; Christopher; Abraham, 1976; Basavaiah; Murthy, 1990; Morrone; Zuloaga, 1992; Valle; Savidan, 1996; Penteado *et al.* (2000). Essa diversidade de número básico reflete no número de cromossomos do gênero com espécies com $2n = 14$ à $2n = 90$ cromossomos (Valle; Pagliarini, 2009), bem como indivíduos diploides até nonaploides (Jungmann *et al.* 2010).

Inicialmente, para o complexo "humidicola", foi sugerido $x = 7$ e $x = 9$ como número básico de cromossomos (Valle; Pagliarini, 2009), adotados para a maioria das espécies do gênero. No entanto, estudos meióticos posteriormente revelaram um número básico de $x = 6$ (Risso-Pascotto; Pagliarini; Valle, 2006ab; Boldrini *et al.* 2006 e 2009ab), enquanto contagens cromossômicas sugeriram a formação de uma série poliploide nesse complexo (Sosef, 2016). A confirmação desse número básico para *U. dictyoneura* ($2n=24$) se baseou, principalmente, na formação de seis conjuntos de tetravalentes nas diacineses em um dos acessos avaliados (Risso-Pascotto; Pagliarini; Valle, 2006a), pressupondo a autotetraploidia. Em acessos de *U. humidicola*, a confirmação foi feita a partir de observações em acessos com 42 cromossomos, porém com comportamento de alopoliploide (Boldrini *et al.* 2006 e 2009ab).

No complexo "humidicola" tem sido evidenciado a ocorrência de citótipos tetraploides ($2n=24$, Risso-Pascotto; Pagliarini; Valle, 2006ab), heptaploides ($2n=42$, Carnahan; Hill, 1961) e nonaploides ($2n=54$, Valle, 1986) para *U. dictyoneura*, e citótipos hexaploides ($2n=36$, Boldrini *et al.* 2011b), heptaploides ($2n=42$, Boldrini *et al.* 2006; 2009a) e nonaploides ($2n=54$, Adamowski *et al.* 2007; Boldrini *et al.* 2011a) para *U. humidicola* (sin. *U. dictyoneura*). Não há descrições de acessos diploides, e apenas um representante de *U. humidicola* foi reportado

como tendo reprodução sexual (H031). No entanto, recentemente, o acesso H031 foi identificado como aneuploide ($2n=6x=36+1$) e possivelmente considerado um híbrido (Damasceno *et al.* 2023).

Para Vigna *et al.* (2016), o acesso H031 (sexuais) têm sua origem atribuída ao cruzamento entre uma planta fêmea sexual diploide ($2n = 2x = 12$, genoma A) e um macho apomítico tetraploide ($2n = 4x = 24$, genoma B), resultando em um triploide ($2n = 3x = 18$, ABB) após a meiose. Uma segunda hipótese sugere que o triploide possa ter surgido do cruzamento entre dois pais diploides ($2n = 2x = 12$), com um contribuindo com um gameta reduzido ($n = 6$, genoma A) e o outro com um gameta não reduzido ($n = 12$, genoma B). Posteriormente, por duplicação natural dos cromossomos, teria se formado um alohexaplóide ($2n = 6x = 36$, AABBBB) (Vigna *et al.* 2016).

Um dos primeiros estudos cariotípicos foi publicado por Bernini e Marin- Morales (2001) incluiu a avaliação de 12 acessos de cinco espécies do grupo (*U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola*, *U. jubata* e *U. ruziziensis*). No entanto, este estudo não forneceu dados para *U. dictyoneura* e ainda considerou $x=9$ como o número básico de cromossomos na elaboração dos cariótipos. Posteriormente, Mendes (dados não publicados 2020) analisou acessos de *U. dictyoneura* (DT 158 e DT 159), identificando $2n = 4x = 24$ cromossomos e conteúdo de DNA de 2.83 pg para e 3.12 pg. Os cromossomos do cariótipo foram classificados como simétricos e metacêntricos, seguindo a classificação de Levan (1964). Além disso, o comprimento total dos cromossomos variou de 2,63 a 3,98 μm para DT 158 e de 2,08 a 3,07 μm para o acesso DT 159.

O estudo mais recente de cariotipagem em *U. humidicola* foi conduzido por Damasceno *et al.* (2023). Esses autores analisaram cinco acessos de *U. humidicola* e confirmaram três níveis de ploidia (6X, 7X e 9X): H016 com $2n = 6x = 36$ e 2,38 pg, H031 com $2n = 6x = 36 + 1$ (aneuploide) e 3,01 pg, H125 com $2n = 7x = 42$ e 3,51 pg, H126 com $2n = 7x = 42$ e 4,45 pg, e H108 com $2n = 9x = 54$ e 3,94 pg. Os sítios de rDNA 35S e 5S apresentaram variações em termos de número e posição, sendo encontrados em posições terminais e intersticiais dos cromossomos, com colocalização intersticial em alguns acessos. Além disso, os dados de cariótipo e mapeamento de sítios ribossomais corroboram a proposta de aloploidia em *U. humidicola*, sugerindo uma origem híbrida para o acesso H031 (Damasceno *et al.* 2023).

A maioria dos estudos meióticos no complexo “humidicola” reportam anormalidades meióticas e pós-meióticas de acessos e híbridos intraespecíficos, relacionadas com a poliploidia onipresente no gênero (Boldrini *et al.* 2006; Adamowski *et al.* 2007; Gallo *et al.* 2007; Boldrini

et al. 2009, 2011; Boldrini; Pagliarini; Valle, 2009, 2010; Ricci *et al.* 2011; Bonetti 2023, dados não publicados). Em alguns acessos com H121 ($2n = 9x = 54$), H022 ($2n = 54$), H047 ($2n = 4x = 36$), H038 ($2n = 9x = 54$), H003 ($2n = 7x = 42$), H030 ($2n = 7x = 42$) as principais anormalidades estão relacionadas à citocinese, incluindo formas precoce, múltipla, tardia ou incompleta, ausência da citocinese, orientação irregular ou precoce dos cromossomos na metáfase I e cromossomos retardatários na anáfase I. Essas anormalidades resultam na formação de micronúcleos, micrósporos uni-, bi-, tri- e tetranucleados, e na produção de gametas aneuploides, impactando a viabilidade polínica e contribuindo para a variação cromossômica (Boldrini; Pagliarini; Valle, 2006; Gallo *et al.* 2007; Adamowski *et al.* 2007; Calisto *et al.* 2008; Boldrini *et al.* 2009, 2011).

Recentemente Bonetti (2023) analisou as configurações de pareamento em dois acessos de *U. dictyoneura* (DT 150 e DT 160). O acesso DT150 apresentou 100% de inviabilidade de pólen e um índice meiótico (IME) de 80%. O acesso DT160, por sua vez, apresentou um IME de 59,33% e uma viabilidade polínica de 39,20%. Foram observados altos índices de cromossomos não orientados e atrasados durante a meiose I em ambos os acessos. No DT150, 42,65% dos cromossomos estavam não orientados e 50% estavam atrasados. No DT160, essas porcentagens foram de 26,31% e 40,26%, respectivamente. No acesso DT160, 17,74% das telófases I apresentaram micronúcleos (MNs), enquanto no DT150 essa taxa foi de 8,59%. Além disso, a formação de fuso tripolar foi observada apenas no DT160, com uma frequência de 2,15%. Esses resultados indicam que ambos os acessos apresentam meioses instáveis, com alta frequência de anormalidades, porém com comportamentos distintos em termos de viabilidade polínica e configuração cromossômica (Bonetti 2023, dados não publicados).

2.3 DNA repetitivo

O genoma eucarioto compreende menos de 5% de genes. O restante inclui sequências intergênicas de baixa número de cópias, bem como sequências repetitivas, repetições em tandem e elementos transponíveis (Anderson *et al.* 2019). Um exemplo é o milho e o trigo, com até 85 e 90% dos genomas compostos de repetições (Li *et al.* 2004; Schnable *et al.* 2009). Essas sequências têm sido amplamente utilizadas como ferramentas para análise genética e têm se mostrado contribuintes na variação fenotípica e estrutural nos eucariotos. A utilização de DNA repetitivo como marcadores oferece novas oportunidades para caracterizar espécies, bem como entender a história evolutiva de cada genoma (Zhang *et al.* 2017). Com o avanço na

identificação de sequências repetitivas, várias classes, famílias e subfamílias têm sido identificadas por apresentarem estrutura, tamanho, mecanismos de transposição e número de cópias distintas (Wicker *et al.* 2007).

2.3.1 Elementos Transponíveis

Os elementos transponíveis (TEs) foram identificados pela primeira vez por Barbara McClintock (Mcclintock, 1950) em milho. Vários estudos levaram à descoberta de sua contribuição na variação fenotípica e genotípica (Bennetzen, 2000). Os TEs representam uma importante porção do genoma por estarem relacionados com a estrutura cromossômica, expressão e regulação gênicas, bem como adaptação e evolução (Carareto; Monteiro-Vitorello; Sluys, 2015). Os TEs são compostos principalmente por elementos repetitivos, intercalados com sequências ativas ou inativas. Eles não são distribuídos aleatoriamente e estão envolvidos em mutações em plantas, embora sejam segmentos genéticos móveis nos genomas (Ramakrishnan *et al.* 2022).

Os TEs contribuem para os rearranjos do genoma, causando ou reprimindo a expressão gênica. Isso afeta a linha germinativa e a somática. Os TEs também são ativados em resposta a condições de estresse, levando à criação de genes e RNAs não codificantes, modificando assim as redes regulatórias necessárias para processos transcricionais e pós-transcricionais (Bourque *et al.* 2018). O estresse ambiental pode ser um desencadeador e influenciar as atividades dos TEs (Chuong *et al.* 2017). À medida que as plantas passam por estresse ambiental, os TEs ativados podem saltar para novos locais genômicos, resultando em um aumento no número de cópias ou silenciamento de TEs, levando à alteração na função do gene, contribuindo assim com impactos positivos ou negativos (Quadrana *et al.* 2019).

Conforme o sistema de classificação proposto por Wicker *et al.* (2007), os elementos transponíveis (TE) são organizados em classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília. Esta estrutura classificatória divide esses elementos com base na presença ou ausência de um RNA intermediário. De maneira geral, os TEs são agrupados em duas classes distintas: classe I, que engloba os retrotransposons, e classe II, que compreende os transposons de DNA (Bennetzen; Wang, 2014).

Os transposons de classe I (transposons de RNA) são retrotransposons, constituídos por mRNA como mediadores para realizar mecanismos de copiar e colar que resultam em um grande número de cópias no genoma (Wicker *et al.* 2007). Seu principal componente são os

Long Terminal Repeat - LTR, Dictyostelium Repetitive Sequence- DIRS e retrotransposons não LTR: elementos nucleares intercalados longos (LINEs), elementos nucleares intercalados curtos (SINEs) e estrutura semelhante a *Penelope* (PLE) (Orozco-Arias *et al.* 2019).

Os transposons de classe II (transposons de DNA) representam DNA direto envolvido em processos replicativos de corte e colagem que lhes permitem fazer cópias moderadas no genoma (Wicker *et al.* 2007). Os principais componentes dos transposons são as repetições terminais invertidas (TIRs) que são variáveis em tamanho. Esses elementos podem aumentar seus números durante a replicação cromossômica, aproveitando tanto a posição que já foi replicada, bem como a forquilha de replicação que ainda será replicada (Wicker *et al.* 2007).

Os TEs são classificados com base não apenas na unidade de transporte mediadora (RNA ou DNA), mas também em domínios estruturais, como sequências enzimáticas e reguladoras e repetições não codificantes, incluindo o local de inserção (Klein; O'Neill, 2018). Assim, dentro das duas classes principais de TEs acima, temos agora nove ordens e 29 superfamílias, com base em seu mecanismo de transposição, estrutura genética e fusão cromossômica (Wicker *et al.* 2007; Lee; Kim 2014).

2.3.2 Elementos transponíveis classe I – transposição por RNA

Os retrotransposons (LTR) ou retroelementos são da classe I (*Long terminal Repeat*), assim chamados por possuírem longas repetições terminais, usam um processo de 'copiar e colar' para sua replicação e expansão, por meio de um intermediário de RNA (Wicker *et al.* 2007). Estruturalmente, os LTR-RTs se assemelham aos retrovírus, com exceção da ausência ou inatividade do gene do envelope (ENV) (Orozco-Arias; Isaza; Guyot, 2019). O processo de replicação ocorre através de uma transcriptase reversa, onde uma cópia de RNA é transcrita do elemento transponível, seguida pela síntese de DNA e inserção em um local alvo (Wicker *et al.* 2007). Como resultado, a cada ciclo de replicação, uma nova cópia é gerada, o que faz dos retrotransposons uma das principais contribuições para a fração repetitiva nos genomas extensos (Wicker *et al.* 2007). Além disso, os LTR-RTs são conhecidos por sua diversidade estrutural, funcional e localização dentro dos genomas (Orozco-Arias; Isaza; Guyot, 2019).

Os retrotransposons são comumente divididos em quatro ordens seguindo a classificação de Wicker *et al.* (2007), retrotransposons de repetição terminal longa (LTR), retrotransposons não - LTR, PLEs (*Penelope- Like elements*), DIRS (*Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*) e os LINEs e SINEs que compõem os retrotransposons não-

LTR da ordem (Orozco-Arias; Isaza; Guyot, 2019). Essa divisão se aplica porque apresentam diferenças significativas em sua estrutura, a presença e organização de domínios enzimáticos, motivos ou regiões regulatórias e em seu ciclo de vida. Os retrotransposons LTR são menos abundantes em animais, mas são a ordem predominante em plantas. Após a transposição, os elementos LTRs produzem um TSD de 4-6 bp. Além disso, estes retrotransposons contêm pelo menos dois genes, *gag*, uma proteína estrutural para partículas semelhantes a vírus, e *pol* codifica proteínas catalíticas necessárias para a replicação, como transcriptase reversa, RNase, integrase e aspártica (Wicker *et al.* 2007).

A ordem de retrotransposons LTR é subdividida em cinco superfamílias, *Copia*, *gypsy*, *Bel-Pao*, *Retrovirus*, *ERVO* (endogenous retroviruses). As superfamílias Ty1-*Copia* (*Pseudoviridae*) e Ty3-*Gypsy* (*Metaviridae*) são as principais e diferem uma da outra pela divergência de sequência e a ordem dos produtos genéticos codificados (Wicker *et al.* 2007). Os LTRs variam de 4 kb, em média, e podem chegar até 31 - 23kb (Wicker *et al.* 2007). Eles se localizam em regiões altamente heterocromáticas (centromérica, pericentromérica, telomérica), bem como regiões intergênicas (Gao *et al.* 2012). A ativação desses elementos móveis tem sido associada ao estresse biótico e abiótico, bem como promotores endógenos. O aumento de sua expressão também pode ser desencadeado por meio de resfriamento, infecção, dano mecânico, regeneração *in vitro*, hibridação e geração de haploides duplicados (Sabot; Schulman, 2006).

2.3.3 Elementos transponíveis de Classe II – transposição por DNA

Os transposons de DNA classe II, usam um mecanismo de 'recortar e colar', replicam-se por meio de um intermediário de DNA, com o auxílio da transposase e integrando-se em outras partes do genoma pela ação dessa mesma enzima. Elementos de classe II também são encontrados em procariotos em formas simples chamadas sequências de inserção (IS) ou como parte de estruturas mais complexas (Wicker *et al.* 2007). Os transposons são divididos em duas subclasses, que são distinguidas pelo número de fitas de DNA que são cortadas durante a transposição, mas nenhuma se move por meio de um intermediário de RNA. As nove superfamílias conhecidas são distinguidas pelas sequências TIR e o tamanho TSD, dentre elas *Tc1-Mariner*, *hAT*, *Mutator*, *Merlin*, *Transib*, *P*, *PiggyBac*, *PIF-Harbinger* e *CACTA*. Esses elementos podem aumentar seus números durante a replicação cromossômica, aproveitando

tanto a posição que já foi replicada, bem como a forquilha de replicação que ainda será replicada (Wicker *et al.* 2007).

A superfamília *Tc1-Mariner*, que é onipresente em eucariotos, possui uma estrutura simples de dois TIRs e uma transposase ORF. Os membros da superfamília *hAT* têm TSDs de 8 pb, TIRs relativamente curtos de 5-27 pb e comprimentos totais de menos de 4 kb. Mutador é onipresente nos eucariotos, possui TIRs que podem variar de centenas de pares de base até curtos (9-11 pb) ou indetectáveis. Os *Merlin* possuem TIRs que variam de algumas dezenas a várias centenas de pares de bases, esses TEs são flanqueados por TSDs de 8-9 bp. Além disso, os *Merlin* funcionais codificam uma transposase DDE com 10kb. Os elementos *Transib* contém motif DDE e está relacionado à proteína RAG1 envolvida na recombinação. Os *P* geram TSDs de 8pb. Os *PiggyBac* favorecem a inserção adjacente ao TTAA. Já os *PIF-Harbinger* exigem uma preferência de local – alvo para TAA, possuem duas ORFs em que uma codifica proteína de ligação ao DNA e a outra uma transposase e uma segunda ORF de função desconhecida. Por último, os CACTA, elementos curtos, altamente conservados (às vezes CACTG)) e flanqueiam TSDs de 3pb (Wicker *et al.* 2007).

Os elementos de DNA da subclasse II replicam sem clivagem de fita dupla, envolvendo o deslocamento de apenas uma fita, dentre eles o *Helitrons* que interfere principalmente na composição do gene por causa se sua capacidade de interceptar genes e movê-los pelo genoma, o que facilita novas combinações de domínios por meio de fusões de genes (Bennetzen; Wang, 2014; Krasileva, 2019). O segundo elemento que compõe essa subclasse é os *Maverick* (também conhecidos como *Polintons*) são grandes, atingindo 10-20 kb e são delimitados por longos TIRs. Além disso, eles codificam até 11 proteínas e alguns possuem homologia a proteínas de vários vírus de DNA (Wicker *et al.* 2007).

3. Sequências repetitivas em tandem

Ao longo da estrutura cromossômica, encontramos diversas sequências repetitivas, que podem estar dispersas por todo o genoma ou agrupadas em locais específicos, formando configurações em tandem. As sequências em tandem, têm sido estruturalmente caracterizadas por um arranjo sequencial de unidades repetidas, posicionadas uma após a outra (Paço *et al.* 2019). Com base no comprimento da repetição monomérica existem três subclasses distintas reconhecidas: microssatélites, minissatélites e satélites (DNAs satélites – satDNAs) (Paço *et al.* 2019), no entanto de acordo com Dumbovic; Forcales e Perucho (2017) existem também os

macrossatélites. Os microssatélites, conhecidos como repetições de sequência simples (SSR) ou repetições curtas em tandem (STR), são pequenas repetições em tandem com tamanhos entre 2 a 6 pares de bases. Essas sequências são notavelmente variáveis dentro de uma população, encontradas nas regiões teloméricas, sendo capaz de alcançar até 15 kb nos cromossomos humanos (Gomes; Shay; Wright, 2010).

Os minissatélites, por sua vez, são maiores (~15 pb), mas em menor número que os microssatélites. Matrizes de minissatélites exibem um comprimento médio de 0,5–30 kb e são encontradas em regiões eucromáticas do genoma de vertebrados, fungos e plantas. Os minissatélites possuem um padrão de arranjo único, são altamente variáveis em tamanho de matriz e classificados como número variável de repetições em tandem (VNTRs) (Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021). Por outro lado, macrossatélites são muito maiores e atingem até alguns quilobases de comprimento, sendo encontrados nas regiões subteloméricas dos cromossomos de humano. De acordo com Paço *et al.* (2019) a distribuição genômica apresentada pelos micros, mini e satDNAs é distinta na literatura, pois microssatélites e minissatélites estão distribuídos ao longo do genoma (dispersos), tanto em regiões eucromáticas quanto heterocromáticas. No entanto, os minissatélites também são caracterizados por suas acumulações em regiões (sub) teloméricas.

Os satélites consistem em matrizes repetidas em tandem que estão presentes em centrômeros, regiões pericentroméricas, regiões subteloméricas, além de posições intercalares e blocos de cromatina com propriedades estruturais e epigenéticas específicas (Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021). Considerados os elementos mais variáveis e de rápida evolução, as repetições de satDNA podem ser específicas da espécie ou compartilhadas por espécies estreitamente relacionadas (Belyayev *et al.* 2019; Garrido-Ramos, 2021; Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021). Os satDNAs são altamente repetitivos e ricos em AT. Geralmente têm entre 150 e 400 pares de bases e estão presentes na maioria das plantas e animais (Mehrotra; Goyal, 2014). Visto sua hipervariabilidade entre repetições de organismos aparentados e não aparentado, os satDNAs são excelentes marcadores para mapeamento e caracterização de genomas (Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021).

A origem dos satDNA pode ser decorrente a vários mecanismos como amplificação em tandem de várias sequências genômicas, expansão de matrizes de repetição curta em tandem e de pequenas repetições em tandem presentes nas regiões dos retrotransposons, seguida por uma rápida homogeneização de sequência dentro de cada família (um processo conhecido como evolução concertada) (Vondrak *et al.* 2020). Essa associação com elementos transponíveis pode

ser encontrada no milho (*Zea mays*), entre satélite CentC com 156pb e o retrotransposons centromérico (CRM) (Jin *et al.* 2004), e no arroz (*Oryza sativa*) entre o satélite CentO com 155pb e o retrotransposon específico do centrômero CRR (Cheng *et al.* 2002).

O DNA centromérico da maioria das plantas são grandes matrizes de DNA repetido em tandem. O centrômero está relacionado com a segregação fiel dos cromossomos na mitose e na meiose. O correto funcionamento do centrômero leva a herança precisa do material genético entre as espécies, logo qualquer mutação ou mal funcionamento de sua estrutura contribui com a perda cromossômica. Essas regiões também podem incluir elementos transponíveis (retrotransposons centroméricos - CRs e não centroméricos), que são altamente conservados na maioria das gramíneas (Ma *et al.* 2007; Heslop-Harrison; Schwarzacher, 2011).

A conservação desses CRs se deve à sua evolução mais lenta do que os retroelementos (LTR), bem como sua função e localização importante no genoma. Uma pesquisa realizada com 282 espécies ressalta que o comprimento dos monômeros das repetições em tandem dos centrômeros não são conservadas, que essas sequências podem ser ricas tanto em AT como GC e a abundância é amplamente variável (Melters *et al.* 2013). No geral, são sequências específicas de regiões centrométricas e cruciais para o funcionamento do centrômero. O interessante é que encontramos variações em relação ao tamanho, número de cópias e CRs entre as espécies, entre centrômeros homólogos ou mesmo entre indivíduos intimamente relacionados (Ma *et al.* 2007). Embora o papel do centrômero seja conservado ao longo da evolução, diferenças podem ser encontradas em plantas e animais como a ausência de sequências repetitivas em tandem (Nasuda *et al.* 2005; Shang *et al.* 2010) ou sequências diferentes entre os cromossomos (Gong *et al.* 2012).

As extremidades dos cromossomos contêm os telômeros que são essenciais para manter a integridade dos cromossomos. Sua descoberta se deve ao trabalho pioneiro de Barbara McClintock por meio da indução na formação de cromossomos dicêntricos no milho (*Zea mays* L.) (Bass; Birchler, 2011). A ausência dessas sequências nos cromossomos resulta na degradação ou fusão entre extremidades de outros cromossomos quebrados, além de danos no DNA que causam a parada do ciclo celular. As sequências teloméricas são minissatélites curtos dispostos em tandem com cerca de 7pb, sendo “5'-TTAGGG-3'” a sequência mais frequentemente encontrada em vegetais (Peska; Garcia, 2020).

O avanço de estudos relacionados com o entendimento da evolução e função dos telômeros permitiu identificar diferentes grupos de plantas com sequências "incomuns". Um exemplo é a sequência TTAGGG do tipo vertebrado, caracterizada em *Aloe* e em alguns outros

Aspargales (Fajkus; Sýkorová; Leitch, 2005) em *allium* (CTCGGTTATGGG)_N (Fajkus; Sýkorová; Leitch, 2005; Fajkus *et al.* 2016), *Cestrum elegans* (Solanaceae) TTTTTTAGGG (Peška *et al.* 2015, 2020) e *Genlisea* (Lentibulariaceae) TTTAGGG, TTCAGG e TTTCAGG (Tran *et al.* 2015). As sequências teloméricas podem ser encontradas em outros locais como blocos não-teloméricos de heterocromatina ou em locais que evidenciam fusões cromossômicas, como no cromossomo 2 de humano (Sumner, 2002).

Em *Phleum echinatum*, uma espécie pertencente à família Poaceae, as marcações teloméricas foram localizadas nas extremidades de todos os cromossomos, além de repetições localizadas intersticialmente nos primeiros três pares de cromossomos: nas regiões centroméricas dos cromossomos 1 e 2 e dentro da constrição secundária dos cromossomos 3 com satélite (Grabowska-Joachimik *et al.* 2015). Portanto, a localização das sequências teloméricas nem sempre corresponde à das extremidades dos cromossomos, ou seja, os telômeros autênticos. De acordo com a literatura essas sequências teloméricas intersticiais podem indicar reconstruções de cariótipo, em particular rearranjos ancestrais intracromossômicos por meio de fusões ou inversões cromossômica (Bolzán; Bianchi, 2006; Lin; Yan, 2008).

A região organizadora do nucléolo (NOR), conhecida como região de constrição secundária abriga sequências curtas repetitivas em tandem, essa região corresponde aos principais locais dos genes de rRNA 18S - 5.8S - 26S e suas regiões espaçadoras transcritas e não-transcritas (Heslop-Harrison; Schwarzacher, 2011). Os genes 18S-5.8S-26S são geralmente organizados, nessa ordem, em um único operon, em um ou vários locais nos cromossomos (Garcia; Kovařík, 2013). No nucléolo celular, os genes são co-traduzidos pela RNA polimerase I em uma transcrição primária, que é menor em plantas (35S rRNA) (Seitz; Seitz, 1979). Em um nível de transcrição, o RNA ribossômico (rRNA) é o que representa, em média, 80% do RNA total de células (Brown, 2018), por isso ainda hoje é amplamente estudado. Em algumas espécies os genes do rRNA estão localizados em uma única região de um par de cromossomos homólogos, no entanto pode-se encontrá-los também espalhados por vários cromossomos.

4. Aplicação de Sequências repetitivas para cariotipagem

Com o avanço dos estudos moleculares e o advento do sequenciamento foi possível conhecer melhor a composição do genoma vegetal e a sua contribuição com a variação entre

indivíduos dentro de um táxon, família ou espécie. Os elementos transponíveis têm sido alvo de muitos estudos, visto sua maior atividade no genoma capaz de gerar mudanças na estrutura do gene e / ou genoma, frequentemente acompanhadas de alterações na atividade gênica (Bennetzen, 2000).

A citogenética molecular com aplicação da técnica de hibridização *in situ* fluorescente - FISH tem revolucionado nosso entendimento sobre a estrutura, funcionamento, organização e evolução de genes e genomas. A caracterização dos cromossomos do cariótipo por meio da FISH permite a localização e a detecção abundante de sequências alvos em preparações microscópicas, bem como identificar e mapear sequências de DNA no cromossomo a fim de distinguir espécies e acessos (Schwarzacher; Heslop-Harrison, 2000).

As sequências repetitivas são comumente usadas como sondas em ensaios de FISH para várias aplicações, incluindo identificação de cromossomos individuais, estudo da evolução cariotípica e mudanças numéricas e estruturais nos cariótipos. O mapeamento de diferentes sequências repetitivas em tandem tem sido nos últimos tempos amplamente realizado nas espécies do gênero *Urochloa* por meio da FISH e GISH a fim de distinguir e conhecer a composição do genoma de espécies e acessos importantes economicamente.

Os DNAs ribossômicos (rDNAs) que consistem em sequências altamente repetitivas no genoma foram identificados em *U. brizantha* cultivar Marandú ($2n = 4x = 36$) e Toledo, Vitória, Xaraés, MG-5 ($2n = 5x = 45$), CIAT 16306 ($2n = 4x = 36$), *U. humidicola* ($2n = 6x = 54$), *U. ruziziensis* ($2n = 2x = 18$) e o híbrido Mulato ($2n = 4x = 36$), originário do cruzamento entre *U. decumbens* e *U. ruziziensis* (Akiyama; Yamada-Akiyama; Ebina, 2010). Os dados reportam diferenças no número e na morfologia de sítios de rDNA nos acessos em estudo. O número de sinais de rDNA 25S em todas as espécies de *Urochloa* estudadas neste trabalho corresponderam com seus respectivos níveis de ploidia. O mesmo ocorreu com sinais rDNA 5S, com exceção de Marandú e *U. ruziziensis* que não foi consistente com o nível de ploidia. A maioria dos loci rDNA 25S foram mapeados na região telomérica, enquanto os rDNA 5S foram mapeadas a partir da região do centromérico até a parte média do braço do cromossomo em todas as espécies (Akiyama; Yamada-Akiyama; EbinA, 2010).

O mapeamento físico de sítios de rDNA 35S e 5S foi recentemente realizado por Damasceno (2023) dos acessos H016 ($2n = 6x = 36$), H031 ($2n = 6x = 36 + 1$), H125 ($2n = 7x = 42$), H126 ($2n = 7x = 42$) e H108 ($2n = 9x = 54$). Os resultados mostram variações no número de sítios entre os acessos e localização desses no cariótipo. O acesso H016 apresentou dez sítios de rDNA 5S e cinco de rDNA 35S, sendo 5 sintênicos, H031 treze sítios de rDNA e seis rDNA

35S, sendo 6 sintênicos, H125 onze sítios de rDNA 5S e sete de rDNA 35S, dos quais 7 eram sintênicos, H126 onze sítios de rDNA 5S e sete 35S, com 7 sintênicos e H108 nove sítios de rDNA 5S e sete de rDNA 35S, com 5 sintênicos. Esses sítios de rDNA 35S foram localizados nas posições terminal e intersticial, e o rDNA 5S na posição intersticial e pericentromérica (Damasceno *et al.* 2023). A FISH de sequências rDNA 35S e 5S foi realizada pela primeira vez por Mendes (dados não publicados) nos acessos DT 159 de *U. dictyoneura*, ambos com $2n = 4x = 24$ cromossomos. O acesso DT 158 apresentou oito sítios de rDNA 5S, no quarteto cromossômico 2, em região intersticial e no quarteto cromossômico 4, em região intersticial, contíguos aos sítios de rDNA 35S, os quais ocupam a posição terminal nos cromossomos. O número e a posição de sítios de rDNA 35S e 5S do acesso DT 159 foram similares ao observado para o acesso DT 158, demonstrando grande similaridade entre os cariótipos e ratificando a proposta de autoploidia para a espécie (Mendes, dados não publicados).

No gênero *Urochloa*, apenas um trabalho que utilizam os elementos transponíveis como sondas, a fim de demonstrar sua diversidade no genoma por meio da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Em *U. decumbens* a análise do transcriptoma revelou que 59% do genoma é constituído de elementos transponíveis classe I (retrotransposons) e 41% elementos transponíveis classe II (Santos *et al.* 2015). Sondas desenvolvidas a partir de sequências de retrotransposons - LTR *Gypsy*, entre elas *Del*, *CRM*, *Athila* e *Tat gypsy* foram acumulados em regiões centromérica e pericentromérica de *U. brizantha* (B72, $2n = 4x = 36$ e B183, $2n = 5x = 45$), *U. ruziziensis* (R102, $2n = 2x = 18$), *U. humidicola*, (H16 $2n = 4x = 36$ e H36, H38 e H112, $2n = 9x = 54$) e *U. decumbens* (D4 $2n = 2x = 18$). Além disso, diferenças na distribuição das sequências nos cromossomos entre linhagens e espécies, entre níveis de ploidia e intensidade/tamanho do sinal foram identificadas em *Urochloa* (Santos *et al.* 2015).

No estudo de Tomaszewska *et al.* (2023), que caracterizou 17 espécies, 1 híbrido sintético e 3 acessos não identificados, uma abordagem inovadora foi o uso de sondas de DNA genômico específicas para *U. humidicola*, identificadas por análise de k-mers. Este método representa um avanço significativo, utilizando sondas FISH baseadas em k-mers, o que marca uma nova geração de ferramentas para estudos em plantas, especialmente em gramíneas. As sequências k-mers podem ser derivadas de qualquer espécie, independentemente de seu genoma ter sido sequenciado ou não. Essa abordagem sem necessidade de alinhamento é especialmente eficaz para a geração de sondas FISH de cópia única, abrindo novas possibilidades para a citogenômica e estudos comparativos de genomas (Tomaszewska *et al.* 2023).

A análise k-mers referem-se a subsequências curtas de um tamanho fixo, extraídas de uma sequência genômica mais extensa, obtida por meio de dados de sequenciamento (Becher; Sampson; Twyford, 2022). A essência dessa abordagem é a decomposição da sequência original em unidades menores, permitindo uma análise mais granular e eficaz. Ao fragmentar a sequência em k-mers, todas as possíveis subsequências de comprimento k são consideradas, proporcionando uma visão abrangente da diversidade genômica e facilitando a identificação de padrões conservados específicos de uma determinada espécie (Liu *et al.* 2017; Reynolds; Strnadova-Neeley; Lachowiec, 2021). Este enfoque não apenas simplifica a análise, mas também amplia nossa compreensão das intrincadas nuances do genoma, desempenhando um papel fundamental na caracterização e classificação das sequências repetitivas.

Sondas baseadas em k-mers têm se destacado na caracterização genética dos cariótipos. A combinação de sondas marcadas baseadas em repetições em tandem possibilita a identificação parcial ou completa dos cromossomos, além de detectar variações cromossômicas estruturais entre espécies e distinguir diferentes germoplasmas (Liu *et al.* 2021). O uso da análise k-mer emergem como uma ferramenta capaz de avaliar sequências específicas de um determinado genoma, bem como sequências abundantes e aquelas compartilhados entre as duas espécies, cultivares e acessos próximas (Liu *et al.* 2017; Tomaszewska *et al.* 2023), abrindo novas perspectivas para a genômica comparativa.

De acordo com Tomaszewska *et al.* (2023) essas sequências k-mers mostram alta homologia com genomas de rDNA ou cloroplastos. Essa novidade de sequências pode ser utilizada de modo universal em outras espécies e acessos a fim de caracterizar a composição do genoma visto que foram encontrados clusters exclusivos e abundantes de *U. humidicola*. As sequências específicas do complexo ‘humidicola’ marcaram regiões terminais e pericentroméricas. Por meio das sequências Uhum-spec1, Uhum-spec3, Uhum-spec7, e Uhum-spec12 a composição genômica de *U. humidicola* inclui os genomas A e B, e possivelmente o genoma C em níveis de ploidia mais altos. No entanto, mesmo as sondas marcando vários cromossomos, esse trabalho carece de uma análise comparativa entre os cariótipos de cada espécie/acesso do complexo “humidicola”.

No contexto do gênero *Urochloa*, áreas conservadas identificadas através da análise k-mer e do RepeatExplorer foram amplificadas usando PCR convencional, seguido pela síntese comercial de primers específicos do genoma recém-projetado. As sondas procedentes dos primer recém projetados de 50-mer, revelou a variação no número de sítios e caracterizou os cromossomos com base na presença e ausência de marcas em *U. humidicola* e *U. decumbens*.

No caso de *U. humidicola*, foco deste trabalho, foram desenvolvidos diversos primers, dos quais apenas quatro foram testados em dois acessos. Para o acesso hexaploide (6x, CIAT 26151) de *U. humidicola*, as sondas Uhum-spec1 e Uhum-spec3 permitiram a diferenciação de quatro tipos de cromossomos: oito cromossomos exibiram sinais terminais de Uhum-spec1 (grupo I), oito cromossomos apresentaram sinais tanto de Uhum-spec1 quanto de Uhum-spec3 (grupo II), outros oito cromossomos exibiram sinais exclusivamente de Uhum-spec3 (grupo III), e 12 cromossomos não apresentaram sinais detectáveis (grupo IV). A sonda Uhum-spec12 revelou sinais localizados nas posições pericentroméricas e intercalares de 12 cromossomos (Tomaszewska *et al.* 2023).

No acesso *U. humidicola* (8x + 2 ou 9x - 4, CIAT 16867), os sinais da sonda Uhum-spec7 foram observados dispersos ao longo dos cromossomos, com algumas regiões exibindo intensidade diferenciada; contudo, não foi possível discernir um padrão específico em sua distribuição. Por outro lado, a sonda Uhum-spec1 revelou sinais em 26 cromossomos, dos quais quatro exibiram características distintas: dois cromossomos apresentaram sinais adicionais de Uhum-spec1 nos braços opostos, um cromossomo exibiu duplicação do sinal Uhum-spec1, e outro cromossomo demonstrou um sinal terminal robusto de Uhum-spec7 (Tomaszewska *et al.* 2023). Todas essas informações revelem que a análise k-mer é uma poderosa ferramenta na identificação e seleção de sequências em tandem, que representam candidatas para o desenvolvimento de sondas de FISH.

A abordagem de k-mers fragmenta o genoma em pequenas sequências de tamanho fixo (k-mers). Ao contar a frequência desses k-mers, é possível identificar regiões repetitivas, variantes genéticas e até mesmo montar genomas (Moeckel *et al.* 2024). Já o RepeatExplorer utiliza um algoritmo de agrupamento para identificar e classificar repetições longas e complexas, como transposons e retrotransposons. Enquanto os k-mers são mais adequados para identificar repetições curtas e simples, o RepeatExplorer se destaca na análise de repetições mais longas e estruturalmente complexas (Novák *et al.* 2013). A escolha entre as duas abordagens depende do tipo de repetição que se busca identificar e do tamanho do genoma a ser analisado.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material Vegetal

Os acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura* foram fornecidos pelo banco de germoplasma de *Urochloa* da Embrapa Gado de Corte, localizada em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (Coordenadas: latitude 20° 25'307" S, longitude 54° 43'367" W) (Tabela 1). As plantas foram cultivadas na casa de vegetação, mantendo-se condições similares de tratos culturais, irrigação e adubação. As análises citogenéticas foram conduzidas no Laboratório de Citogenética Vegetal e de Citogenética Molecular do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras, localizada em Lavras, Minas Gerais.

Tabela 1. Identificação, número de cromossomos, nível de ploidia ($x=6$) e modo de reprodução dos acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura* estudados.

Espécie/EGC*	Acessos	Número cromossômico **	Nível ploidia	Modo de Reprodução***
<i>U. humidicola</i>	H016	36 ¹	6x	Apomítico
<i>U. humidicola</i>	H030	42 ²	7x	Apomítico
<i>U. humidicola</i>	H031	36 + 1 ¹	6x	Sexual
<i>U. humidicola</i>	H125	42 ¹	7x	Apomítico
<i>U. dictyoneura</i>	DT 150	54 ²	9x	Apomítico
<i>U. dictyoneura</i>	DT 159	24 ²	4x	Apomítico

Fonte: EGC* - EMBRAPA Gado de corte (2020); **(¹Damasceno *et al.* 2023; ²Mendes, dados não publicados; Bonetti dados não publicados) ***(Jungmann *et al.* 2010).

5.2 Extração de DNA, preparação e marcação das sondas

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens frescas conforme método CTAB de Doyle e Doyle (1990), método CTAB. A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria usando NanoDrop® (Invitrogen), e a integridade do DNA avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Sequências representativas identificadas por análises k-mer (Tomaszewska *et al.* 2023) e RepeatExplorer (Tomaszewska *et al.* 2023; Corrêa *et al.* dados não publicados) foram usadas como sondas na hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Todos os sete primers foram utilizados para amplificar sondas e marcados via PCR (Tabela 2). As condições da PCR foram as seguintes: 100 ng do DNA genômico, 2,5 U de Hot Start Taq, 1x de solução tampão com mgCl, 1x de Q Solution, 0,2mM de dNTP, 0,4 nM dos primers Forward (Fw) e Reverse (Rv) para um volume de 25uL. O programa de PCR compreendeu uma desnaturação inicial a 95°C por 15

min, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 25 seg, temperatura de anelamento de 54 a 58°C (conforme a temperatura ideal de cada primer) por 45 seg, extensão a 72°C por 2 min e, finalmente, uma extensão final a 72°C por 2 min. Os produtos de amplificação de cada par de primers foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. As marcações foram realizadas por PCR seguindo as mesmas condições descritas acima, porém marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche Biochemicals®, UK). A sonda rDNA 18S, utilizada como controle da FISH, foi obtida por PCR utilizando os primers NS1 (5'- 18 GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3') e NS4 (5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG3') amplificados do genoma de *Oryza sativa* L. (White *et al.* 1990), que foram posteriormente marcados com biotina-16-dUTP, por reação de nick translation (Roche Biochemicals®, UK).

5.3 Preparações cromossômicas e FISH

Pontas de raízes foram coletadas diretamente das plantas entre as 9 e 10h e 30min.e pré tratadas em solução de ciclohexamida (12,5 mg L⁻¹) por 2h, em temperatura ambiente. Após isso, as raízes foram lavadas em água destilada (dH₂O) três vezes, durante 5 min cada, e fixadas em uma solução de metanol: ácido acético (3:1) com três trocas consecutivas de 5 min, sendo mantidas por 24h em temperatura ambiente e armazenadas a - 20°C em álcool 90%.

Para preparação cromossômica, as raízes foram lavadas em dH₂O por três vezes, durante 5 min. cada, e em seguida imersas em tampão citrato fosfato pH 4,8 por 5 min. Os meristemas foram excisados e submetidos à digestão enzimática utilizando uma mistura de enzimas ["Onozuka R10" (0,7%), celulase Sigma-Aldrich (0,7%), pectoliase Sigma-Aldrich (1%) e citohelicase Sigma-Aldrich (1%)] por 1 h e 38 min, a 38 °C.

As lâminas foram preparadas por meio da técnica de dissociação celular e secagem ao ar, conforme descrito por Carvalho e Saraiva (1993), e avaliadas em microscópio de luz Olympus CX41. Aquelas contendo cromossomos íntegros e bem espalhados foram selecionadas para realização da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

Para a FISH, as preparações cromossômicas foram desnaturadas em formamida 70% a 85°C por 1 min e 25s, e desidratadas em séries de etanol (70, 90 e 100%) por 5 min cada. Uma mistura de hibridização contendo 50% de formamida, 20% de sulfato de dextran, SSC 2x, 2,5% de dH₂O; 1 µL de esperma de salmão (concentração de 10 mg/mL) e aproximadamente 40 ng/µL de sondas rDNA 18S e satDNA foi desnaturada por 8 min, a 95°C e aplicada às lâminas (estringência estimada de 82%). A hibridização foi realizada em câmara úmida a 37°C por 24h.

As lâminas hibridizadas foram submetidas a lavagem de estringência (51%) em SSC 2x a 42°C por 10 min, seguindo de lavadas em SSC 2x por 5 min em temperatura ambiente. As sondas foram detectadas usando os anticorpos anti-digoxigenina-rodamina e Alexafluor® 488-estreptavidina a 37°C por 1h. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)/Vectashield® e as imagens foram capturadas por uma câmera QImaging Retiga EXi CCD acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60. As medições cromossômicas e descrição da organização das sequências satDNA nos cromossomos foram obtidas a partir da avaliação de sete metáfases/acesso.

Tabela 2 – Sequência dos respectivos primer utilizados na obtenção de sondas na FISH.

ESPÉCIES	AC	NC	CM	ID CLUSTER	NO	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	TEMP
<i>U. rizantha</i> ^{*1}	B105	2n = 2x = 18	158 pb	UB2	UroSat-1a Fw	CGAAACGCATCCAAACATGAG	56°C
	CIAT 16114			CL4	UroSat-1a Rv	CGTTACTTCGAAAATGACCGGT	
<i>U. decumbens</i> ^{*1}	Cv Basilisk	2n = 4x = 36	361pb	UD4	UroSat-2a Fw	ATTGATTCGGGCTCCAAACG	54°C
	CIAT 606			CL13	UroSat-2a Rv	TGGTCCACATCTCAAGCAGT	
<i>U. humidicola</i> ^{**2}	CIAT 26155	2n = 6x = 36	127 pb	Uhum-spec 3	Uhum-spec3 Fw	CTAACATGAGTAGGTGTGCG	54°C
					Uhum-spec3 Rv	CGAAAAGCCACACTTCAG	
<i>U. humidicola</i> ^{**}	CIAT 26155	2n = 6x = 36	117 pb	Uhum-spec 4	Uhum-spec4 Fw	CACTAACATGAGTAGGTGTGCG	54°C
					Uhum-spec4 Rv	CTTCAGTGCATCTCTCGTAG	
<i>U. humidicola</i> ^{**2}	CIAT 26155	2n = 6x = 36	115 pb	Uhum-spec 7	Uhum-spec7 Fw	GACATCGAGAACTTTGCCTTCC	58°C
					Uhum-spec7 Rv	TATCTAGGACCCCACTCTTTCC	
<i>U. humidicola</i> ^{**2}	CIAT 26155	2n = 6x = 36	200 pb	Uhum-spec 9	Uhum-spec 9 Fw	CCAATTATGTTGCCTACCCC	54°C
					Uhum-spec 9 Rv	TCTAGGACCCCACTCTTTCC	
<i>U. humidicola</i> ^{*2}	CIAT 26155	2n = 6x = 36	200pb	Uhum-spec 12	Uhum-spec 12 Fw	GGTCAAGGATGTCACCAAGG	54°C
					Uhum-spec 12 Rv	TCATTTTCTACCTCCTCGCG	

AC – Acessos (Embrapa/CIAT); NC – Número de cromossomos; CM- Comprimento do monômero; ID Cluster- Identificação dos cluster RepeatExplorer * K-mer**; NO- Nome do oligonucleotídeo; TEMP- Temperatura empregada nas condições da PCR e marcação.

Fonte: ¹ Corrêa *et al.* dados não publicados; ² Tomaszewska *et al.* 2023.

6. RESULTADOS

A técnica de FISH foi empregada neste estudo com a finalidade de localizar as sequências satDNA nos cromossomos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*. Os resultados mostram variações entre os diferentes acessos no número, tamanho e intensidade dos sinais e no padrão de distribuição dos *loci* satDNAs e rDNA18S. Os cromossomos apresentaram padrões de hibridização com sinais que permitiram categorizar tipos cromossômicos nos acessos avaliados (Tabelas 3 e 4, Figuras 1 a 7).

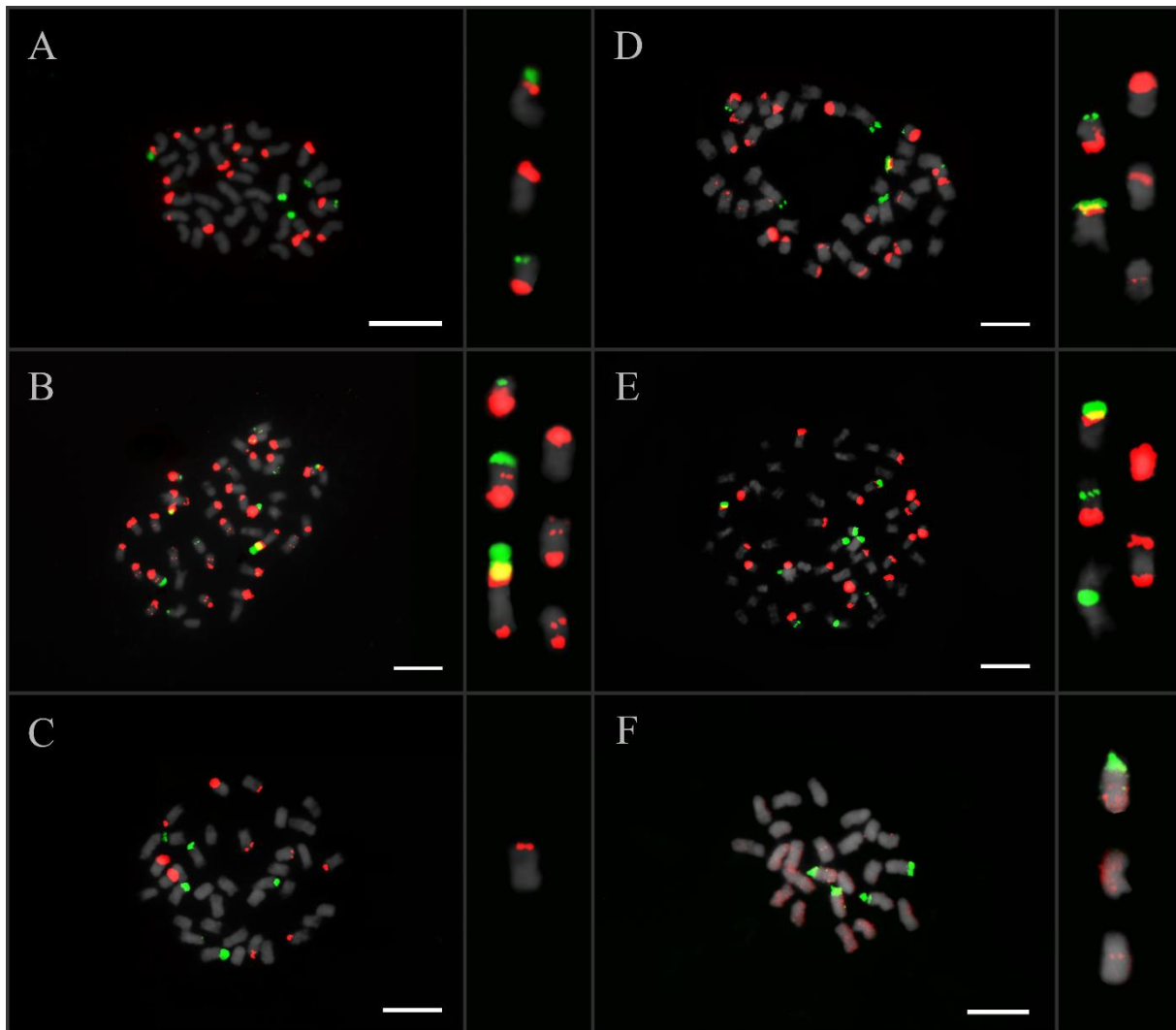
- I) Terminal, acompanhado ou não de sinal centromérico;
- II) Duplo terminal, acompanhado ou não de sinal centromérico;
- III) Terminal ou duplo terminal, acompanhado de sinal rDNA 18S adjacente ou em braço cromossômico oposto;
- IV) Intersticial;
- V) Centromérico, acompanhado ou não de sinais rDNA 18S;
- VI) Dispersos;
- VII) Sem sinais de hibridização.

Abaixo estão descritas as observações da distribuição *in situ* das sequências satDNA nos cromossomos dos acessos avaliados:

Uhum-spec3: Nos cromossomos dos quatro citótipos de *U. humidicola* e no acesso nonaploide de *U. dictyoneura* predominam os sinais terminais dessa sequência, com variações no número de cromossomos marcados e tipos cromossômicos I, II e III. No acesso heptaploide H125 foi detectado sinal intersticial em um cromossomo (tipo IV) (Figura 1D e Tabela 3). Notavelmente, foram observados cromossomos com sinais terminais Uhum spec3 adjacentes às sequências rDNA 18S (tipo III), com exceção dos acessos aneuploide H031 (6x) e o tetraploide DT 159 (Figura 1C e 1F e Tabela 3). Essa sequência satDNA também hibridizou em regiões centroméricas de alguns cromossomos dos acessos heptaploides H030 (Figura 1B) e H125 (Figura 1D). Alguns cromossomos do acesso DT150 (9x) apresentaram grandes blocos fluorescentes terminais, com três cromossomos quase completamente marcados pela sonda (Figura 1E). Esse acesso também apresentou um único cromossomo com marcação duplo-terminal e um cromossomo com sinal rDNA 18S na região centromérica (Figura 1E). As marcações observadas para tetraploide de *U. dictyoneura* DT 159 divergiram dos demais acessos (Tabela 4), pois mostraram sinais fracos na região centromérica e dispersos em alguns cromossomos (Figura 1F). Devido à natureza dispersa dessa sequência neste acesso, foi

desafiador estabelecer um padrão de hibridização. No entanto, observa-se a presença de um grupo distinto de cromossomos com cromossomos sem marcações da sonda (tipo VII).

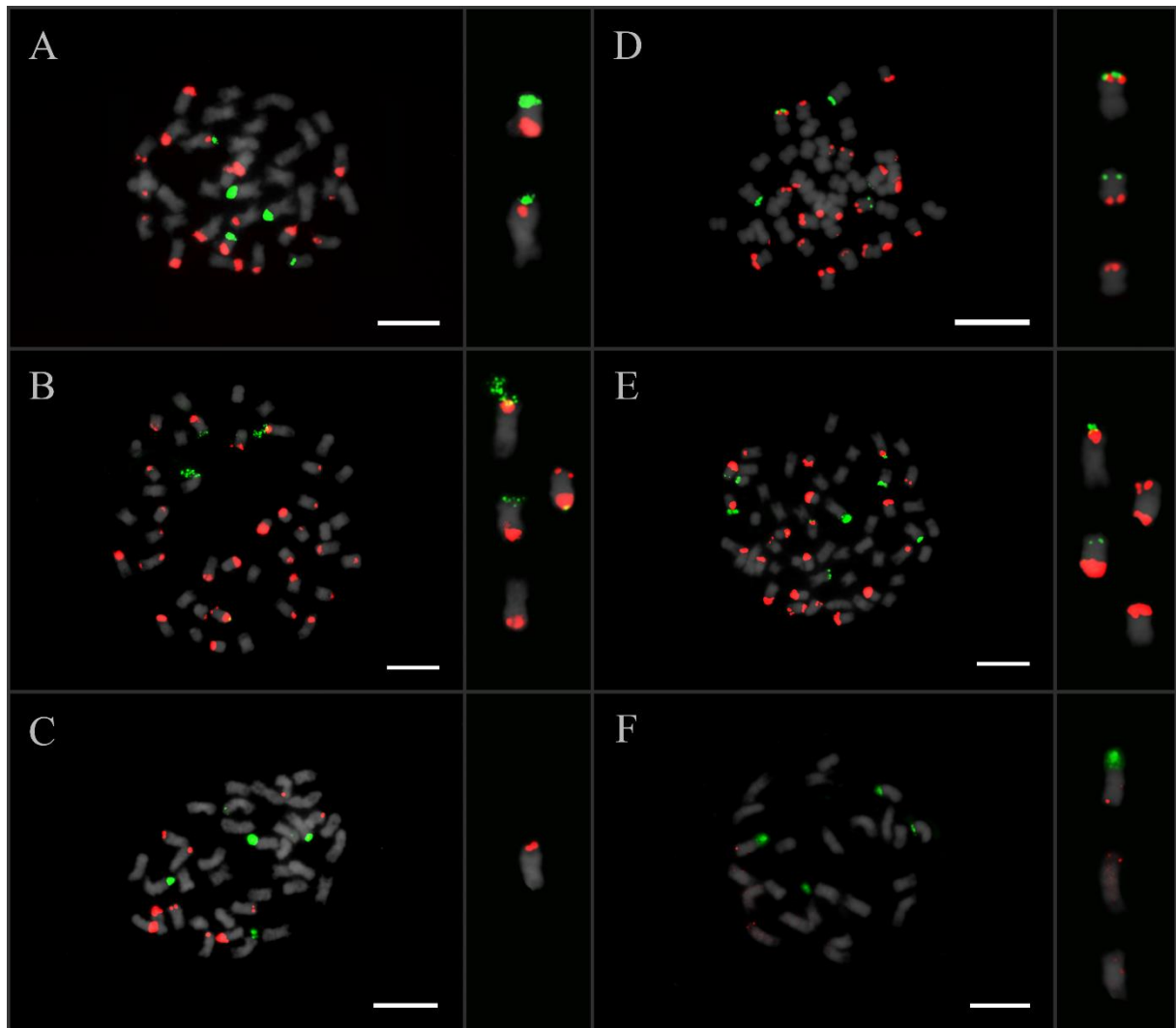
Figura 1 - Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA Uhum-spec 3 em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U. humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e *U. dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 μ m.



Fonte: Do autor 2024.

Uhum-spec4: Os sinais de hibridização dessa sequência foram detectados nas regiões terminais (tipo I e III) em números variáveis de cromossomos em todos os acessos avaliados (Figura 2 e Tabelas 3 e 4), porém com marcas muito fracas em quatro cromossomos do acesso DT 159 (4x). Os acessos H030 (7x) e DT150 (9x) apresentaram respectivamente, um par (Figura 2B) e um cromossomo (Figura 2E) com marcações terminais no braço curto e longo (cromossomo tipo II, sem sinal centromérico) (Tabelas 3 e 4).

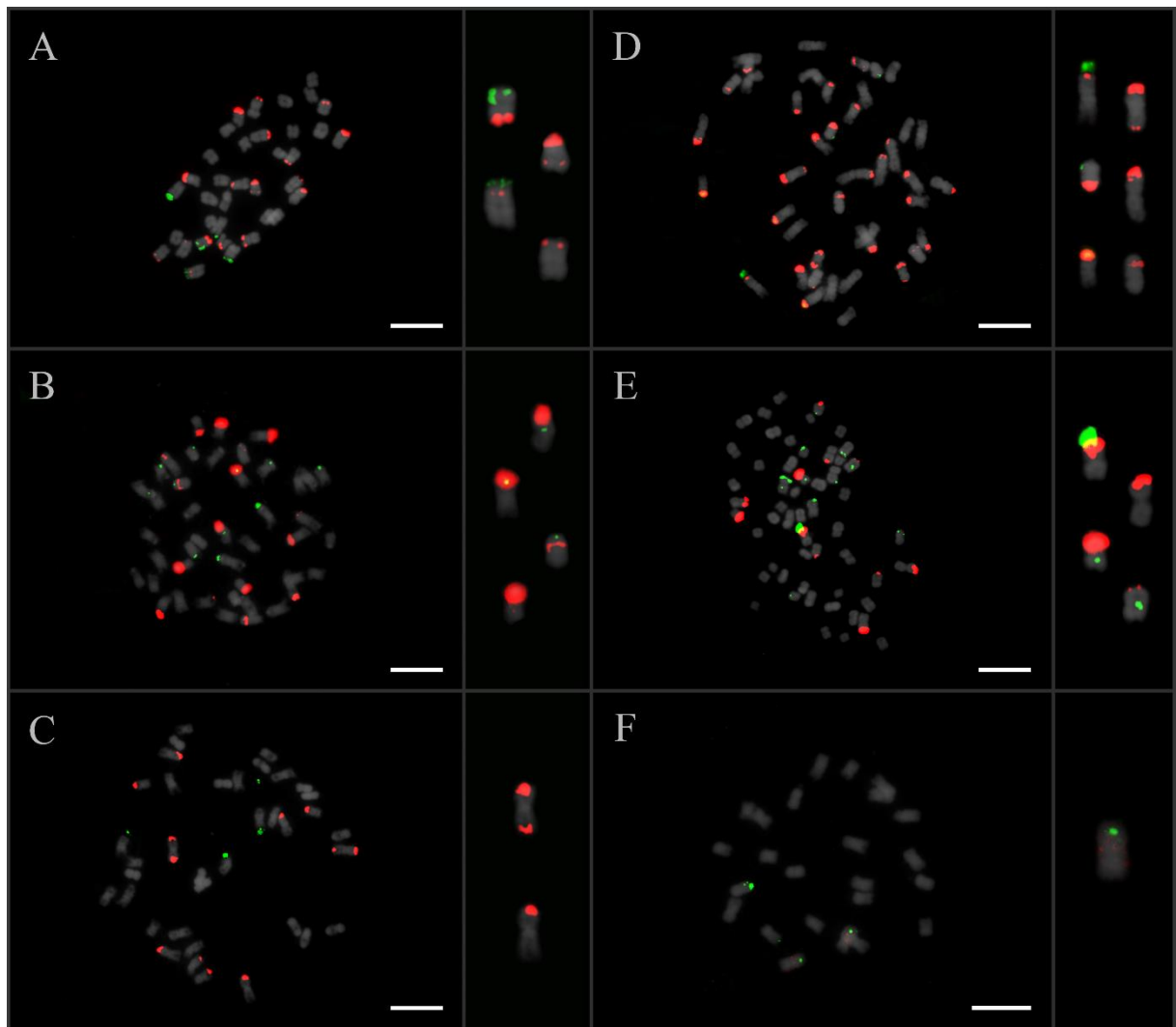
Figura 2 - Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA Uhum-spec 4 em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U.humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e de *U.dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 μ m.



Fonte: Do autor 2024.

Uhum-spec7: Os sinais Uhum spec7 foram predominantemente observados em regiões terminais (tipo III), com exceção dos acessos heptaploides H030 e H125 que também exibiram um par de cromossomos com sinais intersticiais (tipo IV) (Figura 3B e 3D, Tabela 3). Nos acessos H016 (6x), H031 (6x, aneuploide) e H125 (7x) também foram identificados um, dois e quatro cromossomos, respectivamente, com sinais terminais nos braços curto e longo (Figura 3A, 3C e 3D, Tabela 3). O acesso DT159 (4x) divergiu novamente no padrão de hibridização em comparação com os demais acessos, com ausência de sinais (tipo VII), aparentemente sem sinal em comparação aos demais citótipos (Figura 3F, Tabela 4).

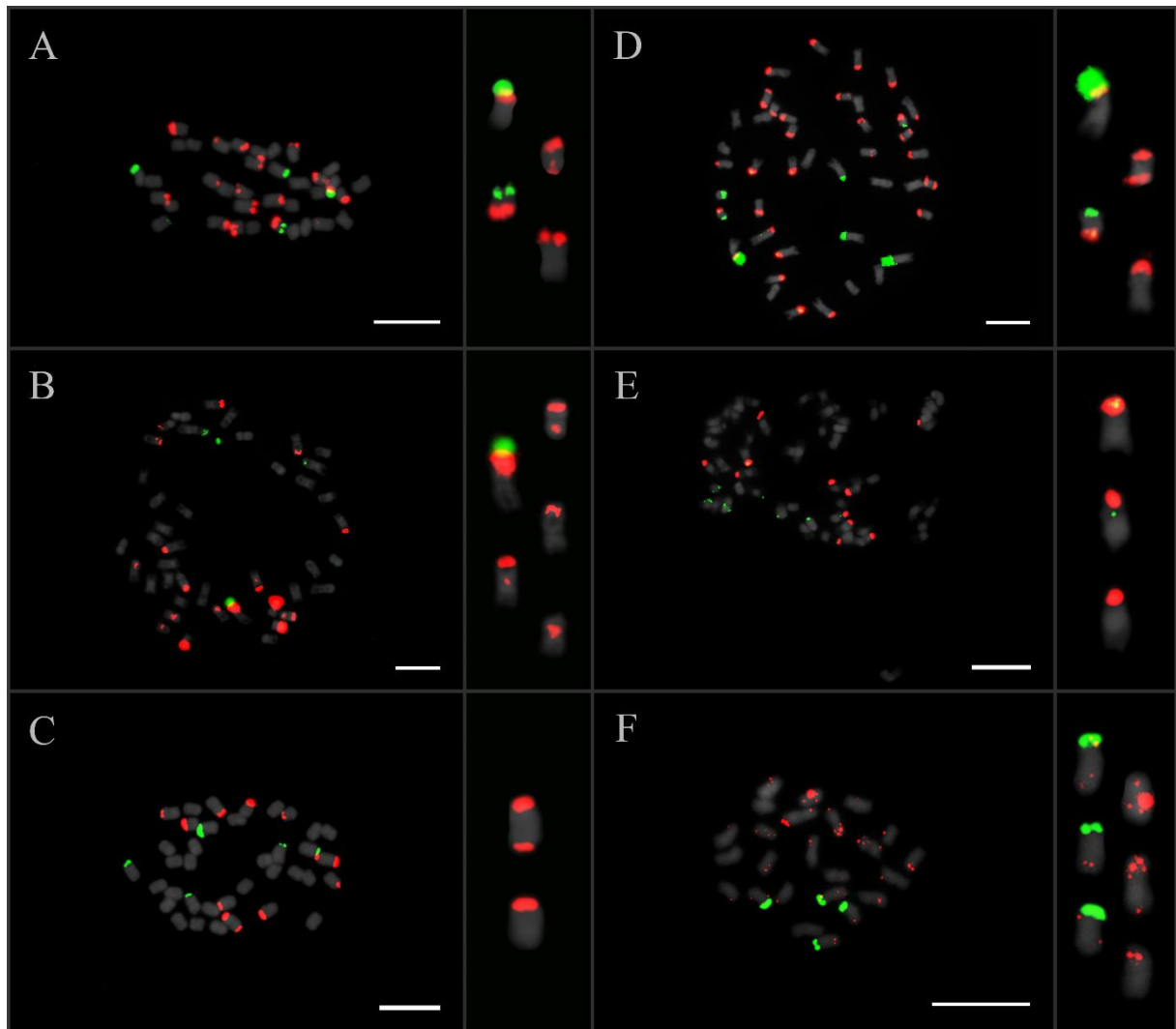
Figura 3 - Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA Uhum-spec 7 em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U.humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e de *U.dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 µm.



Fonte: Do autor 2024.

Uhum-spec9: Os padrões de hibridização se assemelham aos das sequências descritas anteriormente, mas com algumas variações em número e tipos de cromossomos marcados (Figura 4 e Tabelas 3 e 4). Há um predomínio de cromossomos tipo I e II (Figura 4, Tabelas 3 e 4). O acesso hexaploide H016 e os heptaploides H30 e H125 apresentaram cromossomos tipo III (Figura 4A; 4B, 4C e 4D, Tabela 3 e 4). A sequência Uhum-spec9 também foi detectada no heptaploide H030 na região centromérica de um par cromossômico e no H125 um único cromossomo apresentou marcação intersticial (Figura 4B). No acesso tetraploide DT 159 foram evidenciados sinais dispersos, abrangendo regiões terminais, centroméricas e intersticiais (Figura 4F, Tabela 4).

Figura 4 -Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA Uhum-spec 9 em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U. humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e de *U. dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 µm.

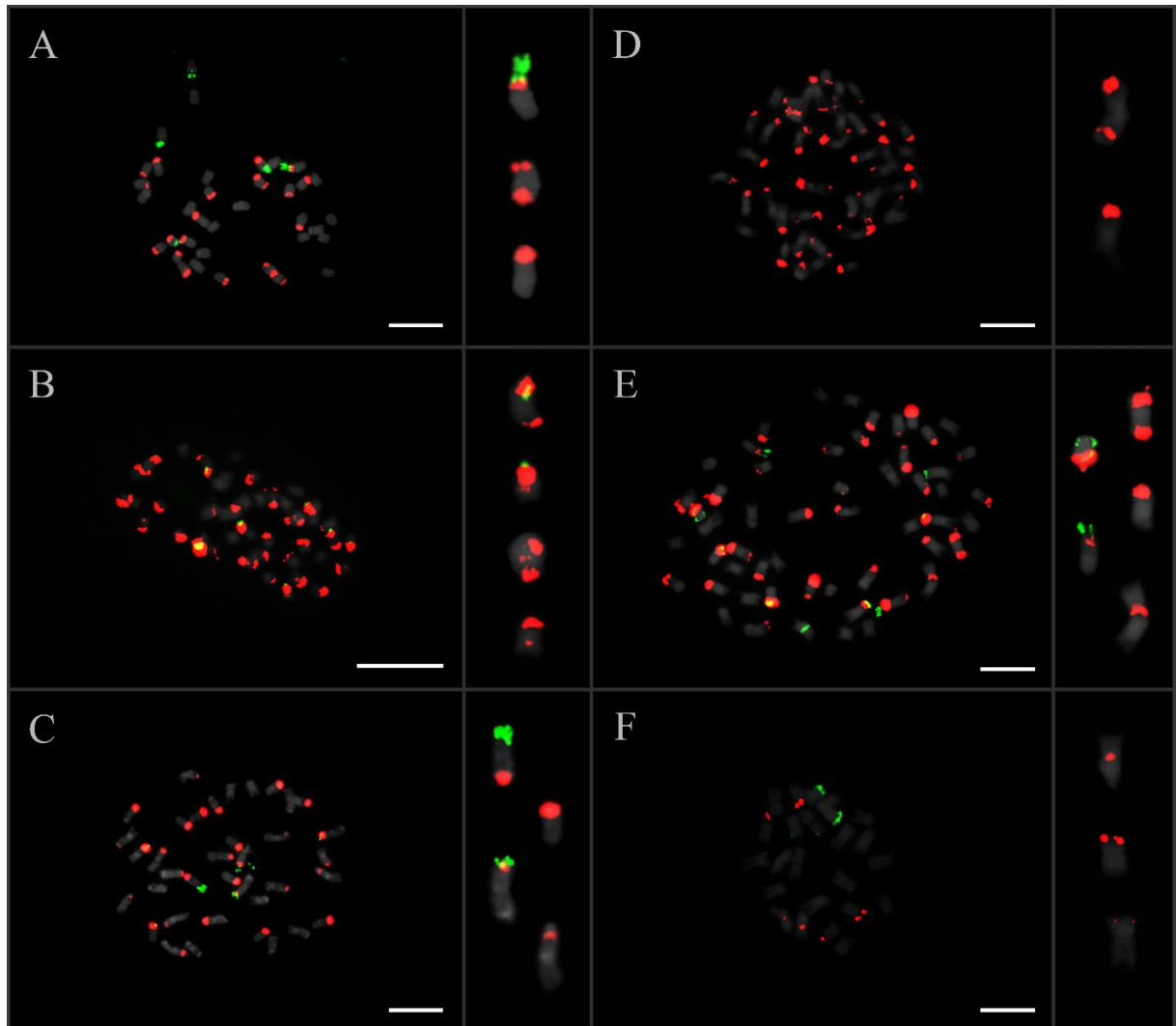


Fonte: Do autor 2024.

Uhum-spec12: As marcas da sequência Uhum-spec 12 foram evidenciadas nas regiões terminais (tipo I e III) em números variáveis de cromossomos de todos os acessos (Figura 5, Tabelas 3 e 4). Algumas exceções nos padrões de hibridização foram identificadas com a sequência Uhum-spec 12. O acesso hexaploide H016, por exemplo, apresentou um par cromossomo tipo II (marcação duplo terminal) enquanto os heptaploides H30 e H125 apresentaram três pares (Figura 12A, 12B e 12D). Uma maior variação de tipos cromossômicos foi observada no acesso nonaploide DT150 para essa sequência satDNA, pois, além de cromossomos tipos I, II e III, foi observado um cromossomo com marcação exclusivamente centromérica (tipo V), (Figura 5E, Tabela 4). No acesso DT159 (4x) foram evidenciados cinco

cromossomos tipo I, mas sem marcas centroméricas, e um par de cromossomos apresentando somente sinal centromérico (tipo V) (Figura 5F, Tabela 4).

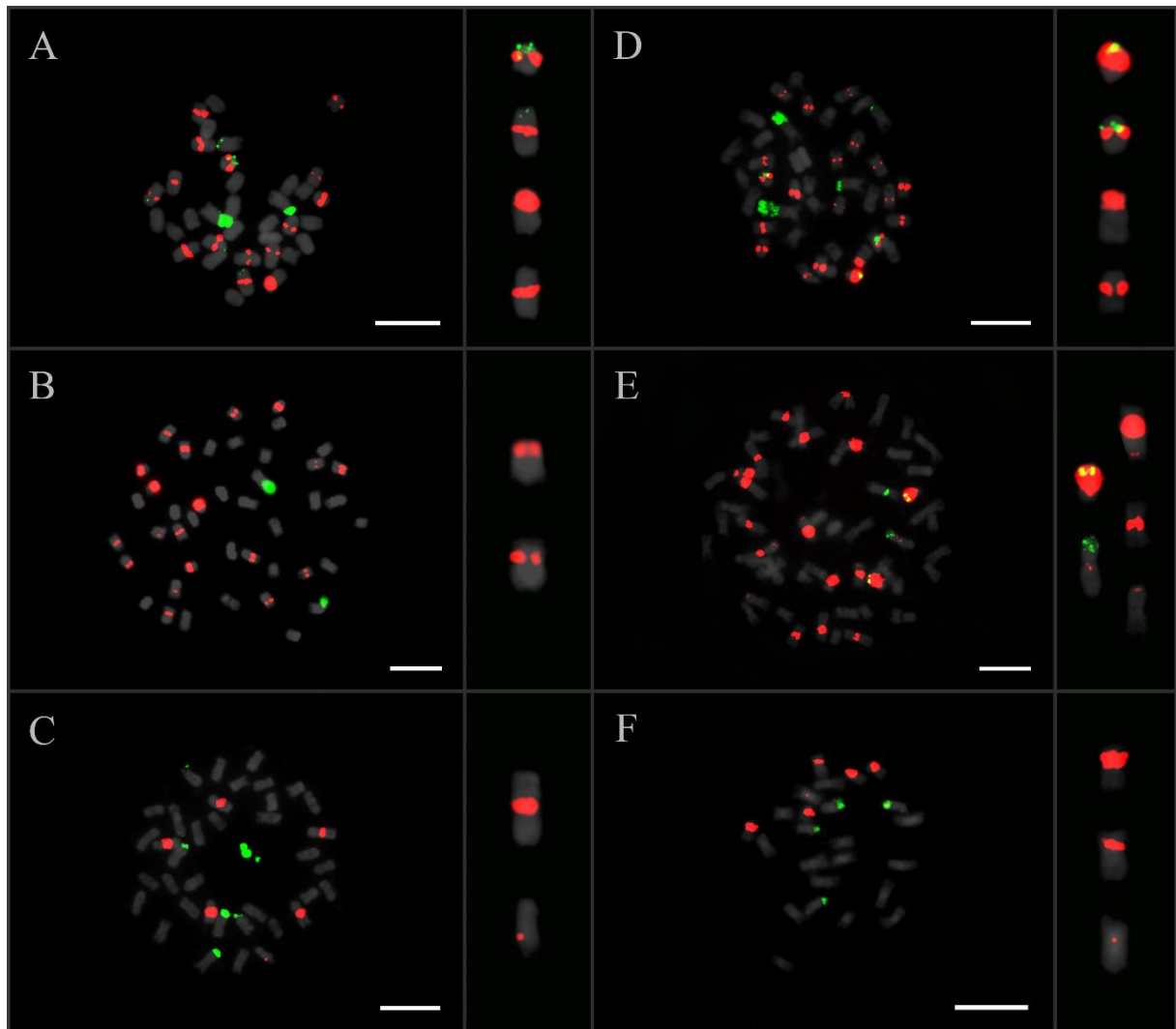
Figura 5 -Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA Uhum-spec 12 em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U.humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e de *U.dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 μ m.



Fonte: Do autor 2024.

UB2 CL4 B105/ UroSat 1a: As marcas da sequência UroSat 1a foram evidenciadas nas regiões terminais e centroméricas (tipo I e V) em números variáveis de cromossomos de todos os acessos (Figura 6, Tabelas 3 e 4). Os acessos H031 (6x) e o DT 159 (4x) apresentaram um único cromossomo com sinal intersticial (tipo IV), (Figura 6C e 6F). Além disso, o acesso DT150 foi o único a apresentar cromossomo tipo I (terminal, acompanhado de sinal centromérico) em dois pares (Figura 6E).

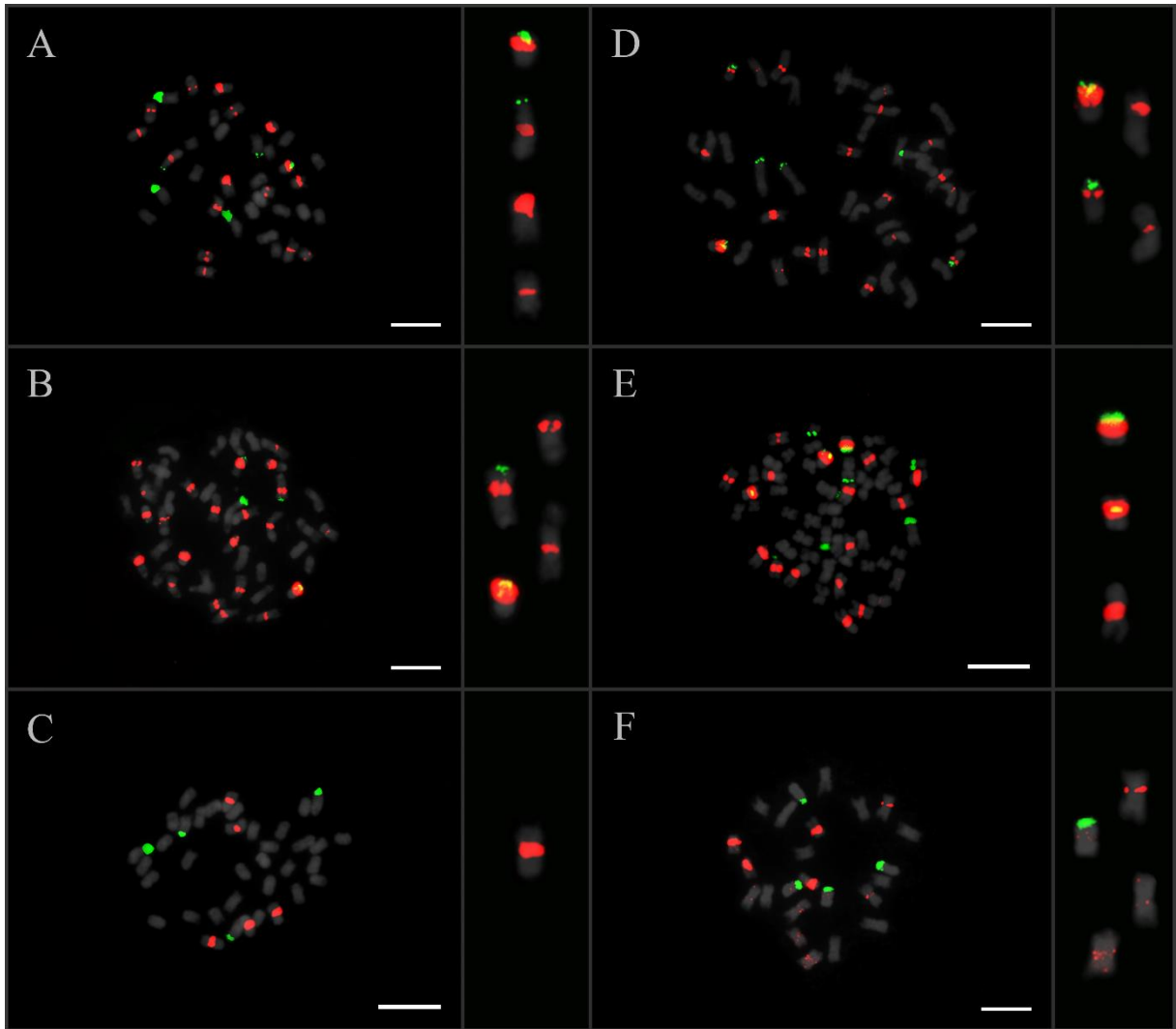
Figura 6 - Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA UB2 CL4 B105/ UroSat 1a em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U.humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e de *U. dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 µm.



Fonte: Do autor 2024.

UD4 CL13 Basilisk/UroSat 2a: As marcas da sequência UroSat 2a foram evidenciadas nas regiões centroméricas (cromossomo tipo V) em números variáveis de cromossomos de todos os acessos (Figura 7, Tabelas 3 e 4). No entanto cromossomos tipo I também foram confirmados nos acessos H16 (6x), H030 (7x), H125(7x) e DT 150 (9x). No caso do DT 159 (4x) foram identificados seis cromossomos com marcas centroméricas (tipo V) e outros seis com marcações dispersas (tipo VI).

Figura 7 - Padrões FISH nas metáfases mitóticas com satDNA UD4 CL13 Basilisk/UroSat 2a em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos de *U.humidicola*: A – H16; B – H030; C – H031; D – H125; e de *U. dictyoneura*: E – DT 150; F – DT 159. Barra = 10 µm.



Fonte: Do autor 2024.

Tabela 4 - Distribuição cromossômica das sequências satDNA em acessos de *U. dictyoneura* (DT 150 e DT159).

CARACTERÍSTICAS	H016	H031	H030	H125
Nº de cromossomos	36	36+1	42	42
Nível de ploidia	6x	6x	7x	7x
NB cromossomos	6	6	6	6
Classe dos cromossomos	Metacêntricos	Metacêntricos	Metacêntricos	Metacêntricos
Nº cromossomos com sinais FISH				
Uhum-spec 3	18	10	30 a 32	20,23, 24 a 25
Uhum-spec 4	18	10	27	24
Uhum-spec 7	17	10	16	28
Uhum-spec 9	17	10	17	28
Uhum-spec 12	19	29	30	36
UB2 CL4 B105/ UroSat 1a	15	6	19	20
UD4 CL13 Basilisk/UroSat 2a	16	5	22	18
rDNA18S	4 a 7	4 a 5	10 a 12	7 a 8
Localização das marcações nos cromossomos				
Uhum-spec 3	Terminal	Terminal	Terminal/Centromérica	Terminal/Centromérica /Intersticial
Uhum-spec 4	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal
Uhum-spec 7	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal
Uhum-spec 9	Terminal	Terminal	Terminal/Centromérica	Terminal/Intersticial
Uhum-spec 12	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal
UB2 CL4 B105/ UroSat 1a	Centromérica	Centromérica/Intersticial	Terminal/Centromérica	Terminal/Centromérica
UD4 CL13 Basilisk/UroSat 2a	Centromérica	Terminal	Terminal/Centromérica	Terminal/Centromérica
rDNA18S	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal

Fonte: Do autor 2024.

Tabela 4 - Distribuição cromossômica das sequências satDNA em acessos de *U. dictyoneura* (DT 150 e DT159).

CARACTERÍSTICAS	DT 150	DT 159
Nº de cromossomos	54	24
Nível de ploidia	9x	4x
NB cromossomos	6	6
Classe dos cromossomos	Metacêntricos	Metacêntricos
Nº cromossomos com sinais FISH		
Uhum-spec 3	22	Disperso
Uhum-spec 4	21	Disperso
Uhum-spec7	11	Quase inexistente
Uhum-spec9	11	12
Uhum-spec12	35	7
UB2 CL4	20	7
B105/UroSat 1a		
UD4 CL13	19	12
Basilisk/UroSat 2a		
rDNA18S	9 a 10	4
Localização das marcações nos cromossomos		
Uhum-spec 3	Terminal	Disperso em região terminal e centrômero
Uhum-spec 4	Terminal	Disperso em região terminal e centrômero
Uhum-spec7	Terminal	Quase inexistente
Uhum-spec9	Terminal	Terminal/Centromérica/Intersticial
Uhum-spec12	Terminal/Centromérica	Terminal/Centromérica
UB2 CL4	Terminal/Centromérica	Intersticial/Centromérica
B105/UroSat 1a		
UD4 CL13	Terminal/Centromérica	Centromérica/Dispersa
Basilisk/UroSat 2a		
rDNA18S	Terminal	Terminal

Fonte: Do autor 2024.

7. DISCUSSÃO

Nosso estudo expandiu a análise nos cromossomos com a aplicação de sequências satélites que identificou diferentes tipos cromossômicos encontrados *U. humidicola* e *U. dictyoneura*. A investigação incluiu diferentes acessos de *Urochloa*, permitindo uma comparação tanto intra quanto interespecífica. Os resultados demonstraram a presença das sequências satDNA investigadas em cromossomos dos acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, o que sugere uma alta conservação dessas repetições no complexo "humidicola", exceto no tetraploide DT159.

A conservação das sequências entre ambas espécies de *Urochloa* pode ser atribuída ao “modelo de biblioteca”, no qual os satelíomas encontrados em espécies relacionadas compartilham um repertório (biblioteca) de satDNAs herdados de um ancestral comum (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023). No entanto, qualquer membro desta biblioteca pode sofrer amplificação e emergir como satDNAs principal, enquanto outros persistem em níveis mais baixos, resultando em perfis espécie-específicos (Šatović-Vukšić; Plohl, 2023).

As famílias de satDNA não compartilhadas, ou ausentes como no caso do acesso DT159, podem, após a separação de ambas as espécies, ter surgido *de novo*, ou desaparecerem em uma das espécies (Camacho *et al.* 2022). Sabe-se que basta um único evento de amplificação de uma única família de DNA satélite em uma espécie, para que em outra, ela apareça como um satélite de baixo número de cópias (Thakur; Packiaraj; Henikoff, 2021). Estes achados podem estar relacionados com os diferentes mecanismos responsáveis pela evolução dos satDNAs durante o processo de especiação em *Urochloa*.

Os resultados da FISH mostram que as sequências satélites usadas neste estudo, identificadas por Tomaszewska *et al.* (2023) e Corrêa *et al.* (dados não publicados), não são espécie-específicas, pois apareceram tanto em *U. humidicola* quanto em *U. dictyoneura*.

Entre os citótipos também foram observados polimorfismos para o número, tamanho, intensidade de sinais e distribuição das sequências satDNA, sendo mais abundantes nos acessos hepta (H125 e H030) e nonaploide (DT150). Essas variações podem estar relacionadas aos ciclos de hibridação e poliploidização que deram origem a esses acessos, pois *U. humidicola* é um aloploiploide (Vigna *et al.* 2016) e *U. dictyoneura* um autoploiploide (Risso-Pascotto, Pagliarini; Valle 2006b). Durante esses processos, mutações pontuais ou amplificações

(duplicação em tandem) podem aumentar a divergência entre os diferentes monômeros que compõem todo o conjunto de sequências de satDNA (Camacho *et al.* 2022). Visto sua rápida evolução, os satDNA demonstram divergência tanto no número de cópias quanto na sequência, mesmo entre espécies estreitamente relacionadas (Becher *et al.* 2021).

No gênero *Deschampsia* P. Beauv. (Poaceae), por exemplo, os rearranjos cromossômicos detectados nas espécies incluem várias translocações, que envolvem principalmente as regiões subterminais dos cromossomos com clusters de sequências satélite CON/COM. De acordo com Carrido-Ramos *et al.* (2015) as repetições de DNA estão frequentemente envolvidas em rearranjos cromossômicos que podem levar à reorganização genômica e contribuir para a diversidade genética durante a evolução. Logo, a análise comparativa dos padrões de localização do satDNA em cariótipos das espécies vegetais permite estudar os padrões específicos de sua distribuição em cariótipos, identificar todos os pares homólogos de cromossomos e também detectar rearranjos cromossômicos.

Os genomas de eucariotos geralmente contêm uma alta diversidade de famílias de satDNA. É reconhecido que o satDNA desempenha um papel crucial na definição da arquitetura, função e evolução da heterocromatina e eucromatina cromossômica, e pode estar associado a elementos transponíveis (Garrido-Ramos, 2015). A presença de marcas fora das regiões heterocromáticas, como em regiões intersticiais, aponta que o DNA satélite também está contido em regiões eucromáticas (Ruiz-Ruano *et al.* 2016; Satović-Vukšić; Pholhl, 2023). Além disso, os tipos de DNA satélite (microsatélites, minissatélites e satélites) podem apresentar semelhanças em níveis genômicos e citológicos. Assim, é possível encontrar satDNAs com comprimento de monômero atingindo os domínios de microsatélites e minissatélites ocupando locais fora da heterocromatina (Ruiz-Ruano *et al.* 2016).

Diferentemente do que foi observado no complexo ‘brizantha’ (Corrêa *et al.* dados não publicados), nenhuma das sequências investigadas evidenciou sinais centroméricos em todos os cromossomos dos acessos avaliados, inclusive a sonda Urosat 1a que foi sugerida como um componente essencial dos centrômeros de *Urochloa* nas espécies do complexo “Brizantha” por Corrêa *et al.* (dados não publicados). O maior número de centrômeros marcados com as sequências UroSat 1a e 2a foi identificado nos acessos H016 e H031, ambos hexaploides. Outras sondas (Uhum-spec3, Uhum-spec9 e Uhum-spec12) também marcaram as regiões centroméricas de alguns cromossomos nos citótipos H30 (7x), H125 (7x) e DT159 (9x). Uma

vez que as sequências satélites podem ser encontradas em regiões centroméricas, a ausência de repetições de DNA organizadas em tandem nos centrômeros de alguns cromossomos sugere que essas regiões sejam compostas por diversos RTs ou outros tipos de sequências satDNA não investigadas ou a natureza dos retrotransposon específicos dos centrômeros. Outro fator para não visualização dessas sequências pode estar relacionado às limitações da resolução da FISH e do microscópio de fluorescência.

A sequência Uhum-spec 3 demonstrou marcações em 18, 32, 10, 25 e 22 cromossomos nos acessos H016, H030, H031, H125 e DT150, respectivamente, predominantemente nas regiões terminais e centroméricas. Esse padrão de marcação diferiu dos resultados observados por Tomaszewska *et al.* (2023) que identificaram 18 cromossomos com sinais nas posições terminais no acesso CIAT 26151 de *U. humidicola* (6x), mas em *U. humidicola* (8x+2 ou 9x-4 - CIAT 16867), os cromossomos não apresentaram sinais de hibridização. No acesso CIAT 26151 avaliado por Tomaszewska *et al.* 2023, oito cromossomos apresentavam sinais Uhum spec 3 e Uhum spec 1 e foram associados aos genomas B de *U. humidicola*.

Um aspecto notável das marcas evidenciadas pelas diferentes sequências utilizadas neste estudo, incluindo aquelas não testadas por Tomaszewska *et al.* (2023), como a Uhum-spec 9, é que as marcas não se restringem apenas às regiões terminais. Observamos sinais não apenas terminais, mas também intersticiais e centroméricos, com alguns cromossomos apresentando múltiplos sinais. Isso revela potenciais rearranjos cromossômicos nos diferentes acessos analisados — um resultado inédito que amplia a compreensão da plasticidade genômica e da dinâmica estrutural dos cromossomos neste grupo.

Em contraste com os padrões dispersos observados por Tomaszewska *et al.* (2023) para Uhum-spec 7, nossos resultados evidenciam marcações específicas nas regiões terminais e uma considerável variação no número de cromossomos marcados entre os diferentes acessos com essa sonda. Esta descoberta demonstra a complexidade e a dinâmica das sequências satélites no genoma de *U. humidicola*, oferecendo novos insights sobre sua organização e evolução.

Notavelmente, alguns acessos apresentaram a mesmo número de cromossomos marcados com algumas sequências de satDNA. Por exemplo, o acesso H031 exibiu 10 cromossomos marcados com as sondas Uhum-spec 3 e 4, originadas da mesma sequência satDNA (Tomaszewska *et al.* 2023). Isso pode ser atribuído à evolução concertada dessas sequências, onde os monômeros em arranjos de satDNA evoluem de forma coordenada,

mantendo baixa variabilidade entre eles (Satović-Vukšić; Pohl, 2023). Conforme discutido por Satović-Vukšić;Pohl (2023), as mutações nos monômeros são rapidamente homogeneizadas, sendo disseminadas ou eliminadas dentro das matrizes de satDNA e fixadas entre os indivíduos.

A sequência Uhum-spec 9, identificada por Tomaszewska *et al.* (2023) como potencialmente específica do genoma de *U. humidicola* CIAT 26155 ($2n = 6x = 36$), foi testada por meio da FISH pela primeira vez no presente trabalho. Essa sequência foi localizada em cromossomos de todos os citótipos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, com notável abundância no acesso H125 (7x). Nesse acesso, seis cromossomos apresentaram marcações do tipo III, sendo quatro duplo terminal e dois terminal acompanhado de rDNA 18S, além de um cromossomo com marcação intersticial. Esses achados sugerem que *U. humidicola* pode ter passado provavelmente por várias rodadas de poliploidização como sugerido por Tomaszewska *et al.* (2023), no qual evidenciou que o genoma B de *U. humidicola* inclui cromossomos com três tipos distintos de sinais, o que mostra a complexidade do genoma.

O satDNA Uhum-spec 12 foi descrito por Tomaszewska *et al.* (2023) como sequência específica do genoma A de *U. humidicola*, marcando seis pares de cromossomos na região centromérica no acesso hexaploide CIAT 26151. Os acessos avaliados em nosso estudo mostram uma maior distribuição e variação de posição dessa sequência nos cromossomos de todos os acessos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, novamente com a exceção do DT 159 (4x) que apresentou apenas sete cromossomos marcados com a sonda. No acesso H016, com mesmo nível de ploidia do CIAT 26151, e no H031 ($6x+1$) foram identificados 19 e 29 cromossomos com sinal Uhum-pec12. Em particular, os acessos H30 (7x), H125 (7x) e DT 150 (9x) apresentaram mais de 30 cromossomos marcados. Os sinais de hibridização foram identificados em regiões terminais, duplo terminais, centroméricas e intersticiais. Os resultados obtidos sugerem que Uhum spec 12 está presente também nos outros genomas de *U. humidicola* ou pode ser indicativo da autoaloploidia.

Comparando os acessos hexaploides H016 e H031, observamos que H016 possui um número maior de cromossomos marcados com as sequências investigadas. O acesso aneuploide H031 (suposto híbrido e com genoma AABBBB), mostrou uma organização dos cromossomos em seis grupos, de acordo com o nível de ploidia (Damasceno *et al.* 2023). As sequências Uhum-spec 7 e Uhum -spec 9 evidenciaram 10 cromossomos, sendo um par de cromossomos marcados no braço curto e longo em região terminal, enquanto os oito cromossomos restantes

mostram marcações na região terminal. De acordo com Vigna *et al.* (2016) H031 é considerado um aloploiploide natural recente, apresentando evidências de dissomia e se originou a partir de uma planta diploide sexual ($2n = 2x = 12$, genoma A) e um macho tetraploide apomítico ($2n = 4x = 24$, genoma B), assim seu conjunto cromossômico seria formado por cromossomos homólogos e homeólogos.

O citótipo DT150 (9x) de *U. dictyoneura* apresentou padrões de distribuição de satDNA semelhantes em termos de posição e número de loci aos observados nos citótipos de *U. humidicola*. Esta semelhança marcante sugere a possibilidade de uma identificação incorreta deste acesso como *U. dictyoneura*, ou confirmando *U. humidicola* e *U. dictyoneura* possam ser sinônimas (Pow, 2024). Em contraste, o acesso DT159 não exibiu marcas definidas de sequências para alguns satDNA, como Uhum-spec3, Uhum-spec4 e Uhum-spec7, sendo seus sinais quase imperceptíveis. Para os satDNA Uhum-spec 9 e 12, o padrão observado parece ser conservado apenas em 12 e 7 cromossomos, com pequenos sinais mais fracos indicando que este acesso é provavelmente um verdadeiro representante de *U. dictyoneura*. A ausência de alguns sinais FISH, como observado para o tetraploide de *U. dictyoneura* (DT159), pode ser atribuído a não ocorrência dessa sequência nos cromossomos ou limitações de resolução para serem detectados via FISH pela microscopia de fluorescência.

O fato de apresentar um padrão completamente diferente tanto dos citótipos de *U. humidicola* como do acesso DT 150, levanta questões sobre a possibilidade de DT159 pertencer a uma outra espécie. No entanto, uma investigação integrada morfológico, citomolecular e taxonômico dos citótipos dentro do complexo é necessária para confirmar essa hipótese. Morfologicamente o acesso DT150 apresenta um hábito de crescimento similar com *U. humidicola* (estolonífera), enquanto DT 159 forma tufos. Segundo a literatura, a principal diferenciação entre *U. humidicola* e *U. dictyoneura* é a presença de um anel visível na face abaxial, resultado da união entre a bainha e o limbo, característica ausente em *U. humidicola* (Roche, Menéndez, & Hernández, 1990; Morrone & Zuloaga, 1992). Além disso, os cromossomos *U. humidicola* são conhecidos por apresentar condensação tardia das regiões terminais (Nani *et al.* 2016), característica observada com menor frequência em DT159 e DT 158 (Figura S1, Dados suplementares).

A rápida evolução do DNA repetitivo, torna-os marcadores interessantes a fim de revelar as relações entre espécies intimamente relacionadas que compartilham o mesmo

satDNA. No entanto, a homogeneidade do satDNA é mantida dentro das espécies, mas a sequência de DNA em grupos separados de indivíduos diverge rapidamente (Garrido-Ramos *et al.* 1999). Isso poderia explicar por que DT 159, apresentou um padrão completamente diferente dos acessos de *U. humidicola* e inclusive DT 150. A FISH adicional em outro acesso tetraploide de *U. dictyoneura* (DT 158) (Figura S1, Dados suplementar 1) gerou sinais Uhum spec 3, Uhum spec 7, Uhum spec9 e UroSat 2a com padrão similar ao observado para o acesso DT 159. Visto que a evolução dos satDNA pode atuar como uma barreira reprodutiva (Ferree;Barbash, 2009), os satDNA em cada espécie podem evoluir de forma independente tanto acumulando mutações como também eliminando essas sequências repetitivas. Esse processo de eliminação pode ter ocorrido em DT 159 e explicar os sinais menores observados em seus cromossomos em comparação a DT 150.

Uma análise detalhada das marcações de DT150 sugere que este acesso seja provavelmente um aloploiploide segmental, com base no agrupamento dos cromossomos. O acesso DT 159, descrito por Risso-Pascotto *et al.* (2006) como uma espécie autopoliploide com cariótipo em avançado estado de diploidização, apresentou tanto cromossomos marcados quanto não marcados em todos os satDNA investigados, exceto o Uhum-spec 7. Notavelmente, sob a sonda UroSat 2a, observamos que dos quatro cromossomos que apresentam rDNA 18S, apenas um par exhibe essa sequência, sugerindo possíveis eventos de perda ou ganho desse satDNA.

8. CONCLUSÕES

Este estudo localizou sete sequências de DNA satélite (satDNA) em diferentes citótipos de *U. humidicola* e *U. dictyoneura*, revelando variações inter e intraespecíficas no complexo "humidicola". A conservação de algumas sequências de satDNA entre as duas espécies apoia o "modelo de biblioteca", enquanto as variações específicas indicam eventos de amplificação, eliminação, dispersão, homogeneização e poliploidização, que contribuem para a diversidade genética de *Urochloa*. As semelhanças de marcações de satDNA entre *U. dictyoneura* (DT150) e *U. humidicola* sugerem possíveis sinônimos taxonômicos, enquanto o padrão distinto observado em *U. dictyoneura* (DT159) indica a necessidade de novas investigações para esclarecer sua identidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. V. *et al.* B. Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 616–621, 2007.
- AKIYAMA, Y.; YAMADA-AKIYAMA, H.; EBINA, M. Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. **Grassland Science**, v. 56, n. 4, p. 217–223, 2010.
- AMOSOVA, A. V. *et al.* Cytogenomics of *Deschampsia* P. Beauv. (Poaceae) species based on sequence analyses and FISH mapping of CON/COM satellite DNA families. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1105, 2021.
- ANDERSON, S. N. *et al.* Transposable elements contribute to dynamic genome content in maize. **The Plant Journal**, v. 100, n. 5, p. 1052-1065, 2019.
- BASAVAI AH, T. C. S. M. Karyomorphological Studies on Five Species of *Urochloa* P. Beauv. (Poaceae). **Cytologia**, v. 55, n. 3, p. 431–435, 1990.
- BASS, H. W.; BIRCHLER, J. A. **Plant cytogenetics: genome structure and chromosome function**. Springer Science & Business Media, 2011.
- BEAUVOIS, A. M. F. J. P. **Essai d'une nouvelle Agrostographie ou nouveaux genres des Graminées**. Chez l'auteur, Paris1812.
- BECHER, H. *et al.* The nature of intraspecific and interspecific genome size variation in taxonomically complex eyebrights. **Annals of Botany**, v. 128, n. 5, p. 639-651, 2021.
- BECHER, H.; SAMPSON, J.; TWYFORD, A. D. Measuring the invisible: the sequences causal of genome size differences in eyebrights (*Euphrasia*) revealed by k-mers. **Frontiers in plant science**, v. 13, p. 818410, 2022.
- BELYAYEV, A. *et al.* Natural history of a satellite DNA family: from the ancestral genome component to species-specific sequences, concerted and non-concerted evolution. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, p. 1201, 2019.
- BENNETZEN, J. L.; WANG, H. The Contributions of Transposable Elements to the Structure, Function, and Evolution of Plant Genomes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 505–530, 2014.
- BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant molecular biology**, v. 42, p. 251-269, 2000.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, v. 2001, n. 407, p. 157–171, 2001.

- BOLDRINI, K. R. *et al.* Meiotic behavior in nonaploid accessions of *Brachiaria humidicola* (Poaceae) and implications for breeding. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 169–176, 2011.
- BOLDRINI, K. R. *et al.* Origin of a polyploid accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 888–895, 2009.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, v. 85, n. 3, p. 225–228, 2006.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Evidence of natural hybridization in *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Journal of Genetics**, v. 89, n. 1, p. 91–94, 2010.
- BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses $x = 6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1444–1450, 2009.
- BOLZÁN, A. D.; BIANCHI, M. S. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 612, n. 3, p. 189–214, 2006.
- BROWN, T. A. **Genomes 4**. 520 p, 2018.
- CALISTO, V. *et al.* Desynapsis and precocious cytokinesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) compromise meiotic division. **Journal of Genetics**, v. 87, n. 1, p. 27–31, 2008.
- CAMACHO, J. P. M. *et al.* Satellitome comparison of two oedipodine grasshoppers highlights the contingent nature of satellite DNA evolution. **BMC Biol**, 20, 36 (2022).
- CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SLUYS, M. A. **Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2015.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142–145, 1993.
- CHRISTOPHER, J.; ABRAHAM, A. Studies on the Cytology and Phylogeny of South Indian Grasses: II. Subfamily VI: Panicoideae, tribe (i) The Paniceae. **Cytologia**, v. 41, n. 3, p. 621–637, 1976.
- CORRÊA, C. T. R. **Cytogenomic characterization of the repetitive DNA in the ‘brizantha’ agamic complex of *Urochloa P. Beauv.* (Poaceae)**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023.

- DAMASCENO, A. G. *et al.* Physical mapping of ribosomal DNA sites and genome size in polyploid series of *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae). **Botany Letters**, v. 170, n. 4, p. 634-643, 2023.
- DIAMANTE, N. A. *et al.* Molecular analysis of the invasive populations of *Urochloa* (Poaceae) in a large Neotropical reservoir. **Aquatic Botany**, v. 161, n. February 2019, p. 103183, 2020.
- DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13- 15, 1990.
- DUMBOVIC, Gabrijela; FORCALES, Sonia-V.; PERUCHO, Manuel. Emerging roles of macrosatellite repeats in genome organization and disease development. **Epigenetics**, v. 12, n. 7, p. 515-526, 2017.
- FAJKUS, J.; SÝKOROVÁ, E.; LEITCH, A. R. Telomeres in evolution and evolution of telomeres. **Chromosome Research**, v. 13, n. 5, p. 469-479, 2005.
- FAJKUS, P. *et al.* *Allium* telomeres unmasked: The unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)_n is synthesized by telomerase. **Plant Journal**, v. 85, n. 3, p. 337–347, 2016.
- FERREE, P. M.; BARBASH, D. A. Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. **PLoS biology**, v. 7, n. 10, 2009
- FERREIRA, R. C. U. *et al.* An overview of the genetics and genomics of the *Urochloa* species most commonly used in pastures. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 770461, 2021.
- FUZINATTO, V. A. *et al.* Meiotic behavior in apomictic *Brachiaria ruziziensis* × *B. brizantha* (Poaceae) progenies. **Scientia Agricola**, v. 69, p. 380-385, 2012.
- GALLO, P. H. *et al.* 2n gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). **Euphytica**, v. 154, n. 1–2, p. 255–260, 2007. doi: 10.1007/s10681-006-9294-1.
- GAO, D. *et al.* A highly conserved, small LTR retrotransposon that preferentially targets genes in grass genomes. **PLoS one**, v. 7, n. 2, p. e32010, 2012.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. *et al.* Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the Sparidae family (Pisces, Perciformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 200-204, 1999.
- GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA: an evolving topic. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 230, 2017.
GOMES, N. M. V.; SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Telomere biology in Metazoa. **FEBS letters**, v. 584, n. 17, p. 3741-3751, 2010.

GONG, Z. *et al.* Repeatless and repeat-based centromeres in potato: Implications for centromere evolution. **Plant Cell**, v. 24, n. 9, p. 3559–3574, 2012.

GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A. *et al.* Karyotype structure and chromosome fragility in the grass *Phleum echinatum* Host. **Protoplasma**, v. 252, n. 1, p. 301–306, 2015.

GRISEBACH, A. H. **Brachiaria**. In: Ledebour CF (ed) Flora Rossica (Ed.), Fl. Ross. Sumtibus Librariae E. Schweizerbart. Stuttgartiae. p. 469, 1853.

HE, Y. *et al.* Divergence of 10 satellite repeats in *Artemisia* (Asteraceae: Anthemideae) based on sequential fluorescence in situ hybridization analysis: evidence for species identification and evolution. **Chromosome Research**, v. 32, n. 2, p. 5, 2024.

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

HUBBARD, C. E. Gramineae in British flowering plants. **J. Hutchinson**, 1948

JANK, L. *et al.* The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132–1137, 2014.

JUNGMANN, L. *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and geographical origin. **Genome**, v. 53, n. 9, p. 698–709, 2010.

KARASAWA, M. M. G. Diversidade reprodutiva de plantas. **Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo**, 2009.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. do. **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. P. 16-42.

KRASILEVA, K. V. The role of transposable elements and DNA damage repair mechanisms in gene duplications and gene fusions in plant genomes. **Current opinion in plant biology**, v. 48, p. 18-25, 2019.

LEE, S.; KIM, N. Transposable elements and genome size variations in plants. **Genomics & informatics**, v. 12, n. 3, p. 87, 2014.

LEVAN, A. K.; FREDGA, K.; SANDBERG A. A. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-220, 1964.

- LI, W. *et al.* Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. **The Plant Journal**, v. 40, n. 4, p. 500-511, 2004.
- LIN, K. W.; YAN, J. Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 1–2, p. 95–110, 2008.
- LUTTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic behaviour, pollen viability and seed set. **Euphytica**, v. 57, n. 3, p. 267-274, 1991.
- LIU, S. *et al.* Unbiased k-mer analysis reveals changes in copy number of highly repetitive sequences during maize domestication and improvement. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42444, 2017.
- REYNOLDS, G.; STRNADOVA-NEELEY, V.; LACHOWIEC, J. M. k-mer sketching highlights allopolyploid subgenome sequence differentiation. **ISCB-Africa ASBCB**.
- MA, J. *et al.* A. Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 3, p. 134–139, 2007.
- MAASS, B. L. Identifying and Naming *Brachiaria* Species. In: J.W. Miles *et al.* editors, ***Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement***. CIAT, Colombia. p. 1–15, 1996.
- MASCHER, M. *et al.* A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. **Nature**, v. 544, n. 7651, p. 427–433, 2017. doi: 10.1038/nature22043.
- MASTERS, L. E. Diversity and evolution in *Urochloa* grasses for the application in sustainable tropical forage systems. **Unpublished Masters thesis, Queen Mary University of London**.
- MCCLINTOCK, B. The origin and Behavior of Mutable loci in *Maize*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 36, n. 6, p. 344–355, 1950.
- MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 164–171, 2014.
- MELTERS, D. P. *et al.* Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. **Genome Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2013.
- MENDES, L. M. **Análise cariotípica em acessos diploides de *Urochloa brizantha* e *Urochloa decumbens* e poliplóides de *Urochloa dictyoneura* (POACEAE)**. 2020. 40 p. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

- MILES, J. W. VALLE, C. B. Manipulation of Apomixis in *Brachiaria*. In: J.W. Miles et al. editors, ***Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement***. CIAT, Colombia. p. 1–15, 1996.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) para México y América Central. ***Darwiniana***, p. 59-75, 1993.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F.O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introduzidas de los gêneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae:Panicoideae:Paniceae). ***Darwiniana***, v.31, n.1-4, p. 43-109. 1992.
- MOECKEL, Camille *et al.* A survey of k-mer methods and applications in bioinformatics. ***Computational and Structural Biotechnology Journal***, 2024.
- NANI, Thaís F. *et al.* Physical map of repetitive DNA sites in *Brachiaria spp.*: Intravarietal and interspecific polymorphisms. ***Crop Science***, v. 56, n. 4, p. 1769–1783, 2016.
- NASUDA, S. *et al.* Stable barley chromosomes without centromeric repeats. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 102, n. 28, p. 9842–9847, 2005.
- NOVÁK, Petr *et al.* RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. ***Bioinformatics***, v. 29, n. 6, p. 792-793, 2013.
- OROZCO-ARIAS, S.; ISAZA, G.; GUYOT, R. Retrotransposons in plant genomes: structure, identification, and classification through bioinformatics and machine learning. ***International journal of molecular sciences***, v. 20, n. 15, p. 3837, 2019.
- OULO, M.; VAN DER ZON, A. P. M.; SOSEF, M. S. M. New combinations in and typification of tropical African species of *Urochloa* (incl. *Brachiaria*) (Poaceae). ***Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants***, v. 68, n. 2, p. 73-84, 2023.
- PAÇO, A.; FREITAS, R.; VIEIRA-DA-SILVA, A. Conversion of DNA sequences: From a transposable element to a tandem repeat or to a gene. ***Genes***, v. 10, n. 12, p. 1014, 2019.
- PENTEADO, M. I. D. O. *et al.* Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. ***Embrapa Gado de Corte-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)***, 2000.
- PEŠKA, V. *et al.* Characterisation of an unusual telomere motif (TTTTTTAGGG)_n in the plant *Cestrum elegans* (Solanaceae), a species with a large genome. ***Plant Journal***, v. 82, n. 4, p. 644–654, 2015.
- PESKA, V.; GARCIA, S. Origin, Diversity, and Evolution of Telomere Sequences in Plants.

Frontiers in Plant Science, v. 11, n. February, p. 1–9, 2020.

POWO (2024). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, KEW. Published on the internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> Retrieved 18 junho 2024."

RAMAKRISHNAN, M. *et al.* Transposable elements in plants: Recent advancements, tools and prospects. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 40, n. 4, p. 628-645, 2022.

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

RICCI, G. L. *et al.* Meiotic behavior in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) hybrids. **Euphytica**, v. 182, n. 3, p. 355-361, 2011.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; DO VALLE, C. B. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 1, p. 7–10, 2006a.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 5, n. June 2014, p. 837–845, 2006b.

ROCHE, R.; MENÉNDEZ, J.; HERNÁNDEZ, J. E. Características Morfológicas Indispensables para la Clasificación de Especies del Género *Brachiaria*. **Pastos y Forrajes**, v. 13, n. 3, p. 205–222, 1990.

RUIZ-RUANO, F. J. *et al.* High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. *Sci Rep* 6, 28333 (2016).

SABOT, F.; SCHULMAN, A. H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: A hitchhiker's guide to the genome. **Heredity**, v. 97, n. 6, p. 381–388, 2006.

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

SALARIATO, D. L. *et al.* O. Molecular phylogeny of the subtribe Melinidinae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 1, p. 355–369, 2010.

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

ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ, E.; PLOHL, M. Satellite DNAs—From localized to highly dispersed genome components. **Genes**, v. 14, n. 3, p. 742, 2023.

GARCIA, S., KOVAŘÍK, A. Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. *Heredity* 111, 23–33, 2013.

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

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON P. **Practical *in situ* hybridization**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000.

SEITZ, U.; SEITZ, U. The Molecular Weight of rRNA Precursor Molecules and Their Processing in Higher Plant Cells. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 34, n. 3–4, p. 253–258, 1979.

SHANG, W. H. *et al.* Chickens possess centromeres with both extended tandem repeats and short non-tandem-repetitive sequences. **Genome Research**, v. 20, n. 9, p. 1219–1228, 2010.

SIMEÃO, R. M. *et al.* Genomic selection in tropical forage grasses: current status and future applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 665195, 2021.

SMIRNOV, E. *et al.* Nucleolar DNA: the host and the guests. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 145, n. 4, p. 359–372, 2016.

SOSEF, M. S. M. Taxonomic novelties in Central African grasses (Poaceae), Paniceae 1. **Plant Ecology and Evolution**, v. 149, n. 3, p. 356–365, 2016.

SU, H. *et al.* Centromere satellite repeats have undergone rapid changes in polyploid wheat subgenomes. **The Plant Cell**, v. 31, n. 9, p. 2035–2051, 2019.

SUMNER, A. T. **Chromosomes Organization and Functions**. Blackwell Science, 2002.

THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, chromatin and evolution of satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4309, 2021.

TOMASZEWSKA, P. *et al.* Complex polyploid and hybrid species in an apomictic and sexual tropical forage grass group: genomic composition and evolution in *Urochloa* (Brachiaria) species. **Annals of Botany**, v. 131, n. 1, p. 87–108, 2023.

TORRES GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 1, p. 36–44, 2005.

TRAN, T. D. *et al.* Centromere and telomere sequence alterations reflect the rapid genome evolution within the carnivorous plant genus *Genlisea*. **Plant Journal**, v. 84, n. 6, p. 1087–1099, 2015.

TRINIUS, C. B. De Graminibus paniceis: Disertatio botanica altera. Petropoli. **Impendis Academiae Imperialis Scientiarum, St. Petersburg**, v. 85, p. 125–153, 1826.

TRIVIÑO, N. J. *et al.* Genetic diversity and population structure of *Brachiaria* species and breeding populations. **Crop Science**, v. 57, n. 5, p. 2633-2644, 2017.

TROPICOS. **Missouri Botanical Garden**. Acesso em: 1 fev. 2021.

VALLE, C. B. do. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: Estudos Básicos Visando Ao Melhoramento Genético. Campo Grande: **EMBRAPA-CNPGC**, 1990.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H. Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MASS, B. L.; VALLE, C. B. do. ***Brachiaria: biology, agronomy, and improvement***. Cali: CIAT, P. 16-42. 1996.

VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M.S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement**. Ed: Singh, R.J., CRC Press, p. 103-151, 2009.

VALLE. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: J.W. Miles *et al.* editors, ***Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement***. CIAT, Colômbia. p. 1–15, 1996.

VELDKAM, J. F. Proposal to conserve the name *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Gramineae) with a conserved type. **Taxon**, v. 45, n. 2, p. 319–320, 1996a.

VELDKAMP, J. F. *Brachiaria, Urochloa* (Gramineae-Paniceae) in Malesia. **Blumea: Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography**, v. 41, n. 2, p. 413–437, 1996b.

VICIENT, C. M.; CASACUBERTA, J. M. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. **Annals of Botany**, v. 120, n. 2, p. 195–207, 2017.

VIGNA, B. B. Z. *et al.* Evidence of allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological analysis and genetic linkage mapping. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153764, 2016.

VIGNA, B. B. Z *et al.* New microsatellite markers developed from *Urochloa humidicola* (Poaceae) and cross amplification in different *Urochloa* species. **BMC research notes**, v. 4, p. 1-11, 2011.

VONDRAK, T. *et al.* Characterization of repeat arrays in ultra-long nanopore reads reveals frequent origin of satellite DNA from retrotransposon-derived tandem repeats. **Plant Journal**, v. 101, n. 2, p. 484–500, 2020.

JIN, W. *et al.* Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. **The Plant Cell**, v. 16, n. 3, p. 571-581, 2004.

WEBSTER R. D. The Australian Paniceae (Poaceae). Berlin and Stuttgart: J. Cramer, **Austrobaileya**, v. 3, n. 1, p. 168–171, 1987.

WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press pp: 315–322. 1990.

WICKER, Thomas *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature reviews genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.

XIONG, Jie *et al.* Synthetic apomixis: the beginning of a new era. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 79, p. 102877, 2023.

ZHANG, Y. *et al.* The diversity of sequence and chromosomal distribution of new transposable element-related segments in the rye genome revealed by FISH and lineage annotation. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1706, 2017.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela 4 - Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H016 $2n=6x=36$): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (C), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR), razão entre braços (RB) índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	L (μm)	C (μm)	CTi (μm)	CR (%)	RB (L/C)	Morfologia
1	2,52	1,92	4,44	10,3376	1,31	m
1'	2,04	1,87	3,90	9,080326	1,09	m
2	2,32	1,75	4,07	9,464494	1,33	m
2'	2,02	1,88	3,90	9,068685	1,07	m
3	1,99	1,91	3,90	9,080326	1,04	m
3'	2,21	1,42	3,63	8,440047	1,55	m
4	1,72	1,48	3,20	7,450524	1,16	m
4'	1,93	1,39	3,32	7,718277	1,39	m
5	1,69	1,64	3,33	7,753201	1,03	m
5'	1,79	1,50	3,29	7,648428	1,20	m
6	1,78	1,21	2,98	6,9383	1,47	m
6'	1,57	1,45	3,02	7,01979	1,08	m

Fonte: Do autor 2024.

Tabela 5 - Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H030 $2n=7x=42$): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (C), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR), razão entre braços (RB) índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	L (μm)	C (μm)	CTi (μm)	CR (%)	RB (L/C)	Morfologia
1	2,83	2,47	5,30	8,24	1,14	m
1'	2,47	2,05	4,52	7,03	1,20	m
1''	2,24	2,10	4,34	6,75	1,07	m
2	2,31	1,79	4,09	6,36	1,29	m
2'	2,28	1,83	4,11	6,39	1,25	m
2''	1,98	1,84	3,82	5,95	1,08	m
3	2,05	1,68	3,73	5,79	1,22	m
3'	1,99	1,86	3,85	5,99	1,07	m
3''	1,77	1,58	3,35	5,21	1,12	m
4	1,78	1,71	3,48	5,41	1,04	m
4'	1,58	1,43	3,01	4,68	1,10	m
4''	1,77	1,55	3,32	5,16	1,15	m
5	1,89	1,49	3,38	5,26	1,27	m
5'	1,48	1,13	2,61	4,06	1,31	m
5''	1,67	1,44	3,11	4,84	1,16	m

6	1,62	1,37	2,98	4,64	1,18	m
6'	1,39	1,24	2,63	4,09	1,12	m
6''	1,38	1,28	2,66	4,13	1,07	m

Fonte: Do autor 2024.

Tabela 6 - Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H031 $2n=6x=36+1$): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (C), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR), razão entre braços (RB) índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	L (μm)	C (μm)	CTi (μm)	CR (%)	RB (L/C)	Morfologia
1	2,58	1,84	4,42	10,75	1,41	m
1'	2,00	1,53	3,53	8,59	1,31	m
2	2,37	1,62	3,99	9,70	1,46	m
2'	2,01	1,40	3,42	8,32	1,43	m
3	2,74	1,49	4,23	10,29	1,84	m
3'	1,71	1,62	3,33	8,10	1,06	m
4	1,90	1,57	3,46	8,43	1,21	m
4'	1,77	1,38	3,15	7,66	1,28	m
5	1,70	1,59	3,29	8,01	1,07	m
5'	1,62	1,37	2,99	7,28	1,18	m
6	1,78	1,16	2,94	7,15	1,53	m
6'	1,29	1,05	2,35	5,71	1,23	m

Fonte: Do autor 2024.

Tabela 7 - Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso H125 $2n=7x=42$): comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (C), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR), razão entre braços (RB) índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	L (μm)	C (μm)	CTi (μm)	CR (%)	RB (L/C)	Morfologia
1	2,73	2,54	5,27	7,07	1,07	m
1'	2,42	2,27	4,69	6,29	1,07	m
1''	2,39	2,11	4,49	6,03	1,13	m
2	2,64	2,24	4,88	6,55	1,18	m
2'	2,42	2,29	4,71	6,31	1,05	m
2''	2,37	2,13	4,50	6,03	1,11	m
3	2,58	2,11	4,69	6,29	1,22	m
3'	2,19	2,03	4,22	5,66	1,08	m
3''	2,23	1,90	4,13	5,53	1,17	m
4	2,15	1,91	4,06	5,45	1,13	m
4'	2,18	1,67	3,84	5,15	1,31	m
4''	2,01	1,81	3,81	5,11	1,11	m

5	2,09	1,88	3,97	5,32	1,11	m
5'	2,10	1,68	3,78	5,07	1,25	m
5''	1,76	1,51	3,27	4,39	1,17	m
6	2,18	1,4	3,58	4,80	1,56	m
6'	1,82	1,62	3,43	4,60	1,12	m
6''	1,71	1,54	3,25	4,35	1,11	m

Fonte: Do autor 2024.

Tabela 8 - Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso DT 159 $2n = 4x = 24$) comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (C), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR), razão entre braços (RB) índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	L (μm)	C (μm)	CTi (μm)	CR (%)	RB (L/C)	Morfologia
1	2,71	2,53	5,24	21,03	1,07	m
2	2,53	2,19	4,72	18,94	1,16	m
3	2,18	1,91	4,09	16,41	1,14	m
4	2,03	1,92	3,95	15,84	1,06	m
5	1,98	1,85	3,83	15,37	1,07	m
6	1,64	1,45	3,09	12,40	1,13	m

Fonte: Do autor 2024.

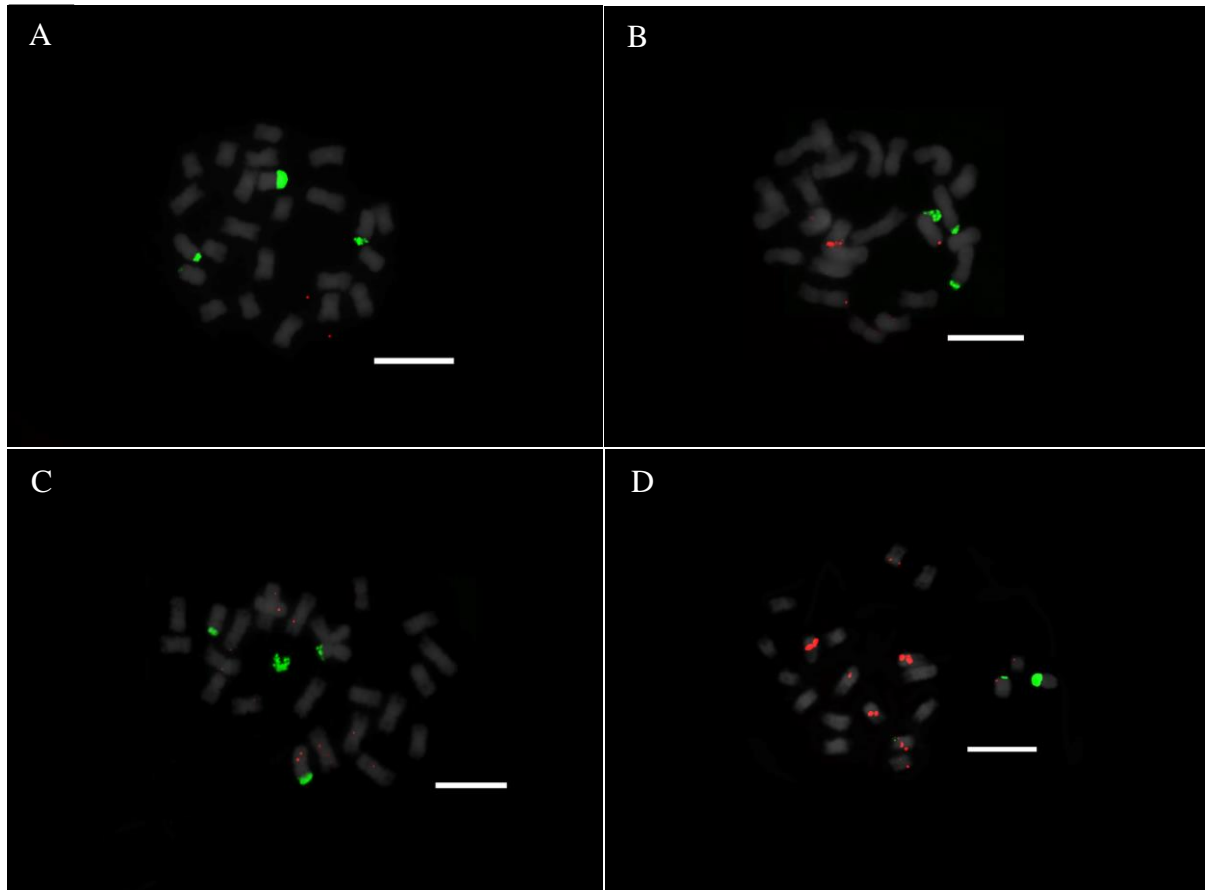
Tabela 9 - Morfometria dos cromossomos *Urochloa humidicola* (acesso DT 150 $2n = 9x = 54$) comprimento do braço longo (L), comprimento do braço curto (C), comprimento total dos cromossomos (CTi), comprimento relativo (CR), razão entre braços (RB) índice centromérico (IC).

Grupo Cromossômico	L (μm)	C (μm)	CTi (μm)	CR (%)	RB (L/C)	Morfologia
1	3,54	3,38	6,92	9,69	1,05	m
1'	2,60	2,34	4,93	6,91	1,11	m
1''	2,55	2,27	4,81	6,74	1,12	m
2	2,66	2,24	4,90	6,86	1,19	m
2'	2,50	2,15	4,64	6,51	1,16	m
2''	2,36	1,89	4,25	5,95	1,24	m
3	2,71	2,11	4,82	6,75	1,28	m
3'	2,12	1,98	4,10	5,74	1,07	m
3''	2,06	1,74	3,80	5,32	1,18	m
4	2,24	2,18	4,42	6,19	1,03	m
4'	1,91	1,77	3,68	5,15	1,07	m
4''	2,14	1,63	3,77	5,28	1,32	m
5	1,48	1,25	2,73	3,82	1,18	m
5'	1,78	1,71	3,49	4,89	1,04	m
5''	1,70	1,32	3,02	4,23	1,29	m

6	1,12	0,95	2,07	2,90	1,18	m
6'	1,37	1,22	2,60	3,64	1,12	m
6''	1,39	1,05	2,43	3,41	1,32	m

Fonte: Do autor 2024.

Figura S1 - Padrões FISH nas metáfases mitóticas do acesso DT 158 ($2n = 4x = 24$) com Uhum - spec 3 (A), Uhum-spec 7 (B), Uhum -spec 9 (C), UD4 CL 13 - UroSat 2a Basilisk (D) em vermelho e rDNA 18S em verde nos acessos. Barra = 10 μ m.



Fonte: Do autor 2024.