



NATHÁLIA GOMIDE ZANETTI BONETTI

**CONTAGENS CROMOSSÔMICAS E DETERMINAÇÃO DO
CONTEÚDO DE DNA DE *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.)**

Stapf

**LAVRAS-MG
2021**

NATHÁLIA GOMIDE ZANETTI BONETTI

**CONTAGENS CROMOSSÔMICAS E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA
DE *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de
Ciências Biológicas para a obtenção
do título de Bacharel.

Prof^ª Dr^ª Vânia Helena Techio
Orientadora

LAVRAS-MG

2021

NATHÁLIA GOMIDE ZANETTI BONETTI

**CONTAGENS CROMOSSÔMICAS E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA
DE *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf**

**CHROMOSOME COUNTING AND DNA CONTENT OF *Urochloa dictyoneura* (Fig. &
De Not.) Stapf**

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de
Ciências Biológicas para a obtenção
do título de Bacharel.

APROVADA em 24 de março de 2021
Dr^a Vânia Helena Techio UFLA
Ms. Marco Tulio Mendes Ferreira UFLA
Ms. Yasmim Dutra Santos UFLA
Ms. Lucas Muñoz Mendes UFLA

Prof^a Dr^a Vânia Helena Techio
Orientadora

LAVRAS-MG

2021

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pelo ensino, incentivo à pesquisa e pela bolsa de iniciação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento dos projetos do Laboratório de Citogenética da UFLA.

À EMBRAPA, pelo fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho e demais pesquisas desenvolvidas pelo grupo de Citogenética da UFLA.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia da UFLA, pelo ensino, parceria, suporte, gerência e manutenção dos espaços e laboratórios.

À professora Vânia, pela orientação, aprendizado e assistência, por toda a ajuda e apoio e por estar sempre à disposição para ajudar na solução dos nossos problemas.

Aos meus colegas de laboratório, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho e, principalmente, pelo companheirismo. Vocês são 10!!

Ao Caio e ao Lucas, pelo trabalho conjunto, por tudo que me ensinaram e por todas as vezes que me ajudaram e foram muitas. Sou muito grata a vocês!!

Aos meus amigos, pela amizade e por fazerem parte da minha vida. Vocês são muito importantes para mim e eu os prezo com imenso carinho!!

Ao Alexandre, por ser mais que meu irmão mais novo, por ser meu amigo. Vou sempre cuidar de você e você de mim!!

Aos meus pais, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, por me ajudarem com, literalmente, tudo e por estarem sempre presentes. Obrigada por se dedicarem e se doarem 100%. Devo muito a vocês!!

À minha família, por me motivarem e sempre me colocarem para cima, acreditando em mim mais do que eu mesma. Amo muito todos vocês!!

1 **Contagens cromossômicas e determinação do conteúdo de DNA de *Urochloa dictyoneura***
2 **(Fig. & De Not.) Stapf**

3
4 **Número cromossômico de *Urochloa dictyoneura***

5
6 Periódico: Acta Scientiarum. Biological Sciences

7 Condição do artigo: a ser submetido

8
9 **RESUMO**

10
11 No Brasil, plantas do gênero *Urochloa* são cultivadas como forrageiras em campos de
12 pastagens e servem como alimento para o gado. Por essa razão, algumas espécies desse
13 gênero são alvo de pesquisa em programas de melhoramento genético que visam aumentar a
14 qualidade e produtividade forrageira no país. Especificamente, *Urochloa dictyoneura* é
15 tolerante às cigarrinhas-das-pastagens, apresenta qualidades agronômicas e possui um alto
16 potencial para o cultivo em áreas úmidas. Porém, essa espécie é ainda pouco estudada e
17 empregada nos programas de melhoramento. A citogenética se apresenta como uma ciência
18 que oferece informações essenciais para a compreensão do genoma das espécies e estudo de
19 diversidade. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi realizar a contagem cromossômica e
20 estimar a quantidade de DNA nuclear de seis acessos de *Urochloa dictyoneura*. Para isso,
21 pontas de raízes foram coletadas, pré-tratadas com ciclohexamida 12,5 mg L⁻¹, fixadas e
22 armazenadas. A região meristemática, previamente excisada e submetida à digestão da parede
23 celular com um mix enzimático, foi usada no preparo das lâminas por dissociação celular e
24 secagem ao ar. A estimativa da quantidade de DNA foi obtida por meio de citometria de
25 fluxo. Como resultados, foram encontrados 2n=24 cromossomos para os acessos DT157,
26 DT160 e DT161 e 2n=54 cromossomos para os acessos DT150, DT154 e DT155. Os valores
27 estimados de conteúdo de DNA foram, em média, 2,78 pg para os acessos com 2n=24
28 cromossomos e 3,62 pg para os acessos com 2n=54 cromossomos, exceto para DT155 (4,46
29 pg), que apresentou um valor acima da média. A realização de trabalhos futuros com a
30 aplicação de técnicas citomoleculares será de grande valia para aumentar o conhecimento
31 sobre *Urochloa dictyoneura*.

33 **PALAVRAS-CHAVE:** *Brachiaria*, forrageiras, pastagem, citogenética, citometria de fluxo,
34 número cromossômico.

35

36 **INTRODUÇÃO**

37

38 *Urochloa* P. Beauv é um gênero pertencente à família Poaceae e compreende plantas
39 com alto potencial forrageiro. Tal atributo contribuiu para que algumas de suas espécies
40 ganhassem destaque e fossem semeadas em larga escala em regiões tropicais, inclusive no
41 Brasil (Valle & Pagliarini, 2009), onde ocupam mais de 60% das áreas de pastagem exótica
42 (Jank, Valle & Resende, 2011).

43 No Brasil, algumas das espécies de *Urochloa* mais cultivadas como forrageiras são:
44 *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D Webster, *Urochloa brizantha* (Hoschst. Ex A. Rich) R.D.
45 Webster, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga e *Urochloa ruziziensis* (R.
46 Germ. & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga. Estas espécies são utilizadas como alimento para
47 o gado, possuindo, assim, grande importância econômica para a agropecuária (Alvim, Botrel
48 & Xavier, 2002). Outra espécie que tem se destacado é *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De
49 Not.) Stapf, por apresentar boa adaptabilidade a solos ácidos, mal drenados e com baixa
50 fertilidade (Roche, Menéndez & Hernández, 1990; Oliveira, Machado & Pozo, 2006), boa
51 recuperação depois de pastejo pesado ou ocorrência de seca ou fogo (Alvim et al., 2002) e
52 tolerância aos ataques de cigarrinhas-das-pastagens (Cercopidae) (Roche et al., 1990).

53 Para produzir em larga escala, são necessárias cultivares de alta qualidade e
54 produtividade. Com o propósito de atender essa demanda, os programas de melhoramento
55 genético visam obter plantas com características adequadas para o plantio e forragem. Para
56 isso, tais programas contam com conhecimentos, entre outros, de metodologias e técnicas
57 citogenéticas e citomoleculares como ferramentas para melhor compreender o genoma das
58 espécies de *Urochloa* usadas no país.

59 A citogenética, por sua vez, é uma ciência que estuda os cromossomos e busca
60 descrever indivíduos por meio de seu genoma e atributos citomoleculares, o que é de grande
61 valia se tratando de espécies de *Urochloa*, visto que estas são de difícil distinção por
62 caracteres morfológicos. *Urochloa humidicola* e *U. dictyoneura* pertencem ao complexo
63 “*humidicola*” (Lutts, Ndikumana & Louant, 1991; Renvoize & Maass, 1993) e são
64 morfológicamente parecidas entre si, ao ponto da cultivar Llanero de *U. humidicola* ter sido
65 comercializada por muito tempo como sendo *U. dictyoneura*. De forma similar, as espécies *U.*

66 *decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* se assemelham, sendo, comumente, confundidas
67 umas com as outras no momento de identificação (Maass, 1996; Renvoize, Clayton &
68 Kabuye, 1996). Portanto, fica claro o papel fundamental que a citogenética cumpre para as
69 pesquisas genéticas na área do melhoramento, pois fornece informações cruciais como
70 número cromossômico, nível de ploidia, conteúdo de DNA, análises cariotípicas, entre outras.

71 Como resultado de vários estudos citogenéticos, foram descritos os números básicos
72 $x=5, 7, 8, 9, 12$ para *Urochloa*, sendo $x=9$ predominante (Basappa, Muniyamma &
73 Chinnappa, 1987; Risso-Pascotto, Pagliarini & Valle, 2006; Akiyama, Yamada-Akiyama &
74 Ebina, 2010). Contudo, Risso-Pascotto et al. (2006) e Boldrini et al. (2009a e 2009b)
75 descreveram $x=6$ para *U. dictyoneura* e *U. humidicola*, respectivamente, configurando, assim,
76 um novo número básico para o gênero.

77 Além do número básico, é importante conhecer níveis de ploidia e modo de
78 reprodução das espécies. *Urochloa brizantha* ($2n=4x=36$; $2n=5x=45$; $2n=6x=54$), *U.*
79 *decumbens* ($2n=4x=36$; $2n=5x=45$), *U. humidicola* ($2n=6x=36$; $2n=7x=42$; $2n=9x=54$) e *U.*
80 *dictyoneura* ($2n=4x=24$) são plantas poliploides apomíticas e *U. ruziziensis* ($2n=2x=18$) é
81 diploide sexual. Entretanto, existem representantes diploides sexuais de *U. brizantha*
82 ($2n=2x=18$) e *U. decumbens* ($2n=2x=18$) (Valle & Savidan, 1996; Risso-Pascotto et al., 2006;
83 Valle & Pagliarini, 2009; Boldrini et al., 2009a e 2009b) e há estudos que relatam a existência
84 de um acesso de *U. humidicola* que se caracteriza como poliploide sexual (Valle & Glienke,
85 1991; Boldrini et al., 2011).

86 A maioria dos trabalhos envolvendo o gênero *Urochloa* concentram-se,
87 primordialmente, em análises meióticas e contagens cromossômicas (Ricci et al., 2011) nas
88 espécies do complexo agâmico (*U. ruziziensis*, *U. decumbens* e *U. brizantha*), além da
89 realização de poliplodizações artificiais e bem sucedidos cruzamentos resultando em
90 vigorosos híbridos (Souza Sobrinho, 2009). Análises citomoleculares foram realizadas e
91 possibilitaram maior detalhamento dos cromossomos com o emprego de técnicas de
92 hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (Akiyama et al, 2010; Nielen, Almeida, Carneiro &
93 Araujo, 2010; Nani, Pereira, Souza Sobrinho & Techio, 2016; Mendes, 2020) e hibridização
94 *in situ* genômica (GISH) (Paula, Souza Sobrinho & Techio, 2017; Corrêa et al., 2020).

95 Como já mencionado, *U. dictyoneura* é uma espécie que possui qualidades forrageiras
96 vantajosas. Tendo em vista o número de atributos desejáveis para o melhoramento que possui
97 e sendo considerada uma nova fonte de diversificação genética, acessos dessa espécie vêm
98 sendo incorporados em estudos citogenéticos. No entanto, esses estudos ainda são limitados

99 às análises meióticas. Recentemente, Mendes (2020) apresentou a primeira descrição
100 cariotípica de dois acessos dessa espécie.

101 Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi certificar o número cromossômico e estimar
102 a quantidade de DNA de seis acessos de *Urochloa dictyoneura*.

103

104 MATERIAL E MÉTODOS

105

106 O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética Vegetal, localizado no
107 Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram
108 avaliados seis acessos de *U. dictyoneura* (DT150, DT154, DT155, DT157, DT160 e DT161)
109 provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS
110 (Coordenadas: latitude: 20° 25'307" S longitude: 54° 43'367" W). Os vasos com os acessos
111 foram mantidos em casa de vegetação no Departamento de Biologia da UFLA.

112

113 Obtenção de C-metáfases

114 Para o preparo de lâminas, pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com
115 ciclohexamida 12,5 mg L⁻¹, por 2 horas, para bloqueio do fuso mitótico. Posteriormente, as
116 raízes foram lavadas, fixadas em Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético) e armazenadas a -
117 20°C.

118 A digestão da parede celular foi feita em solução enzimática contendo celulase
119 “Onozuka R10” (0,7%), celulase Sigma-Aldrich (0,7%), pectoliase Sigma-Aldrich (1%) e
120 citohelicase Sigma-Aldrich (1%), por 1 hora e 40 minutos, a 37°C. Após digestão, as
121 lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular e secagem ao ar (Carvalho &
122 Saraiva, 1993).

123 As preparações cromossômicas foram contrastadas com DAPI/vectashield e
124 observadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60, utilizando filtro específico
125 para DAPI (Excitação: 330-385 nm; Emissão: 420nm). Foram avaliadas cinco metáfases de
126 cada acesso e as imagens foram capturadas pela câmera acoplada ao microscópio e
127 processadas no software Photoshop CS6® para ajuste de brilho e contraste.

128

129 Quantificação de DNA

130 A quantidade de DNA foi estimada usando três amostras de 20-30mg de tecido foliar
131 jovem de cada um dos seis acessos avaliados e amostras de mesma quantidade de *Pisum*

132 *sativum* L. (padrão de referência – quantidade de DNA $2C=9,09$ pg). As amostras foram
133 maceradas em placa de Petri separadamente e, logo em seguida, foram adicionados 1 mL de
134 tampão LB01 gelado para obtenção da suspensão nuclear (Dolezel, 1997) e 25 μ L de iodeto
135 de propídio.

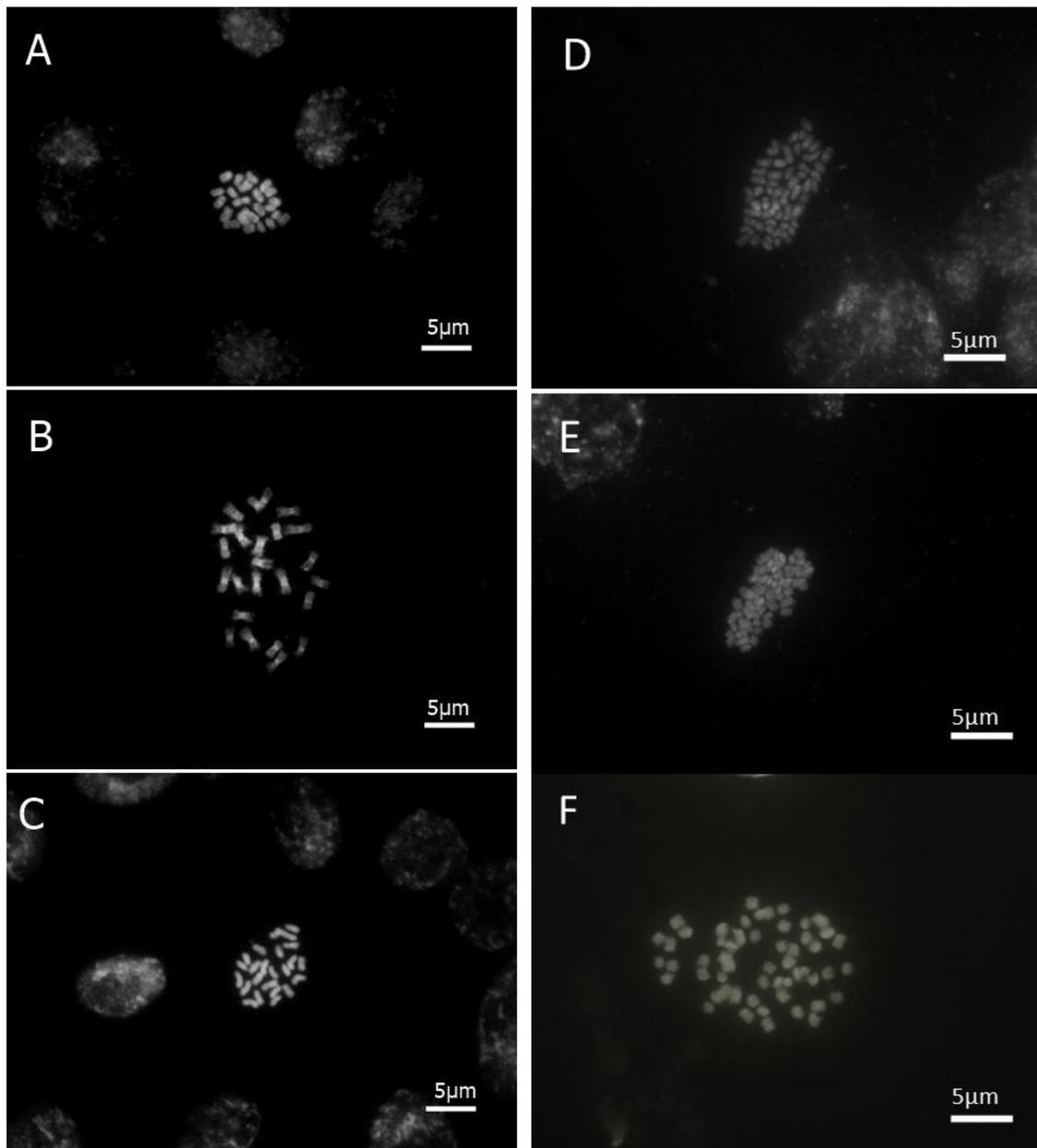
136 As amostras foram processadas no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo
137 quantificados pelo menos 10.000 núcleos para cada. Os histogramas foram obtidos no
138 software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.9. O conteúdo de DNA foi
139 estimado em picogramas (pg).

140

141 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

142

143 Os acessos de *Urochloa dictyoneura* DT157, DT160 e DT161 apresentaram $2n=24$
144 cromossomos e os acessos DT150, DT154 e DT155, $2n=54$ cromossomos (figura 1).



145

146 Figura 1: Metáfases mitóticas dos acessos DT157 (A), DT160 (B) e DT161 (C) com $2n=24$ cromossomos e dos acessos DT150 (D),
 147 DT154 (E) e DT155 (F) com $2n=54$ cromossomos de *Urochloa dictyoneura*.

148

149

150

151

152

153

154

155

156

Ao avaliarem a meiose de acessos dessa mesma espécie, Risso-Pascotto et al. (2006) relataram $2n=4x=24$ cromossomos e constataram comportamento tetraploide. As autoras fizeram essas afirmações com base na observação de uni-, bi-, tri- e tetravalentes em células em diacinese, que, segundo Singh (2017), correspondem aos pareamentos aleatórios possíveis entre quatro cromossomos homólogos em um autotetraploide. Um dos acessos estudados por elas (BRA005851) demonstrou, em algumas de suas células, seis conjuntos de tetravalentes, confirmando a homologia dos cromossomos, a autotetraploidia e a determinação de $x=6$ como número básico para *U. dictyoneura*.

157 De forma similar, Mendes (2020) reportou $2n=4x=24$ cromossomos para os acessos
158 DT158 e DT159 de *U. dictyoneura* provenientes do mesmo banco de germoplasma (Banco
159 de Germoplasma da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS). O autor aplicou a
160 técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em cromossomos mitóticos desses
161 acessos e observou oito sítios de rDNA 5S e quatro sítios de rDNA 35S. O arranjo
162 cariotípico corroborou com a proposta de autoploidia para esses acessos.

163 Se considerado o número básico $x=6$, assim como proposto por Risso-Pascotto et al.
164 (2006) e Mendes (2020), os acessos DT157, DT60 e DT161 avaliados nesse trabalho seriam
165 tetraploides ($2n=4x=24$) e os acessos DT150, DT154 e DT155, nonaploides ($2n=9x=54$)
166 (tabela1). Não existem descrições citogenéticas na literatura de *U. dictyoneura* nonaploide.
167 Portanto, são necessários estudos envolvendo análises de meiose e citomoleculares para a
168 caracterização do cariótipo e confirmação do comportamento cromossômico e tipo de
169 poliploidia.

170 Além dos números cromossômicos evidenciados neste trabalho, Carnahan e Hill
171 (1961) observaram $2n=6x=42$ cromossomos, considerado na época como número básico
172 $x=7$, caracterizando *U. dictyoneura*, também, como hexaploide. A descrição desses
173 diferentes níveis de ploidia indica a existência de, pelo menos, três citótipos para essa
174 espécie: tetraploide, hexaploide ou heptaploide e nonaploide.

175 De acordo com Osborn (2004), grande parte das angiospermas passou por um ou
176 mais ciclos de poliploidização ao longo de sua evolução, seja por meio da duplicação de seu
177 conjunto cromossômico (autoploidia) ou por meio da combinação de genomas entre
178 espécies próximas (alopoliploidia). Ainda, Stebbins (1985) afirmou que mais de 80% das
179 espécies da família Poaceae passaram por algum processo de poliploidização em sua história
180 evolutiva. Em *Urochloa*, dos 437 materiais vegetais avaliados por Penteado et al. (2000),
181 87% eram poliploides, sendo, em sua maioria, tetraploides (58%), indicando certa tendência
182 para esse tipo de configuração cromossômica.

183 Desse modo, tem-se o processo de poliploidização, atrelado ao período de adaptação
184 e evolução, como um dos fatores responsáveis pela variação existente quanto ao nível de
185 ploidia entre e dentro das espécies do gênero *Urochloa*.

186 Os resultados estimados de quantidade de DNA estão apresentados na tabela 1. Os
187 valores encontrados para os acessos DT157 (2,83 pg), DT160 (2,74 pg) e DT161 (2,76 pg)
188 corresponderam ao esperado se comparados com os dados apresentados por Mendes (2020)

189 para os acessos DT158 (2,83 pg) e DT159 (3,12 pg) com mesmo número cromossômico e
190 nível de ploidia.

191
192 Tabela 1: Número cromossômico, nível de ploidia, quantidade de DNA (valor 2C) (pg) e
193 valor C (mbp) para os acessos DT150, DT154, DT155, DT157, DT160 e DT161 de
194 *Urochloa dictyoneura*.

Acessos	Número cromossômico e nível de ploidia	Quantidade de DNA (valor 2C) (pg)	Valor C (Mbp C ⁻¹)
DT150	2n=9x=54	3,64	1.780
DT154	2n=9x=54	3,60	1.760
DT155	2n=9x=54	4,46	2.181
DT157	2n=4x=24	2,83	1.385
DT160	2n=4x=24	2,74	1.340
DT161	2n=4x=24	2,76	1.350

195
196 Os acessos DT150, DT154 e DT155 apresentaram valores estimados de conteúdo de
197 DNA condizentes com descrições dentro do gênero para esse nível de ploidia. Damasceno
198 (2020) avaliou acessos de *U. humidicola*, espécie filogeneticamente semelhante a *U.*
199 *dictyoneura* (Renvoize et al., 1996), e observou valor de quantidade de DNA para o acesso
200 H108, que também possui 54 cromossomos, de 3,94 pg. Tal resultado se assemelha aos
201 dados encontrados neste estudo para os acessos DT150 (3,64 pg) e DT154 (3,60 pg). O valor
202 observado para o acesso DT155 (4,46 pg), porém, destoou, consideravelmente, quando
203 comparado com os demais acessos de *U. dictyoneura* (DT150 e DT154) e em comparação
204 com o acesso de *U. humidicola* (H108) estudado por Damasceno (2020).

205 A diferença observada nos valores de conteúdo de DNA entre os seis acessos aqui
206 avaliados e que apresentam mesmo número cromossômico pode ser devida à variação na
207 quantidade de sequências de DNA repetitivo presentes no genoma de cada acesso (Flavell,
208 Bennett, Smith & Smith, 1974), ou mesmo, por consequência dos processos de
209 poliploidização que deram origem a esses materiais vegetais (Wendel, 2000; Bennetzen, Ma
210 & Devos, 2005). Além disso, Bennetzen et al. (2005) afirmaram em seu trabalho que a
211 variação existente no tamanho do DNA de espécies próximas pode ser causada pela ação e
212 dinamicidade de elementos retrotransponíveis.

213

214

215

216 CONCLUSÃO

217

218 O número cromossômico $2n=4x=24$ cromossomos observado para os acessos
219 DT157, DT160 e DT161 está de acordo com o que foi previamente relatado na literatura
220 para outros acessos de *U. dictyoneura*.

221 A descrição para os acessos DT150, DT154 e DT155 com $2n=9x=54$ cromossomos é
222 inédita para *U. dictyoneura* e requer novas análises para avaliar o comportamento
223 cromossômico na meiose e o tipo de poliploidia.

224 Os valores estimados de quantidade de DNA encontrados são condizentes com o
225 nível de ploidia de cada acesso.

226 Por fim, vale acrescentar que, além da investigação do nível de ploidia, seria
227 interessante utilizar outras técnicas e metodologias da citogenética na obtenção de mais
228 informações sobre os genomas analisados. A realização de trabalhos futuros envolvendo
229 medições cromossômicas e construção de cariótipos e idiogramas seriam de grande valia
230 para aumentar o conhecimento já existente sobre a espécie *Urochloa dictyoneura*.

231

232 REFERÊNCIAS

233

234 Akiyama, Y., Yamada-Akiyama, H., & Ebina, M. (2010). Morphological diversity of
235 chromosomes bearing ribosomal DNA loci in Brachiaria species. *Grassland Science*, 56(4),
236 217–223. doi: 10.1111/j.1744-697X.2010.00197.x.

237 Alvim, M. J., Botrel, M. de A., & Xavier, D. F. (2002). As principais espécies de Brachiaria
238 utilizada no país. *Comunicado Técnico* 22, 3-6.

239 Basappa, G. P., Muniyamma, M., & Chinnappa, C. C. (1987). An investigation of
240 chromosome numbers in the genus Brachiaria (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology
241 and taxonomy. *Canadian Journal of Botany*, 65(11), 2297–2309. doi: 10.1139/b87-313.

242 Bennetzen, J. L., Ma, J., & Devos, K. M. (2005). Mechanisms of recent genome size
243 variation in flowering plants. *Annals of Botany*, 95(1), 127-132. doi:10.1093/aob/mci008.

244 Boldrini, K. R., Adamowski, E. V., Message, H., Calisto, V., Pagliarini, M. S., & Valle, C. B.
245 (2011). Meiotic behavior as a selection tool in the breeding of Brachiaria humidicola
246 (Poaceae). *Euphytica*, 182, 317-324. doi: 10.1007/s10681-011-0402-5.

247 Boldrini, K. R., Micheletti, P. L., Gallo, P.H., Mendes-Bonato, A. B., Pagliarini, M. S., &
248 Valle, C. B. (2009a). Origin of a polyploidy accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae:
249 Panicoideae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research*, 8(3), 888-895.

250 Boldrini, K. R., Pagliarini, M. S., & Valle, C. B. (2009b). Meiotic behavior of a nonaploid
251 accession endorses $x=6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Genetics and Molecular*
252 *Research*, 8(4), 1444-1450.

253 Carnahan, H. L. & Hill, H. D. (1961). Cytology and genetics of forage grasses. *The*
254 *Botanical Review*, 27, 1-162. doi: 10.1007/BF02860809.

255 Carvalho, C. R. & Saraiva, L. S. (2009). An Air Drying Technique for Maize Chromosomes
256 without Enzymatic Maceration. *Biotechnic & Histochemistry*, 68(3), 142-145. doi:
257 10.3109/10520299309104684.

258 Corrêa, C. T. R., Bonetti, N. G. Z., Barrios, S. C. L., do Valle, C. B., Torres, G. A., & Techio,
259 V. H. (2020). GISH-based comparative genomic analysis in *Urochloa P. Beauv.* *Molecular*
260 *Biology Reports*, 47(2), 887-896. doi: 10.1007/s11033-019-05179-7.

261 Damasceno, A. G. (2020). *Análise cariotípica de acessos de Urochloa humidicola (Rendle)*
262 *Morrone e Zuloaga*. (Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e
263 Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

264 Dolezel, J. (1997). Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Applied*
265 *Genetics*, 3(38), 285–302.

266 Flavell, R. B., Bennett, M. D., Smith, J. B., & Smith, D. B. (1974). Genome size and
267 proportion of repeated nucleotide DNA sequence in plants. *Biochemical Genetics*, 12, 257–
268 269. doi: 10.1007/BF00485947.

269 Jank, L., Valle, C. B. & Resende, R. M. S. (2011) Breeding tropical forages. *Crop Breeding*
270 *and Applied Biotechnology*, 11, 27-34. doi: 10.1590/S1984-70332011000500005.

271 Lutts, S., Ndikumana, J. & Louant, B. P. (1991). Fertility of *Bachiaria ruziziensis* in
272 interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic
273 behaviour, pollen viability and seed set. *Euphytica*, 57, 267-274. doi: 10.1007/BF00039673.

274 Maass, B. L. (1996). Identifying and Naming *Brachiaria* Species. Em Mile, J. W., Maass, B.
275 L., do Valle, C. B. (Ed.), *Brachiaria: biology, agronomy and improvement* (pp. ix- xiii). Cali,
276 Colombia: CIAT Publication.

277 Mendes, L. M. (2020). *Cariótipos de acessos diploides de Urochloa brizantha e Urochloa*
278 *decumbens e poliploides de Urochloa dictyoneura (POACEAE)*. (Dissertação de Mestrado
279 do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada). Universidade Federal de Lavras,
280 Lavras-MG.

281 Nani, T. F., Pereira, D. L., Souza Sobrinho, F., & Techio, V. H. (2016). Physical map of
282 repetitive DNA sites in *Brachiaria* spp.: Intravarietal and interspecific polymorphisms. *Crop*
283 *Science*, 56(4), 1769-1783. doi: 10.2135/cropsci2015.12.0760.

284 Nielen, S., Almeida, L. M., Carneiro, V. T. C., & Araujo, A. C. G. (2010). Physical mapping
285 of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomitic *Brachiaria brizantha*. *Sexual*
286 *Plant Reproduction*, 23(1), 45-51. doi: 10.1007/s00497-009-0124-1.

287 Olivera, Y., Machado, R., & Pozo, P. P. (2006). Características botánicas y agronómicas de
288 especies forrajeras importantes del género *Brachiaria*. *Pastos y Forrajes*, 29(1), 1-13.

289 Osborn, T. C. (2004). The contribution of polyploidy to variation in *Brassica* species.
290 *Physiologia Plantarum*, 121(4), 531-536. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00360.x.

291 Paula, C. M. P., Souza Sobrinho, F., & Techio, V. H. (2017). Genomic constitution and
292 relationship in *Urochloa* (Poaceae) species and hybrids. *Crop Science*, 57(5), 2605-2616. doi:
293 10.2135/cropsci2017.05.0307.

294 Penteado, M. I. O., Dos Santos, A. C. M., Rodrigues, I. F., Do Valle, C. B., Seixas, M. A. C.,
295 & Esteves, A. (2000). Determinação de poliploidia e avaliação da quantidade de DNA total
296 em diferentes espécies de gênero *Brachiaria*. *Boletim de Pesquisa Embrapa*, 11.

297 Renvoize, S. A., Clayton, W. D., & Kabuye, C. H. S. (1996). Morphology, Taxonomy, and
298 Natural Distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. Em Mile, J. W., Maass, B. L., do Valle, C.
299 B. (Ed.), *Brachiaria: biology, agronomy and improvement* (pp. 1-15). Cali, Colombia: CIAT
300 Publication.

301 Renvoize, S. A. & Maass, B. (1993). *Brachiaria* – a report to CIAT, Colombia, on the species
302 and specimens held in the germplasm collection. *Royal Botanic Gardens, kew*.

303 Ricci, G. L., de Souza-Kaneshima, A. M., Felismino, M. F., Mendes-Bonato, A. B.,
304 Pagliarini, M. S., & Do Valle, C. B. (2011). Chromosome numbers and meiotic analysis in the
305 pre-breeding of *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Journal of Genetics*, 90(2), 289-294.

306 Risso-Pascotto, C., Pagliarini, M. S., & Do Valle, C. B. (2006). A new basic chromosome
307 number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genetic*
308 *Resources and Crop Evolution*, 53(1), 7-10. doi: 10.1007/s10722-005-7762-4.

309 Roche, R., Menéndez, J., & Hernández, J. E. (1990). Características morfológicas
310 indispensables para la clasificación de especies del género *Brachiaria*. *Pastos y Forrajes*,
311 13(3), 205-222.

312 Singh, R. J. (2017). *Plant Cytogenetics*. Boca Raton, EUA: CRC Press.

313 Souza Sobrinho, F. (2009). Melhoramento de gramíneas forrageiras na EMBRAPA Gado de
314 Leite. *Simpósio de Forragicultura e Pastagens*, 98–111.

315 Stebbins, G. L. (1985). Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals*
316 *of Mississippi Botanical Garden*, 72(4), 824–832. doi: 10.2307/2399224.

317 Valle, C. B. & Glienke, C. (1991). New sexual accession in *Brachiaria*. *Apomixis Newsletter*,
318 7, 42-43.

319 Valle, C. B., & Pagliarini, M. S. (2009). Biology, Cytogenetics, and Breeding of *Brachiaria*.
320 Em Singh, R. J. (Ed.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement*
321 (pp. 103-143). Boca Raton, EUA: CRC Press.

322 Valle, C. B., & Savidan, Y. H. (1996). Genetics, Cytogenetics, and Reproductive Biology of
323 *Brachiaria*. Em Mile, J. W., Maass, B. L., do Valle, C. B. (Ed.), *Brachiaria: biology,*
324 *agronomy and improvement* (pp. 147-163). Cali, Colombia: CIAT Publication.

325 Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*, 42, 225–
326 249. doi: 10.1007/978-94-011-4221-2_12.

327

328

329

330

331

332

333