



ISADORA CARDOSO SOARES

**ANÁLISES DAS CONFIGURAÇÕES DE PAREAMENTO NA
MEIOSE DE ACESSOS HEXAPLOIDES DE *Urochloa humidicola*
(Rendle) Morrone & Zuloaga**

**LAVRAS-MG
2023**

ISADORA CARDOSO SOARES

**ANÁLISES DAS CONFIGURAÇÕES DE PAREAMENTO NA MEIOSE DE ACESSOS
HEXAPLOIDES DE *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga**

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

Ma. Ana Gabriela Damasceno
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2023**

ISADORA CARDOSO SOARES

**ANÁLISES DAS CONFIGURAÇÕES DE PAREAMENTO NA MEIOSE DE ACESSOS
HEXAPLOIDES DE *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga**

**ANALYSIS OF PAIRING CONFIGURATIONS IN MEIOSIS OF HEXAPLOID
CYTOTYPES OF *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga**

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 25 de julho de 2023
Dr^a Vânia Helena Techio UFLA
Dr^a Isabella de Campos Moraes UFLA
Ma. Bruna Natália Veloso Dos Santos UFLA

Prof^a Dr^a Vânia Helena Techio
Orientadora

Ma. Ana Gabriela Damasceno
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por me dar força, saúde e persistência para vencer mais uma etapa.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela minha formação acadêmica e por contribuir com meu crescimento pessoal.

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, suporte e manutenção dos espaços e laboratórios.

À professora Vânia, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do laboratório logo no início da minha graduação. Muito obrigada por toda orientação, ensinamentos e disponibilidade.

À Ana Gabriela que me acolheu tão bem desde o momento que entrei no laboratório. Muito obrigada por ter me ensinado e ajudado sempre com muito carinho e paciência. Você, com certeza, tornou essa jornada mais leve!

À Bruna e Giovanna que auxiliaram meus trabalhos na citogenética molecular, principalmente nessa reta final. E a toda equipe do laboratório, por toda paciência, apoio e auxílio.

Aos meus pais, Mariana e Carlos, por sempre incentivarem meus estudos e por fazerem o possível e o impossível pela minha felicidade. Amo muito vocês e sou extremamente grata por tudo. Essa conquista é de vocês.

À minha irmã e melhor amiga, Giovanna. Muito obrigada pelo apoio, conselhos, companheirismo e por dividir a vida comigo. Amo você!

Aos meus avós Elma, Pida e Beto e à Tia Nice. Agradeço por todo amor e apoio de sempre.

Ao meu namorado, Mateus, por todo amor e companheirismo. Obrigada por sempre acreditar em mim e me apoiar.

À toda minha família e amigos, por serem sempre tão presentes e por deixarem minha vida mais feliz!

1 **Análise das configurações de pareamento na meiose de acessos hexaploides de *U. humidicola***
2 **(Rendle) Morrone & Zuloaga**

3 As normas estão de acordo com a revista CBAB- Crop Breeding and Applied Biotechnology

4
5 **RESUMO**

6 *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga é uma espécie forrageira no Brasil que tem sido
7 alvo de programas de melhoramento genético e de interesse para estudos citogenéticos. O presente
8 trabalho avaliou as configurações de pareamento em diacineses e metáfases I dos acessos H016 e
9 H031 de *U. humidicola*, por meio de análises convencional e hibridização *in situ* fluorescente
10 (FISH). Ambos os acessos apresentaram pareamento irregular com formação de univalentes e
11 multivalentes, mas com maior frequência de formação de bivalentes tanto nas diacineses quanto nas
12 metáfases I. A taxa de univalentes foi maior no aneuploide H031. No acesso H016, foram
13 observados 16 sinais da sonda UroSat-1a, enquanto o número de sinais de rDNA 5S variou entre
14 cinco a nove. No acesso H031, ambas as sondas apresentaram variação no número de sinais, sendo
15 entre três a sete para UroSat-1A e sete a 13 para a sonda rDNA 5S.

16

17 **Palavras-chave:** *Brachiaria*; FISH; Aneuploidia; Homeologia; Anormalidades meióticas.

18

19 **INTRODUÇÃO**

20 *Urochloa* P. Beauv. [Sin. *Brachiaria* (Trin.) Griseb.], pertencente à família Poaceae, tem seu
21 centro de origem na África Oriental (Jungmann et al. 2010) e reúne espécies distribuídas pelas
22 regiões tropicais e subtropicais do mundo (Morrone e Zuloaga, 1992, 1993). Algumas são utilizadas
23 como forrageira e por isso apresentam grande importância econômica. Entre elas, destacam-se as
24 espécies pertencentes ao complexo agâmico ‘brizantha’ (*Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.
25 Webster; *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster e *Urochloa ruziziensis* (R. Germ.

26 & C.M. Evrard) Morrone & Zuloaga) e ao complexo ‘humidicola’ (*Urochloa humidicola* (Rendle)
27 Morrone & Zuloaga e *Urochloa dictyoneura* (Fig. & De Not.) Veldkamp).

28 *U. humidicola* é popularmente conhecida por grama koronivia ou braquiarinha (Brasil) (CABI,
29 2022) e se destaca por apresentar boa adaptação a solos pobres (Lapointe e Miles 1992, Rao et al.
30 1996) e áreas sujeitas a alagamentos temporários (Machado et al. 2010, Paciullo e Gomide 2016).
31 Pela importância econômica em nível global, essa gramínea é alvo de programas de melhoramento,
32 os quais utilizam os conhecimentos da citogenética para auxiliar no entendimento das relações de
33 parentesco, determinar graus de afinidades genômicas e níveis de ploidia que são importantes para o
34 sucesso nos cruzamentos.

35 Em relação aos estudos citogenéticos, há divergências quanto ao número básico de
36 cromossomos e nível de ploidia de *U. humidicola*. Inicialmente, Bernini e Marin- Morales (2001),
37 baseados em descrições anteriores sobre o número básico do gênero, atribuíram a esta espécie $x=7$ e
38 9, fundamentadas por contagens cromossômicas empregando coloração convencional. No entanto,
39 em análises meióticas realizadas por Risso- Pascotto et al. (2006a) em acessos de *U. dictyoneura* e
40 por Boldrini et al. (2006b) com *U. humidicola*, foi descrito um novo número básico, $x=6$, para essas
41 espécies. A partir dessa informação, novos estudos retificaram o número cromossômico e níveis de
42 ploidia em *Urochloa humidicola* para $2n=6x=36$ (Boldrini et al. 2011b, Ricci et al. 2011,
43 Damasceno et al. 2023), $2n=7x=42$ (Boldrini et al. 2006b, 2009a, 2010, Damasceno et al. 2023) e
44 $2n=9x=54$ (Adamowski et al. 2007, Boldrini et al. 2009b, 2011a, Damasceno et al. 2023), formando
45 uma série poliploide variando de hexaploides e nonaploides, sem registros de diploides e
46 tetraploides (Damasceno et al. 2023)

47 No que diz respeito ao modo de reprodução, os acessos de *U. humidicola* são apomíticos
48 apospóricos (Jungmann et al. 2010, Hand e Koltunow 2014, Scheben e Hojsgaard 2020), com
49 exceção do acesso H031, o qual é descrito como sexual (Valle e Glienke 1991). Por ser o único
50 genótipo sexual identificado no germoplasma de *U. humidicola*, esse acesso passou a ter um papel

51 importante para o melhoramento genético, pois viabilizou a obtenção de outros híbridos em
52 cruzamentos com acessos apomíticos, como o H016 (cv BRS Tupi) (Ricci et al., 2011; Figueiredo,
53 Nunes e Valle 2012, Assis et al. 2014; Vigna et al. 2016a) e o H027 (Worthington et al. 2019).
54 Nesse sentido, os acessos H031 e H016 são, frequentemente, estudados de forma conjunta, devido à
55 alta divergência em seus genótipos e por serem importantes para o melhoramento da espécie (Vigna
56 et al. 2016b). Outro fator que aumentou a importância dos estudos em *U. humidicola* foi a recente
57 identificação de aneuploidia no acesso H031 ($2n=6x=36+1$, Damasceno et al. 2023). Essa
58 informação impacta diretamente o programa de melhoramento genético, pois é provável que se trata
59 de um híbrido (Vigna et al., 2016b, Damasceno et al. 2023), sugerindo que os cruzamentos
60 realizados não utilizaram ‘germoplasma puro’ de *U. humidicola*.

61 Em vista disso, estudos meióticos são imprescindíveis, visto que os acessos mais estáveis
62 durante a meiose são considerados os melhores para serem utilizados em cruzamentos (Ricci et al.
63 2011). Análises meióticas convencionais realizadas em alguns acessos (Boldrini et al. 2006a,
64 2006b, 2009a, 2009b, 2010, 2011a, 2011b, Adamowski et al. 2007, Bonetti et al., dados não
65 publicados) e híbridos de *U. humidicola* (Vigna et al. 2016a) revelaram a ocorrência de
66 anormalidades que podem afetar a viabilidade polínica, e conseqüentemente, a geração de sementes
67 de alta qualidade. Além disso, a meiose pode auxiliar na caracterização das configurações de
68 pareamento que podem contribuir para caracterizar a aloploidia proposta para a espécie, devido
69 à alta homeologia entre os genomas (Sybenga 1992).

70 Outra técnica aplicada em estudos sobre *U. humidicola* se trata da hibridização *in situ*
71 fluorescente (FISH), que resulta na marcação de sequências específicas do genoma (Akiyama,
72 Yamada-Akiyama e Ebina 2010, Santos et al. 2015, Damasceno et al. 2023, Tomaszewska et al.
73 2023). Na meiose, essa técnica auxilia na identificação dos diferentes tipos de configurações de
74 pareamento (Choudhary et al. 2020), o que contribui para a obtenção de resultados mais precisos
75 em relação ao comportamento meiótico do acesso estudado.

76 Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo analisar as configurações de pareamento
77 em células mães do grão de pólen (PMCs) de dois acessos hexaploides H016 e H031 de *Urochloa*
78 *humidicola* por meio de meiose convencional e pela FISH.

79 MATERIAL E MÉTODOS

80 Material Vegetal

81 Os acessos de *U. humidicola* descritos na Tabela 1 foram avaliados nesse estudo. As plantas são
82 provenientes do Banco de Germoplasma de *Urochloa (Brachiaria)* da Embrapa Gado de Corte
83 Campo Grande – MS (Coordenadas: latitude: 20° 25'307" S longitude: 54° 43'367" W) e
84 atualmente são mantidas em vasos, em casa de vegetação no Departamento de Biologia da
85 Universidade Federal de Lavras (UFLA).

86 **Tabela 1** – Informações gerais dos acessos de *U. humidicola*.

Identificação EGC	Número CIAT	Número Cromossômico	Quantidade de DNA Nuclear (2C*)	Modo de Reprodução
H016	26149	2n=6x=36 ^a	4.40 pg ^a	Apomítica ^b
H031	26146	2n=6x=36+1 ^a	4.45 pg ^a	Sexual ^b

87 * 2C= Tamanho do genoma holoploide; ^aDamasceno et al., (2023); ^b Jungmann et al. (2010); EGC=
88 EMBRAPA Gado de corte.

89

90 Análise meiótica convencional

91 As inflorescências dos acessos *U. humidicola* foram coletadas, fixadas em solução de Carnoy (3
92 álcool etílico: 1 ácido acético) e armazenadas a - 20 °C.

93 Quanto ao preparo das lâminas, as espiguetas foram excisadas sob microscópio estereoscópio,
94 para extração das anteras. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e as PMCs
95 foram coradas com carmim propiônico 1%. As avaliações foram feitas em microscópio de campo
96 claro ZeissAxio LabA1 (Oberkochen, Alemanha) com sistema de captura de imagens (Câmera
97 AxioCam Cc1). As configurações de pareamento cromossômico (univalentes, bivalentes ou
98 multivalentes) foram avaliadas em 32 diacineses e 15 metáfases I para o acesso H016 e 37
99 diacineses e 15 metáfases para o aneuploide H031.

100 **Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

101 Para FISH, foram usadas as sondas para as sequências de rDNA 5S (proveniente do genoma de
102 *Oryza sativa* L.) e Urosat-1a (Ub2C14, com 158 pb. proveniente do genoma de *U. brizantha*
103 diploide - acesso B105) marcadas, respectivamente, com bio-16-dUTP e dig-12-dUTP por meio da
104 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Urosat-1a é uma sequência satDNA centromérica
105 identificada no complexo agâmico '*brizantha*' de *Urochloa* (Corrêa et al., dados não publicados).

106 Para sonda centromérica, as sequências foram amplificadas utilizando: 100 ng do DNA
107 genômico, Hot Start Taq mix 1x, 0,4 uM dos primers Fw e Rv, para um volume de 25uL. O
108 programa de PCR consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 15 min, 35 ciclos a 95°C por 25 seg,
109 anelamento a 56°C por 45 seg, extensão a 72°C por 2 seg e extensão final a 72°C por 2 seg. Os
110 produtos da amplificação por analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

111 Anteras fixadas em Carnoy (item Análise meiótica convencional) foram selecionadas e
112 submetidas à digestão em mix enzimático (celulase Onozuka R10 0,7%, celulase 0,7%, pectoliase
113 1% e citohelicase 1%) por 1 h e 13 min, a 37 °C. As lâminas foram preparadas pela técnica de
114 esmagamento e as PMCs foram coradas com carmim propiônico 1%. Após a seleção das lâminas
115 nos estágios de diacinese e metáfase I e resfriamento gradual a 4°C e -20°C, por 10min, as
116 lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas secadas ao ar.

117 Posteriormente, as lâminas foram tratadas com pepsina 10 µg/mL por 20 min, a 37°C, pós-
118 fixadas em solução de formaldeído 3,7% (SSC 2x) durante 10 min e desidratadas em série alcoólica
119 (70%, 90% e 100%). A preparação cromossômica foi desnaturada em chapa térmica com mix de
120 desnaturação (formamida 50%, 1× SSC, sulfato de dextran 10%, 300 ng/µL de esperma de salmão e
121 ~40 ng/µL da ambas as sondas) por 55 segundos a 80°C. Posteriormente, a hibridização ocorreu a
122 37°C em câmara úmida, durante 24 horas.

123 Após 24h, foram realizadas as lavagens de stringência (87%) em tampão SSC 2x a 42 °C e,
124 sem seguida, a detecção da sonda foi feita com anti-digoxigenina conjugada com rodamina e
125 streptavidina conjugada com alexafluor 488, por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida. Os

126 cromossomos foram contrastados com DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole) em Vectashield
 127 Antifade Mounting medium (1,5 µg/mL) e avaliados em microscópio Olympus BX60 equipado
 128 com sistema de epifluorescência e câmera digital refrigerada. As imagens foram processadas pelo
 129 software Adobe Photoshop® versão 23.5.2.

130

131 RESULTADOS

132 Ambos os acessos apresentaram pareamento irregular com formação de univalentes e
 133 multivalentes (Tabela 2 e Figura 1), sendo a primeira mais frequentemente observada no aneuploide
 134 H031 e a segunda, no H016 (Tabela 2 e Figura 1). Entretanto, há predominância de bivalentes tanto
 135 nas diacineses quanto nas metáfases I dos dois acessos (Tabela 2).

136 Nas diacineses, as médias das configurações de pareamento determinadas para cada citótipo
 137 foram 9,66II+3,5III⁺ para o acesso H016 e 0,62I+13,92II+1,97III⁺ para o aneuploide H031. Nas
 138 metáfases I, essas médias foram 0,4I+7,73II+3,8III⁺ (H016, 2n =6x= 36) e 0,67I+8,67II+3III⁺
 139 (H031, 2n = 6x=36+1).

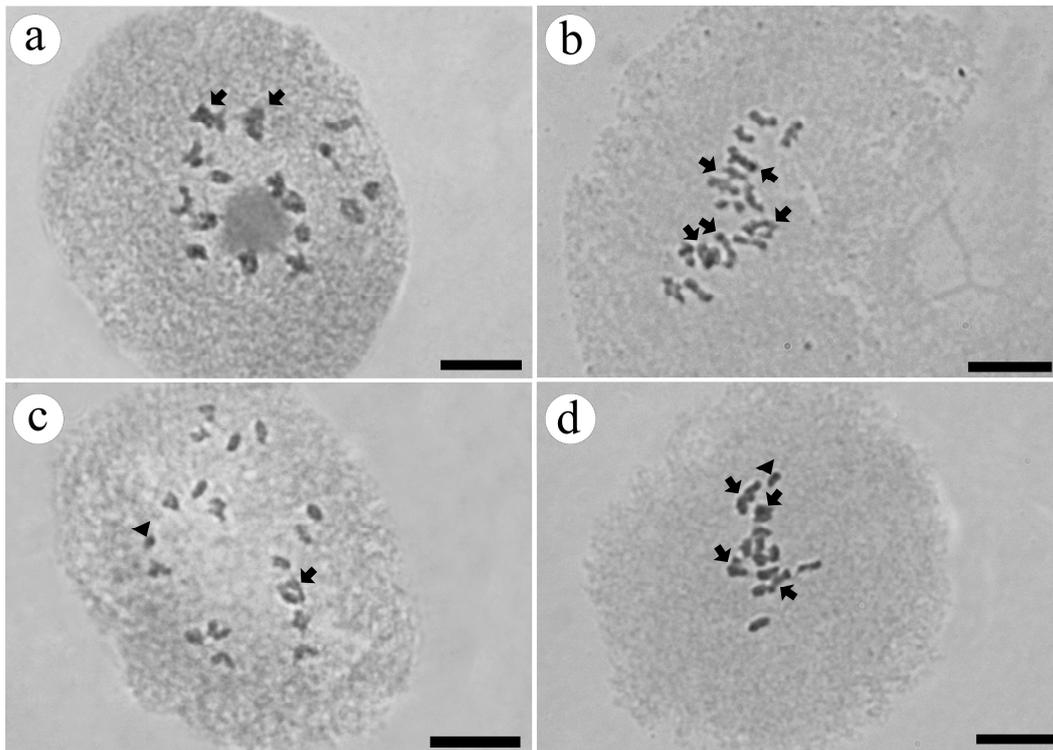
140 **Tabela 2** – Frequências de pareamentos e intervalo de distribuição (em parênteses) em diacineses e
 141 metáfases I dos acessos H016 e H031 de *U. humidicola*.

Configurações de Pareamento						
Acesso	Diacineses			Metáfases I		
	I	II	III+	I	II	III+
H016	0,0%	73,40%	26,60%	3.35%	64.80%	31.85%
	(0)	(5-14)	(2-3)	(0-2)	(3-12)	(2-7)
H031	3,76%	84.29%	11.95%	5.41%	70.27%	24.32%
	(0-2)	(5-18)	(0-6)	(0-2)	(5-12)	(2-4)

142 Legenda: I, univalente; II, bivalente; III+, multivalente.
 143 Fonte: Do autor (2023).

144

145 **Figura 1:** Diacineses e metáfases I dos acessos H016 (a; b) e H031 (c; d) de *U. humidicola*
 146 exibindo univalentes (ponta da seta) e multivalentes (seta). Barra: 10 μ m.



147

148

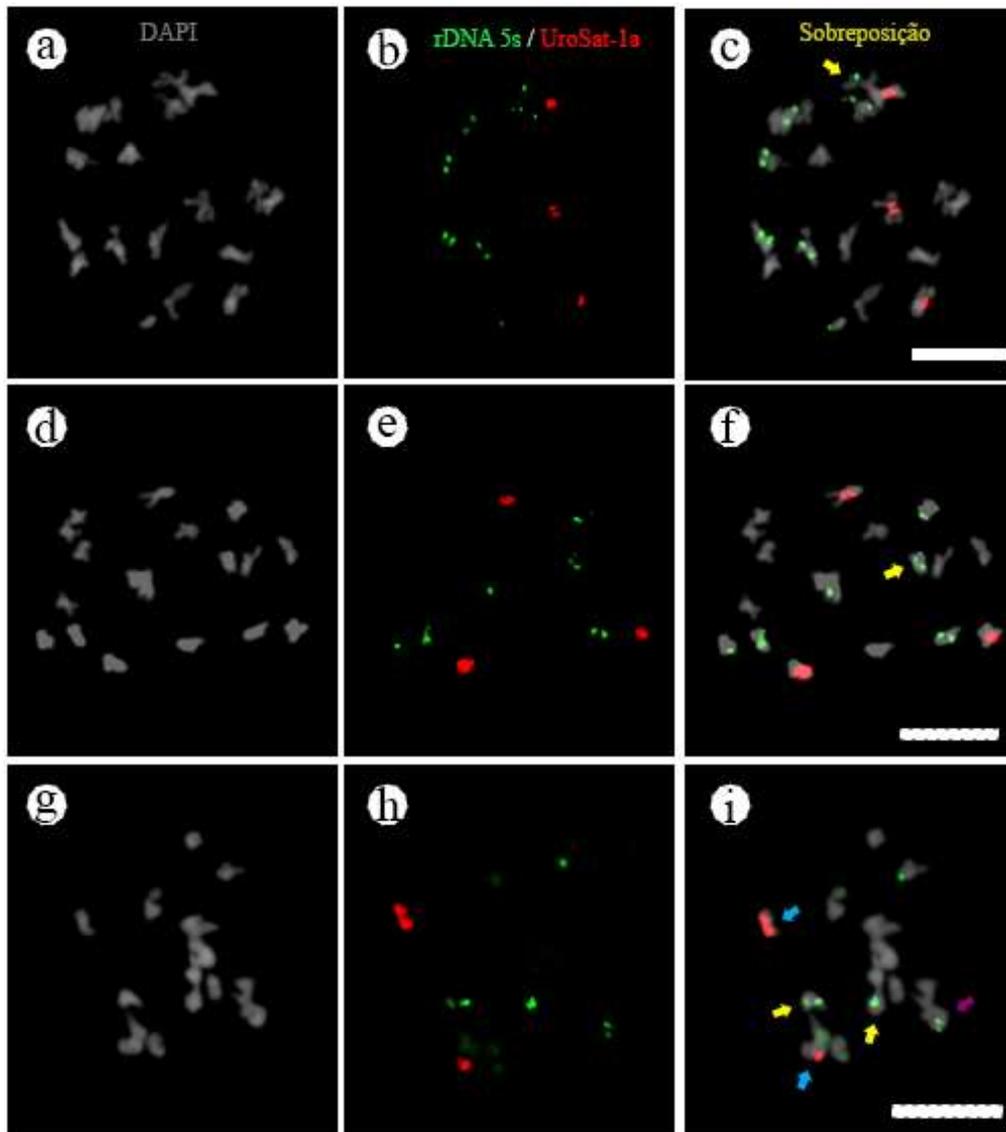
149 Em relação à FISH, no acesso H031 (Figura 2 e Figura 3 G-L), o número de sinais Urosat-1a
 150 variou entre três a sete nas células analisadas. Em relação à sonda rDNA 5S, o número de sinais
 151 variou entre sete a 13 sítios por célula. Além disso, foram observadas configurações de pareamento
 152 contendo cromossomos com e sem sinais FISH tanto para rDNA 5S (Figura 3 C) quanto para sonda
 153 centromérica (Figura 2 I)

154

155

156

157 **Figura 2:** Hibridização *in situ* em diacineses do acesso H031 de *U. humidicola* com as sondas
 158 Urosat-1a (vermelho) e rDNA 5s (verde). (A-C) Trivalente contendo apenas um sinal de rDNA 5S
 159 (seta amarela); (D-F) Trivalente contendo três sinais de rDNA 5S (seta amarela); (G-I) Bivalentes
 160 com um e dois sinais centroméricos (setas azuis) e com um e dois sinais de rDNA 5S (setas
 161 amarelas); configuração multivalente com dois sinais (seta roxa). Barra: 10 µm.



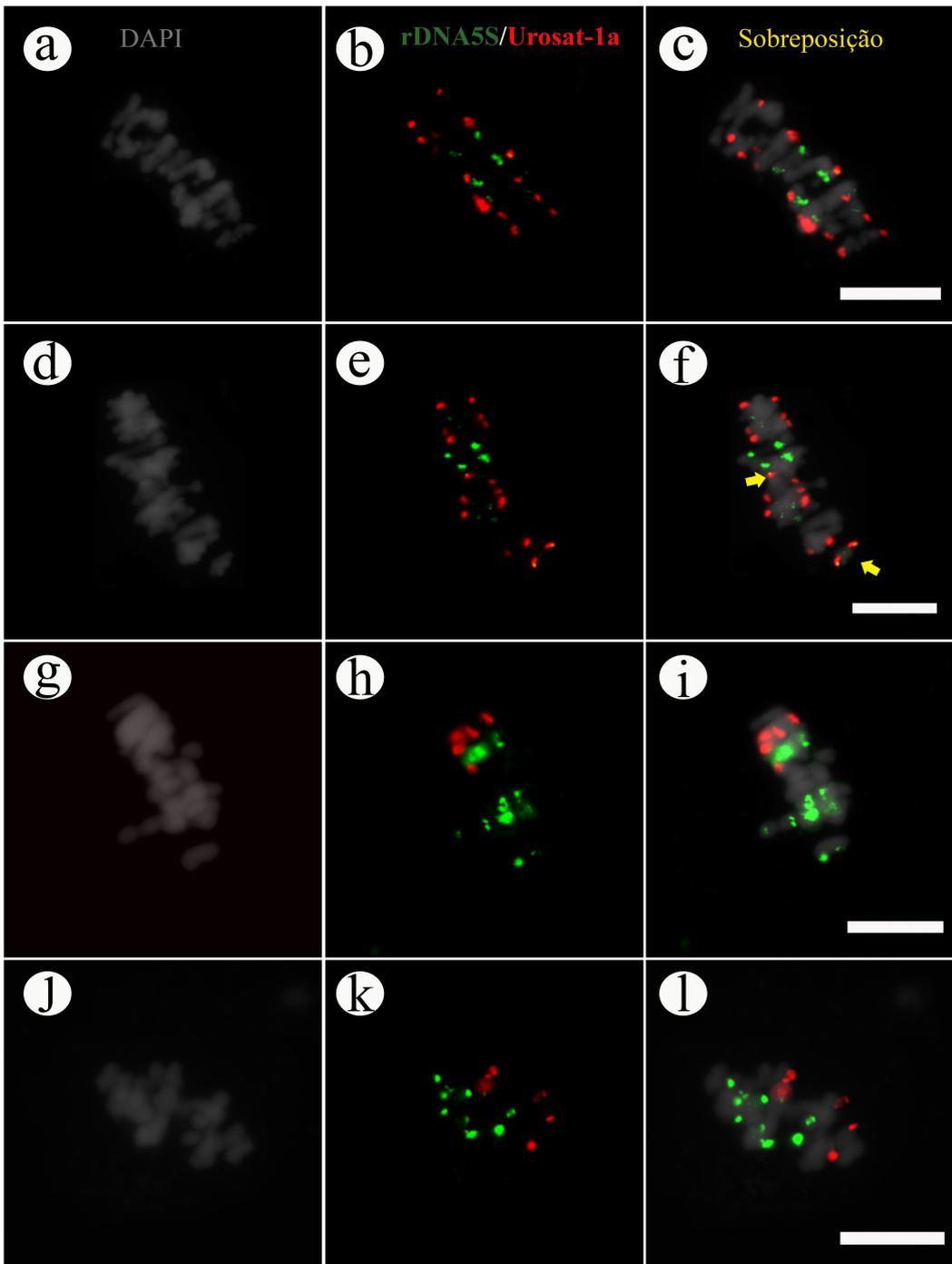
162

163

164 No acesso H016 (Figura 2A-F), foram observados 16 sinais da sonda Urosat-1a em todos os
 165 meiócitos avaliados. Por outro lado, a quantidade de sinais de rDNA 5S variou entre cinco a nove
 166 (Figura 3 A-F). De forma semelhante, observou-se a marcação de sinais em apenas alguns
 167 cromossomos que integravam o pareamento.

168

169 **Figura 3:** Hibridização *in situ* em metáfases I dos acessos H016 e H031 de *U. humidicola* com as
 170 sondas Urosat-1a (vermelho) e rDNA 5S (verde). **Acesso H016:** (A-C) com 16 sinais de Urosat-1a
 171 e seis de rDNA 5S e (D- F) com 16 sinais de Urosat-1a e sete de rDNA 5S apresentando bivalente
 172 contendo sinais rDNA 5s e Urosat-1a no mesmo cromossomo (setas amarelas). **Acesso H031:** (G-I)
 173 com cinco sinais de Urosat-1a e 13 de rDNA 5S e (J-L) com cinco sinais de Urosat-1a e 11 de
 174 rDNA 5S. Barra: 10 μ m.



175

176 DISCUSSÃO

177 A observação de bivalentes e multivalentes nas diacineses corrobora os resultados encontrados
178 em avaliações dos acessos H016 e H031 por Boldrini et al. (2011b) e Vigna et al. (2016a), bem
179 como o observado em diacineses de outros acessos hexaploides de *U. humidicola* (Boldrini et al.
180 2011b). Além disso, há relatos de univalentes em diacineses de acessos ($2n=6x=36$) dessa espécie
181 (Boldrini et al., 2011b), mas, até então, essa configuração não havia sido descrita para o acesso
182 H031 (Vigna et al. 2016a). A maior frequência de meiócitos com univalentes ratifica a proposta de
183 aneuploidia no acesso H031, visto que em indivíduos trissômicos, o cromossomo extra pode não se
184 parear ou pode se associar com bivalente, formando um trivalente (Sybenga 1992 e 1975; Singh
185 2017). O trabalho de Rocha et al. (2019a), ao estudar o comportamento meiótico em híbridos do
186 complexo ‘*brizantha*’, demonstrou que o híbrido aneuploide H963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*)
187 apresentou maiores taxas de anormalidades, indicando que o cromossomo extra pode afetar o
188 pareamento normal no processo meiótico. Nesse sentido, estudos envolvendo análises nas demais
189 fases da meiose, bem como a viabilidade polínica do acesso H031 são imprescindíveis para
190 observar o impacto da aneuploidia na regularidade do processo.

191 A sonda UroSat-1a, satélite centromérico das espécies do complexo agâmico ‘*brizantha*’ (Corrêa
192 et al., dados não publicados), produziu marcações centroméricas somente em alguns cromossomos
193 de ambos os acessos de *U. humidicola*. No acesso H016, a visualização de 16 marcações com essa
194 sonda também foi constada em metáfases mitóticas (dados não publicados). Desse modo, é
195 importante considerar que, apesar de possuir função conservada, o centrômero pode apresentar
196 sequências de DNA altamente divergentes (Henikoff et al. 2001; Lee et al. 2005; Oliveira e Torres
197 2018), até mesmo entre espécies relacionadas, como no arroz (Lee et al. 2005; Oliveira e Torres
198 2018). Essa variação se deve à presença de sequências centroméricas altamente repetitivas, sendo os
199 retrotransposons os principais envolvidos na origem de novas repetições (Oliveira e Torres 2018).
200 Desse modo, alguns cromossomos do complexo ‘*humidicola*’ devem ter sequências específicas

201 (diferentes da Urosat-1a), com maior divergência para as sequências centroméricas do acesso H031.
202 É importante enfatizar que, filogeneticamente, as três espécies que formam o complexo agâmico
203 ‘*brizantha*’ apresentam divergência genética em relação ao complexo ‘*humidicola*’ (Triviño et al.,
204 2017).

205 Em relação aos sítios ribossomais, um estudo realizado por Damasceno et al. 2023, já relatou a
206 variação numérica . Em metáfases mitóticas foram observados sítios de rDNA 5S variando entre 12
207 e 13 somente para o acesso H031, pois o acesso H016 exibiu invariavelmente dez sítios. Nesse
208 sentido, é importante ressaltar que, em análises meióticas, a visualização desses sítios pode ser
209 prejudicada, devido às inúmeras possibilidades de configurações de pareamento e a sobreposição
210 dos homólogos, de modo que alguns sítios aparentam estar associados, o que resulta em diferenças
211 na contagem de sinais (Rocha et al. 2019b).

212 As marcações centroméricas permitiram mostrar combinações de pareamentos: i) entre
213 cromossomos com e sem marca centromérica na mesma configuração; ii) entre dois ou mais
214 cromossomos sem marcação; iii) com marcação em ambos os cromossomos. Essa variação
215 demonstra que a homeologia encontrada entre os genomas que compõem os diferentes conjuntos
216 cromossômicos pode resultar em múltiplas associações cromossômicas, o que reforça a proposta de
217 aloploidia e confirma a presença de subgenomas na espécie (Sybenga 1992), como já relatado
218 para os acessos analisados (Vigna et al. 2016a, Damasceno et al. 2023).

219

220 **CONCLUSÃO**

221 Ambos os acessos apresentaram pareamento irregular com formação de univalentes e
222 multivalentes, mas com uma maior frequência de formação de bivalentes nas diacineses e metáfases

223 I.

224 O acesso H031 apresentou maior frequência de univalentes, o que ratifica a proposta de
225 aneuploidia.

226 A marcação centromérica em alguns cromossomos com a sonda UroSat-1a pode ser explicada
227 pela divergência encontrada em sequências centroméricas entre os cromossomos das espécies do
228 complexo ‘brizantha’ e do complexo ‘humidicola’.

229 A ocorrência de configurações uni e multivalentes e a marcação de sinais FISH em alguns
230 cromossomos que integram as configurações de pareamento são condizentes com a proposta de
231 aloploidia.

232

233 **Agradecimentos**

234 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
235 CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e a Coordenação
236 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro à pesquisa.

237 **Conflito de interesse**

238 Os autores declaram não haver conflito de interesse.

239 **REFERÊNCIAS**

240 Adamowski EDV et al (2007). Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria*
241 *humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Genet Mol Res** 6: 21.

242 Akiyama Y; Yamada-Akiyama H, Ebina M (2010). Morphological diversity of chromosomes
243 bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. **Grassland science** 56: 217-223.

244 Assis GML, Santos CL, Flores PS, Valle, CB (2014). *Genetic divergence among Brachiaria*
245 *humidicola* (Rendle) Schweick hybrids evaluated in the Western Brazilian Amazon. **Crop Breeding**
246 **and Applied Biotechnology** 14: 224-231.

247 Bernini C, Marin-Morales MA (2001). Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species.
248 **Cytobios** 104: 157-171.

- 249 Boldrini KR, Pagliarini MS, Do Valle CB (2006a). Cell fusion and cytomixis during
250 microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **South African Journal of Botany 72:**
251 478-481.
- 252 Boldrini KR, Pagliarini MS, Do Valle CB (2006b). Abnormal timing of cytokinesis in
253 microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics 85:** 225-
254 228.
- 255 Boldrini KR, Micheletti PL, Gallo PH, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB (2009a).
256 Origin of a polyploid accession of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae).
257 **Genetics and Molecular Research 8:** 888-895.
- 258 Boldrini KR, Pagliarini MS, Do Valle CB (2009b). Meiotic behavior of a nonaploid accession
259 endorses $x=6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research 8:** p. 50.
- 260 Boldrini KR, Adamowski EV, Silva N, Pagliarini MS, Valle CBD (2011a). Meiotic behavior in
261 nonaploid accessions of *Brachiaria humidicola* (Poaceae) and implications for breeding. **Genetics**
262 **and Molecular Research 10:** 169-176,.
- 263 Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB (2010). Evidence of natural hybridization in *Brachiaria*
264 *humidicola* (Rendle) Schweick. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Journal of genetics 89:** 91–94.
- 265 Boldrini KR et al (2011b). Meiotic behavior as a selection tool in the breeding of *Brachiaria*
266 *humidicola* (Poaceae). **Euphytica 182:** 317-324.
- 267 CABI (2022) '*Urochloa humidicola* (koronivia grass)', CABI Compendium. **CABI International.**
268 doi: 10.1079/cabicompendium.9666.
- 269 Choudhary A et al (2020). Varietal variation and chromosome behaviour during meiosis in *Solanum*
270 *tuberosum*. **The genetics society.**
- 271 Damasceno AG et al (2023). Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Urochloa humidicola*
272 (Rendle) Morrone & Zuloaga (Poaceae) accessions. **Taylor & Francis Online.**

- 273 Figueiredo UJ, Nunes JAR, Valle CB (2012). Estimation of genetic parameters and selection of
274 *Brachiaria humidicola* progenies using a selection index. **Crop Breeding and Applied**
275 **Biotechnology 12**: 237-244.
- 276 Hand ML, Koltunow AMG (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation.
277 **Genetics 197**: 441-450.
- 278 Henikoff S et al. (2001). The Centromere Paradox: Stable Inheritance with Rapidly Evolving DNA.
279 **Science 293**:1098-1102.
- 280 Jungmann L et al (2010). Genetic diversity and population structure analysis of the tropical pasture
281 grass *Brachiaria humidicola* based on microsatellites, cytogenetics, morphological traits, and
282 geographical origin. **Genome 53**: 698-709.
- 283 Lapointe SL, Miles JW (1992). Germoplasm case study: *Brachiaria* species In: Pastures for
284 the tropical lowlands: CIATs contribution ed. Hardy, B. **CIAT Publication**.
- 285 Lee HR, Zhang W, Langdon T, Jin W, Yan H, Cheng Z, Jiang J (2005) Chromatin
286 immunoprecipitation cloning reveals rapid evolutionary patterns of centromeric DNA in *Oryza*
287 species. **Proc Natl Acad Sci USA 102**:11793–11798.
- 288 Machado LAZ et al (2010). Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de
289 corte. **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**.
- 290 Morrone O, Zuloaga FO (1992). Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de
291 los géneros *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae:Panicoidae:Paniceae). **Darwiniana 31**: 43-109.
- 292 Morrone O, Zuloaga FO (1993). Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoidae: Paniceae)
293 para México y América Central. **Darwiniana 32**: 59-75.
- 294 Oliveira LC, Torres GA (2018). Plant centromeres: genetics, epigenetics and evolution. **Mol Biol**
295 **Rep 45**: 1491–1497.
- 296 Paciullo DSC, Gomide CADM (2016). As contribuições de *Brachiaria* e *Panicum* para a pecuária
297 leiteira. In: **Pecuária de leite no Brasil**: Cenário e avanços tecnológicos. E: Duarte Vilela; adam

- 298 Rao IM, Kerridge PC, Macedo MCM (1996). Nutritional requirements of *Brachiaria* and adaptation
299 to acid soils. In. *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement* ed. John
300 W. Miles, Brigitte L. Maass, Cacilda Borges Valle. **CIAT Publication**: 288.
- 301 Ricci GL et al (2011). Meiotic behavior in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) hybrids. **Euphytica**
302 **182**: 355-361.
- 303 Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CBdo (2006a). A new basic chromosome number for the
304 genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetic Resources and Crop**
305 **Evolution 53**: 7-10.
- 306 Rocha MJ, Chiavegatto RB, Damasceno AG, et al (2019a). Comparative meiosis and cytogenomic
307 analysis in euploid and aneuploid hybrids of *Urochloa* P. Beauv. **Chromosome Res 27**: 333–344.
- 308 Rocha LC, Ferreira MTM, Cunha IMF, et al (2019b). 45S rDNA sites in meiosis of *Lolium*
309 *multiflorum* Lam.: variability, non-homologous associations and lack of fragility. **Protoplasma 256**:
310 227–235.
- 311 Santos FC et al (2015). Chromosomal distribution and evolution of abundant retrotransposons in
312 plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. **Chromosome Research**
313 **23**: 571-582.
- 314 Singh R J (2017). *Plant Cytogenetics*. Boca Raton, EUA: **CRC Press**.
- 315 Scheben A, Hojsgaard D (2020). Can we use gene-editing to induce apomixis in sexual plants.
316 **Genes 11**: 781.
- 317 Sybenga J (1992). *Cytogenetics in plant breeding*. New York: **Springer-Verlag**.
- 318 Sybenga J (1975). *Meiotic Configurations: A Source of Information for Estimating Genetic*
319 *Parameters*. **Springer-Verlag 1**.
- 320 Tomaszewska P, Vorontsova MS, Renvoize SA, et al (2023). Complex polyploid and hybrid
321 species in an apomictic and sexual tropical forage grass group: genomic composition and evolution
322 in *Urochloa* (*Brachiaria*) species. **Ann Bot 131**: 87-108.

- 323 Triviño NJ, Perez JG, Recio ME, Ebina M, Yamanaka N, Tsuruta S, Ishitani M, Worthington M
324 (2017). Genetic diversity and population structure of *Brachiaria* species and breeding populations.
325 **Crop Science** **57**: 2633-2644.
- 326 Valle CBD, Glienke C (1991). New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis News Let** **3**: 11-13.
- 327 Vigna BBZ et al (2016a). Evidence of allopolyploidy in *Urochloa humidicola* based on cytological
328 analysis and genetic linkage mapping. **PloS one** **11**: 1-23.
- 329 Vigna BBZ et al (2016b). Leaf transcriptome of two highly divergent genotypes of *Urochloa*
330 *humidicola* (Poaceae), a tropical polyploid forage grass adapted to acidic soils and temporary
331 flooding areas. **BMC genomics** **17**: 910, 2016b.
- 332 Worthington M et al (2019). Translocation of a parthenogenesis gene candidate to an alternate
333 carrier chromosome in apomictic *Brachiaria humidicola*. **BMC genomics** **20**: 1-18.