

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Nicolle Vieira Santos Costa

**Análise citogenética de espécies e híbridos interespecíficos
de *Paspalum* L. (Poaceae)**

São Carlos

2022

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Nicolle Vieira Santos Costa

Análise citogenética de espécies e híbridos interespecíficos de
***Paspalum* L. (Poaceae)**

Trabalho de conclusão de curso submetido como
requisito para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dr^a Alessandra Pereira Fávero

Co- orientador: Prof. Dr. Marcelo de Bello Cioffi

São Carlos

2022

À Deus e aos meus pais, Aline e Cleibe, dedico
todo meu esforço para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo privilégio da vida, por ser sempre o guia e planejador dos meus sonhos. Por me dar forças e ânimo para dedicar-me ao trabalho árduo da pesquisa e ser o meu eterno descanso. Agradeço a minha família, minha mãe Aline e meu pai Cleibe, minhas avós, Dalva e Wilma, minha tia Helaine e aos meus irmãos Bianca e Worgon Lucas, por tornarem a vida mais alegre, me ensinaram a importância da dedicação ao conhecimento e me sustentaram em amor e cuidado.

Agradeço as irmãs que ganhei na graduação, Isabela e Júlia, por tornarem os dias e noites de estudo prazerosos e me ensinaram a amar a pesquisa.

Agradeço as amigas intencionais, Anabel, Ana Paula, Alaide, Ellen, Isabela, Karina e Maria, pelas orações, pelas risadas, pelo apoio e cuidado.

Agradeço a todos os professores do curso de bacharelado em Biotecnologia pelo ensino e conhecimento repassado com tanto esmero.

Agradeço à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Pecuária Sudeste pela oportunidade de participar de um projeto tão importante para o desenvolvimento do nosso país.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Citogenética de Peixes (LCP), Francisco, Gustavo, Mayara, Renata e Vanessa, pela companhia e principalmente pelo auxílio e disposição em aprendermos juntos sobre a citogenética vegetal.

Agradeço ao Prof^o Marcelo Bello Cioffi por disponibilizar seu laboratório e sua equipe para o desenvolvimento desse trabalho e por aceitar ser meu co-orientador.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento que viabilizou este trabalho.

E principalmente, a minha orientadora Prof^a Alessandra Pereira Fávero por toda orientação e inspiração. Por ter se tornado minha referência na pesquisa, não há palavras para expressar sua excepcionalidade.

RESUMO

O gênero *Paspalum* L. (Poaceae) é formado por cerca de 350 espécies, sendo muitas dessas caracterizadas por alto potencial forrageiro. O gênero apresenta espécies apomíticas poliploides e sexuais diploides, predominantemente. Para programas de melhoramento, identificar o comportamento meiótico das espécies é essencial para direcionar os cruzamentos, sendo o objetivo deste trabalho caracterizar o comportamento meiótico de espécies e híbridos de *Paspalum* advindos de cruzamentos interespecíficos. Foram selecionados sete acessos de cinco espécies: BGP 149 (*P. rojasii* Hack), BGP 210 e 337 (*P. maritimum* Trind.), BGP 289 e 486 (*P. malacophyllum* Trin.), BGP 401 (*P. conjugatum* P. J. Bergius), BGP 436 (*P. dilatatum* Poir.) e sete plantas híbridas: Planta 2, 37, 77, 89, 206, 285, 298, para contagem cromossômica e análise do comportamento meiótico. Todos os acessos foram considerados tetraploides com 40 cromossomos, apresentando alguns genótipos com comportamento meiótico regular (BGP 210, BGP 337, BGP 289, BGP 486) e outros com comportamento irregular (BGP 149, BGP 401). No acesso BGP 436, não foi possível afirmar a ploidia. Entre as plantas híbridas, as plantas 2, 37 e 285 são diploides, contabilizando 20 cromossomos, com comportamento meiótico regular. As plantas 89, 206 e 298 apresentaram tetraploidia e comportamento meiótico irregular, divergindo da planta 77 que apresentou tetraploidia e meiose regular. Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para confirmação e revisão da ploidia e comportamento meiótico de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Paspalum* L. com a predominância de poliplodia. Além disso, a possibilidade de cruzamento interespecífico dentro do gênero *Paspalum* e a obtenção de híbridos férteis, com regularidade meiótica demonstrado no trabalho, abre possibilidade de seu uso dentro dos programas de melhoramento.

Palavras-chave: *Paspalum*, citogenética, cromossomos, melhoramento genético

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráfico proporcional mostrando as cultivares liberadas no mercado de acordo com as espécies de <i>Paspalum</i> L.....	10
Figura 2: Gráfico relacional entre níveis de ploidia e comportamento meiótico.....	15
Figura 3: Esquema de imagens representando pareamento cromossômico regular de acessos de <i>Paspalum</i> L – BGP 210 e BGP 337.....	27
Figura 4: Esquema de imagens representando pareamento cromossômico de híbridos diploides, plantas 2, 37 e 285.....	28
Figura 5: Esquema de imagens representando pareamento cromossômico de híbridos tetraploides inférteis, plantas 89, 206 e 298.....	28
Figura 6: Esquema de imagens representando pareamento cromossômico das plantas 77, híbridos tetraploides férteis.....	29
Figura 7: Esquema de imagens representando comportamento meiótico regular de híbridos férteis, plantas 77.....	31
Figura 8: Esquema de imagens demonstrando irregularidades meióticas observadas nos híbridos férteis, plantas 77.....	32
Figura 9: Esquema de imagens representando irregularidades observadas nos híbridos inférteis, plantas 89, 206 e 298.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Código dos acessos, nome das espécies, grupo informal ao qual pertencem e local de coleta.....	21
Tabela 2: Híbridos oriundos do cruzamento entre espécies do grupo Plicatula, <i>P. lenticulare</i> (BGP 281); <i>P. compressifolium</i> (BGP 380), <i>P. rojasii</i> (BGP 272)	22
Tabela 3. Modo de reprodução caracterizado por citometria de fluxo.....	26
Tabela 4. Ploidia e comportamento meiótico de acessos de <i>Paspalum</i> L.....	34
Tabela 5. Ploidia e comportamento meiótico de plantas híbridos de <i>Paspalum</i> L.....	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 O gênero <i>Paspalum</i> L.....	14
3.1.1. Grupo Conjugata.....	16
3.1.2. Grupo Dilatata.....	16
3.1.3. Grupo Paniculata.....	17
3.1.4. Grupo Plicatula.....	17
3.1.5. Grupo Malacophylla.....	18
3.2. Importância da citogenética para programas de melhoramento.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Coleta das amostras.....	21
4.2. Contagem e comportamento meiótico de genótipos elite do programa de melhoramento.....	21
4.3. Contagem e comportamento meiótico de híbridos interespecíficos.....	22
4.4. Microscopia de contraste fase e DAPI	22
4.5. Microscopia ótica e Carmim acético 1%	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Contagem cromossômica e modo de reprodução	25
5.2. Comportamento meiótico de híbridos tetraploides.....	30
6. CONCLUSÃO.....	36
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	36
8. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

As plantas forrageiras são amplamente utilizadas na agricultura brasileira visando proteger o solo, auxiliar no plantio direto na palha e principalmente como alimento para o consumo animal (NOGUEIRA, 2020). Nota-se a importância econômica das forrageiras pois a criação dos animais a pasto foi determinante para o crescimento econômico do país por meio da exportação de carne (ABIEC, 2022). Segundo dados levantados pela Secretaria de Comércio Exterior (Secex), as exportações dos seis primeiros meses de 2022 somam US\$ 6,2 bilhões.

A pecuária ocupa 351.289 milhões de hectares, aproximadamente 41% do território nacional (AGÊNCIA BRASIL, 2019), sendo que, de acordo com Valle & Pagliarini (2009), cerca de 85% das pastagens cultivadas são pertencentes ao gênero *Urochloa* (*Brachiaria*), gramínea nativa das savanas africanas. A substituição das pastagens por espécies não nativas ao longo dos anos é resultado de lançamento de cultivares comerciais que apresentaram maior produtividade (DIAS-FILHO, 2014). *Urochloa brizantha* cv. “Marandu”, por exemplo, advém de estudos na Embrapa Gado de Corte e Embrapa Cerrados, na década de 70, destacada por apresentar alta produção de forragem em áreas com baixa disponibilidade de insumos. Como consequência, representa mais de 80 milhões de hectares (ZIMMER *et al.*, 2012).

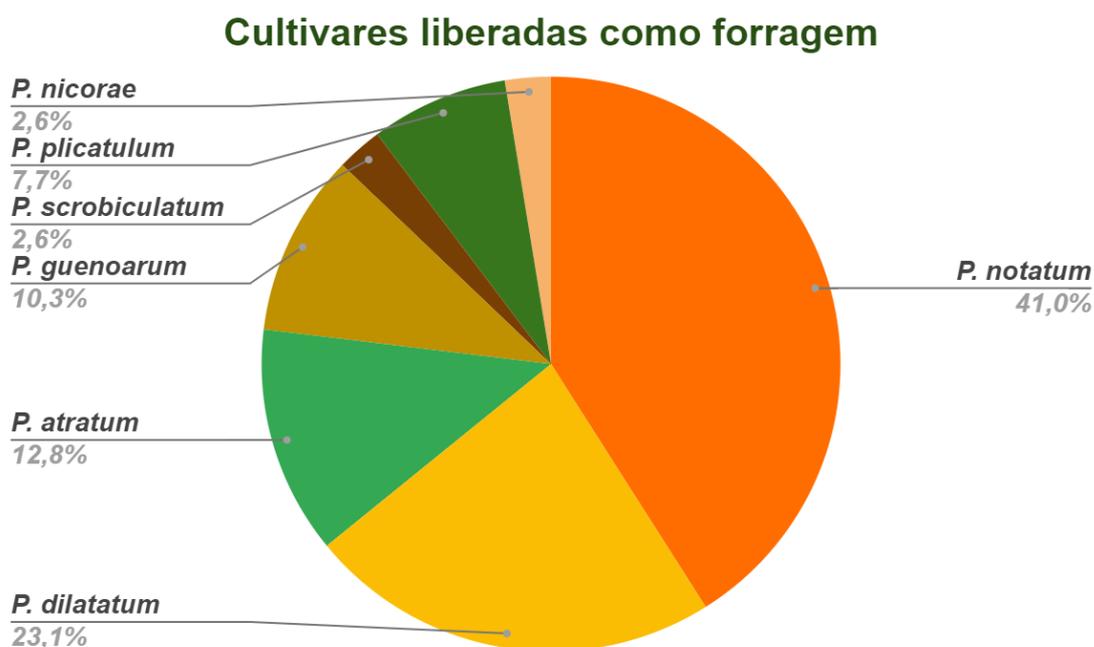
No entanto, as gramíneas forrageiras não nativas não atendem todos os ecossistemas brasileiros. Segundo Dias-Filho & De Andrade (2006), a cultivar Marandu, por exemplo, apresenta problemas na região Norte e Centro-Oeste com a “Síndrome da morte da Braquiária”, consequência da falta de tolerância ao encharcamento do solo da espécie e em situações com alto volume de chuvas. Há espécies do gênero indicadas para uso em situações semelhantes, tais como *Urochloa humidicola*, porém apresentam suscetibilidade às cigarrinhas, praga com grande destaque por devastar pastagens. É evidente, portanto, que há poucas cultivares de *Urochloa* no mercado adaptadas a nichos com demandas mais específicas, como drenagem deficiente ou condições de encharcamento do solo. Deste modo, o desenvolvimento de novas cultivares de gramíneas forrageiras que atendam nichos específicos é uma necessidade, principalmente buscando gêneros nativos como *Paspalum* L. (Poaceae).

O gênero *Paspalum* L. (Poaceae) é formado por cerca de 350 espécies, sendo muitas dessas caracterizadas por alto potencial forrageiro (GOUVEA *et al.*, 2020). Por ser um gênero nativo nas Américas, possui menor risco associado a desequilíbrios ecológicos e introdução

de doenças desconhecidas ao ser utilizado em culturas extensivas (BATISTA e GODOY, 1993; BATISTA e REGITANO NETO, 1999). Está distribuído em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do continente, ocorre em todo o Brasil (BARRETO, 1974). A grande adaptabilidade a ecossistemas distintos e a diversidade evidenciada na literatura (BATISTA, 1962; BURTON, 1967; BATISTA e GODOY, 1993), favorece o crescente interesse por este gênero com avanços em pesquisas sobre melhoramento genético ampliando o potencial para uso em pastagens cultivadas.

Segundo revisão realizada por Acuña *et al.* (2019), há cerca de 94 cultivares de *Paspalum* com diferentes usos como grão para consumo humano, cobertura vegetal ou forrageira, selecionados por meio de caracterização de genótipos conservados em bancos de germoplasma. No Brasil, destaca-se a espécie *Paspalum atratum* cv. Pojuca, utilizada como forrageira, e a espécie *Paspalum notatum* cv Pensacola, utilizada como cobertura vegetal na região sul do país, ambas por meio da seleção de germoplasma. No entanto, entre as cultivares liberadas, apenas 39 tem aplicação como forrageiras, derivadas de sete espécies. A principal espécie utilizada no país para fins de cobertura vegetal é *P. notatum*, conhecida como grama batatais.

Figura 1: Proporção de cultivares disponíveis no mercado advindas de espécies do gênero *Paspalum* L. (Dados de Acuña *et al.*, 2019)



A Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos-SP, possui o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Paspalum* com 60 espécies identificadas e mais de 480 acessos. Além disso, a Embrapa conta com o Programa de Melhoramento Genético de *Paspalum* que tem duas grandes frentes: 1) lançamento de cultivares para cobertura vegetal (uso em jardins, beira de rodovias, ferrovias e pistas de aeroportos) e 2) forrageiras para consumo por bovinos, equinos e ovinos. Dentro do programa de melhoramento para forrageiras, um dos principais objetivos é a seleção de materiais genéticos com alta produtividade de massa seca e sementes, qualidade bromatológica e tolerância a estresses bióticos (doenças fúngicas) e abióticos (encharcamento de solo e sombreamento). Há pouca disponibilidade de cultivares adaptadas a condições de encharcamento de solo, situação observada principalmente no norte do Mato Grosso e região norte do Brasil. Acredita-se que será de grande impacto o lançamento de novas cultivares de *Paspalum* adaptadas a essas condições, pois os genótipos de *Urochloa* ou *Panicum* disponíveis no mercado não tem se mostrado economicamente viáveis nesses locais. Para tanto, o projeto financiado pela Embrapa “Melhoramento Genético de *Paspalum*: desenvolvimento de forrageiras para nichos especiais” está em vigência com o objetivo de seleção de materiais para condições de encharcamento de solo e sombreamento, sendo esse último para uso em áreas de integração lavoura-pecuária-floresta (ILPF). Os acessos avaliados nesse trabalho foram selecionados dentro do projeto supracitado como materiais elite, com alta produtividade e tolerância a estresses abióticos. Eles poderão ser usados per se no lançamento de novas cultivares ou como genitores masculinos (no caso dos apomíticos) em cruzamentos intra ou interespecíficos. Já os híbridos interespecíficos avaliados no presente trabalho também fazem parte do programa de melhoramento. Eles foram construídos dentro do projeto financiado pela Fapesp “Poliploidização e caracterização de acessos de *Paspalum compressifolium* e *Paspalum lenticulare*”, após a seleção de genótipos diploides sexuais e posterior tetraploidização para serem utilizados como genitores femininos tetraplóides em cruzamentos com acessos apomíticos tetraplóides elites. Dentro do programa de melhoramento genético de *Paspalum*, a obtenção de materiais sexuais é fundamental para o avanço em cruzamentos e seleção de melhores genótipos. As espécies estão distribuídas em 24 grupos informais (CHASE, 1929), sendo que os acessos e espécies do grupo Plicatula compõem quase metade do acervo e são considerados com grande potencial para fins forrageiros (BATISTA, 1999). Quanto à ploidia, o gênero apresenta espécies apomíticas poliploides e sexuais diploides, predominantemente (ZULOAGA & MORRONE, 2005). Na apomixia, a formação de sementes ocorre de modo assexual, sem necessidade de fecundação,

logo, a meiose pode não ocorrer normalmente. Como resultado, o embrião formado é uma cópia exata do parental. Em contrapartida, a reprodução sexual tem como base a redução no número cromossômico para formação de gametófito, sendo necessário a fusão dos gametas, masculino e feminino. Assim, os embriões carregam o conjunto de cromossomos dos dois parentais (DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. 2005.).

A poliploidização de acessos de *Paspalum* L. é essencial em alguns grupos, como o Plicatula, visando associar características interessantes ao programa de melhoramento genético, uma vez que genótipos sexuais são diploides e apomíticos são tetraplóides (ZULOAGA & MORRONE, 2005; ORTIZ *et al.*, 2013). Logo, a caracterização do sistema reprodutivo e do comportamento meiótico é fundamental dentro dos programas de melhoramento genético. Estudos de observação de cromossomos em meiose trazem ótimos resultados para a avaliação do comportamento reprodutivo das espécies.

A citogenética é a ciência que estuda os cromossomos e a divisão celular. A compreensão do comportamento da divisão celular foi um grande marco científico, dado que o cromossomo é portador do DNA, constituição básica dos genes. O cromossomo é capaz de segregar, mutar, condensar, parear, permutar, demonstrando estratégias evolutivas quanto ao balanço gênico e sua influência no fenótipo das espécies (MUNIZ *et al.*, 2009). A contagem do número cromossômico é um parâmetro cariotípico, o qual fornece informações importantes sobre o genoma de uma espécie. Sendo o cariótipo o material genético em observado em níveis estruturais e organizacionais não há influência de condições externas. A variação cariotípica mais observada em plantas é a poliploidia, caracterizada pela multiplicação do conjunto cromossômico, destacada como principal mecanismo na evolução das plantas (GUERRA M., 2008).

Segundo Guerra M. (2008), características observadas no cariótipo de uma espécie podem fornecer informações a respeito de irregularidades na divisão celular e esterilidade, como problemas reprodutivos, além de relações genéticas para fins taxonômicos. O estudo dos cromossomos é, portanto, de grande valia na obtenção de informações relacionadas ao DNA, dando direcionamento às estratégias de cruzamento entre as espécies em programas de melhoramento genético.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo realizar a contagem de cromossomos e observar o comportamento meiótico de espécies de *Paspalum* pertencentes ao grupo Conjugata, Dilatata, Malacophylla, Paniculata, Plicatula, e de híbridos interespecíficos.

2.2 Objetivos específicos

a. Contagem cromossômica nas fases de metáfase e anáfase de sete espécies de *Paspalum* L.: *P. compressifolium* (BGP 380), *P. conjugatum* (BGP 401), *P. dilatatum* (BGP 436), *P. lenticulare* (BGP 281), *P. malacophyllum* (BGP 289), *P. maritimum* (BGP 210, BGP 337), *P. rojasii* (BGP 149, BGP 272), para identificação de ploidia.

Caracterização do comportamento meiótico de híbridos interespecíficos oriundos de cruzamentos de espécies do grupo Plicatula: I) *P. compressifolium* (BGP 380) x *P. lenticulare* (BGP 281) e seus recíprocos; II) *P. compressifolium* (BGP 380) x *P. rojasii* (BGP 272).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

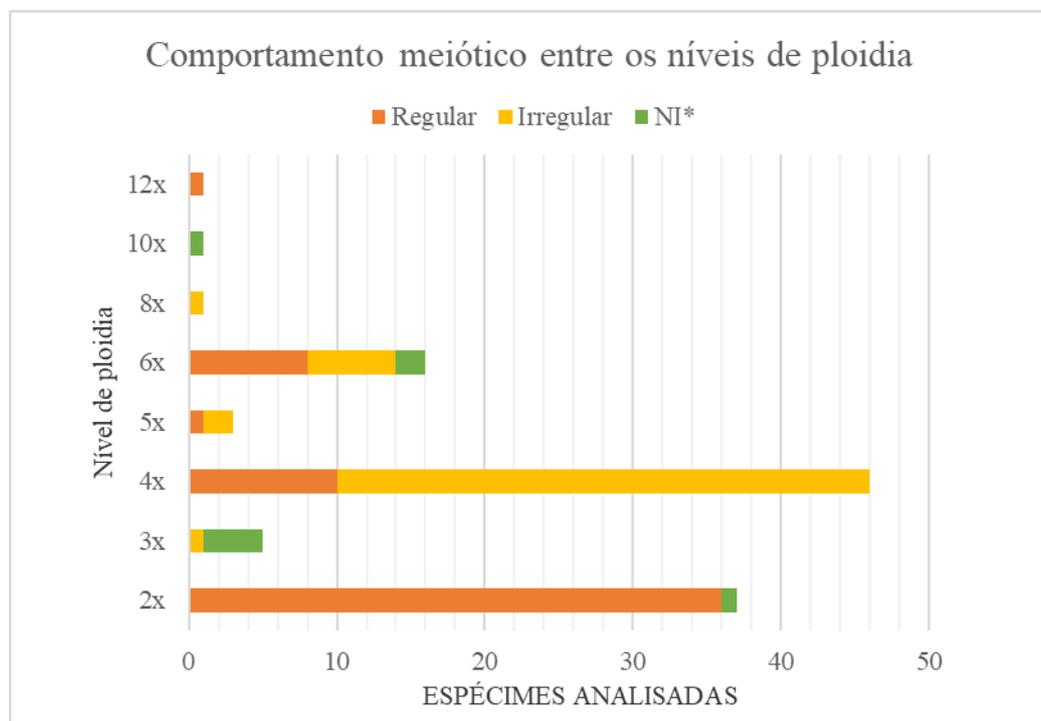
3.1 O gênero *Paspalum* L.

O gênero *Paspalum* L. pertence à tribo *Panicaceae*, subfamília *Panicoideae* e família *Poaceae* (BARRETO, 1974). Estima-se aproximadamente 350 espécies (GOUVEA *et al.*, 2020) com a ocorrência de 216 espécies no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020). Nativas das Américas, as espécies estão concentradas em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, encontradas no Brasil, Argentina, Uruguai e Estados Unidos (CHASE, 1929; GÖRTS-VAN-RIJN & JUDZIEWICZ, 1990; ZULOAGA & MORRONE, 2005; RUA *et al.*, 2008; MACIEL *et al.*, 2009). A importância que o gênero recebe entre as gramíneas brasileiras justifica-se pelo o grande número de espécies nativas com bom potencial forrageiro, além de apresentarem resistência ao frio e produção elevada de forragem e proteína bruta em comparação a outras gramíneas nativas do Rio Grande do Sul (DALL'AGNOL *et al.*, 2006).

Segundo Ortiz *et al.* (2013), estudos taxonômicos classificam as espécies em quatro subgêneros: 1. *Anachyris* Nees, 2. *Ceresia* Pers, 3. *Harpostachis* Trin e 4. *Paspalum sensu stricto* e reconhecem 40 grupos informais entre os subgêneros (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005; ORTIZ, *et al.* 2013). Contudo, a relação entre os grupos informais e subgêneros ainda não é bem estabelecida e necessita de maiores estudos moleculares (ORTIZ, *et al.* 2013) de modo que no presente trabalho será considerada a classificação de 24 grupos informais descritos por Chase (1929). Dentre os grupos informais, espécies pertencentes ao Dilatata, Notata, Livida e Plicatula se destacam pela produção de forragem (BARRETO, 1974). A quantidade de espécies pertencentes ao gênero com potencial forrageiro torna evidente o potencial da diversificação e adaptabilidade das espécies de *Paspalum* L. A distribuição das espécies por todas as regiões fisiográficas e formações campestres (BARRETO, 1974) e a variação genética dos citótipos reforçam essas características. Aproximadamente 75% das espécies desse gênero apresentam poliploidia e uma espécie pode apresentar mais de um tipo de citótipo (ORTIZ, *et al.* 2013). Dado que o número cromossômico mantém, predominantemente, uma multiplicidade de 10, são descritas espécies com variação na ploidia de 2x a 12x (POZZOBON, *et al.*, 2000; ORTIZ, *et al.*, 2013). Alguns relatos de casos raros descrevem números não múltiplos de 10 como 2n=32 para *P. convexum* Humb & Bonpl. ex Flugge (POZZOBON e VALLS, 1987) e *P. stellatum* Humb & Bonpl. ex Flugge (POZZOBON *et al.*, 2000), no entanto também são citadas contagens de 2n=20 e 2n=40 para essas espécies.

A poliploidia no gênero pode estar ou não associada a apomixia, característica definida pela formação de sementes sem a necessidade de fecundação (QUARÍN, 1992) e é uma das variáveis estudadas para compreensão da apomixia no gênero. O desenvolvimento do embrião na apomixia é feito a partir de uma célula somática do óvulo e como não há fusão de gametas durante a fertilização, a meiose não é funcional. Logo, anormalidades meióticas podem ser indicativos de reprodução apomítica que auxiliam na determinação do modo de reprodução. O trabalho de Ortiz (2013) trouxe uma revisão a respeito da apomixia no gênero, demonstrando a predominância de comportamentos irregulares na meiose de espécies apomíticas, como pareamentos desbalanceados, cromossomos não pareados, pontes cromossômicas, micronúcleos (Figura 2). Todavia, também são observadas espécies poliploides sexuais, tais como *P. simplex* Morong ex Britton 3x (URBANI *et al.*, 2002), *P. malacophyllum* Trin, 4x (BENNET e BASHAW, 1966), *P. dilatatum* Poir 4x (BASHAW, 1958), *P. inaequivale* Raddi, 6x (QUARIN e BURSON, 1991).

Figura 2: Comportamento da meiose entre os níveis de ploidia identificados nas espécies de *Paspalum* L. (de acordo com ORTIZ, *et al.* 2013).



Regular – formação predominante de bivalentes no pareamento cromossômico
 Irregular – associações cromossômicas multivalentes ou assinaapses
 NI* - meiose não identificada

A análise do comportamento meiótico e das associações cromossômicas fornecem informações essenciais a respeito da evolução dos grupos informais dentro do gênero e a

origem da ploidia. Em plantas tetraplóides, associações tetravalentes evidenciadas na diacinese, por exemplo, indicam autopoliploidia, em que a origem da ploidia é da replicação do genoma gamético de um único indivíduo, enquanto que a ausência de tetravalentes pode indicar aloploidia, ploidia a partir de genomas de origens diferentes, os quais que podem ser de cruzamentos interespecíficos (FREITAS, *et al.*, 1997).

Seguindo a classificação de grupos informais estabelecido por Chase em 1929, as espécies analisadas no trabalho em questão pertencem aos grupos: Conjugata, Dilatata, Paniculata, Plicatula e Malacophylla. O grupo Plicatula destaca-se por incluir as espécies utilizadas no cruzamento interespecífico para formação dos híbridos estudados no trabalho.

3.1.1 Grupo Conjugata

O grupo Conjugata, estabelecido por Chase (1929) é caracterizado por plantas perenes com inflorescências com dois racemos conjugados formando gramíneas densas (ZULOAGA & MORRONE, 2005).

- *P. conjugatum* P. J. Bergius: possui distribuição geográfica ampla, dos Estados Unidos até a Argentina e se destaca como forrageira devido a sua constituição tenra com boas aplicações para cobrir o pasto (DOMBROWSKI, 1989). É descrita como apomítica e tetraploide (CHUAN, Y., 1974; MA *et al.*, 2009).

3.1.2 Grupo Dilatata

O grupo Dilatata é caracterizado por plantas perenes com espiguetas formadas aos pares. A morfologia apresenta grande variância, podendo ter um crescimento a partir de um nó no colmo da planta, estolonífera, ou um crescimento aglomerado formando novos brotos, cespitosa, apresentando inflorescências de poucos a muitos racemos (ZULOAGA & MORRONE, 2005).

- *Paspalum dilatatum* Poir: Amplamente distribuída em regiões subtropicais e temperadas do mundo, a espécie tem poliploidia descrita aos níveis tetra, penta e hexa. Com origem híbrida, já foram identificados sete biótipos em que três são tetraplóides sexuais (*P. dilatatum* ssp. *flavescens*, *P. dilatatum* “Virasoro” e *P. dilatatum* “Vacaria”), três são hexaplóides apomíticos (*P. dilatatum* “Chirú”, “Uruguaiana” e “Torres”) e o predominante é o pentaplóide apomítico (*P. dilatatum* ssp. *dilatatum*) (BURSON, 1991; EVERS e BURSON, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2011). Entre as cultivares liberadas no mercado, 23% são *P. dilatatum* (Figura 1).

3.1.4 Grupo Paniculata

Formado por aproximadamente 10 espécies, o grupo informal Paniculata é caracterizado por plantas perenes, com inflorescências pequenas e morfologicamente diversas em formato ovalado a elíptico. O antécio superior possui cor de palha e brilhante (MACIEL, *et al.*, 2009; MORRONE, 2005).

- *Paspalum maritimum* Trind.: a espécie *P. maritimum* é tetraploide e apomítica (CHASE, 1929). O comportamento meiótico descrito na literatura é de associação cromossômica formando predominantemente bivalentes, anormalidades na meiose I como segregação precoce, cromossomos retardatários e micronúcleos também foram observados. Embora há irregularidades na meiose, a espécie se destaca por apresentar frequência maior de tétrades normais em contraste com outras espécies tetraploides do gênero, o que indica maior regularidade meiótica (ADAMOWSKI *et al.*, 2000)

3.1.3 Grupo Plicatula

Estabelecido por Chase em 1929, Plicatula é um grupo informal do gênero *Paspalum* L. que agrupa cerca de 30 espécies morfologicamente caracterizadas por espiguetas marrons ou oliváceas escuras, frutos de superfície marrom escuro ou preto azeviche (AGUILERA, *et al.*, 2011). Há predominância de tetraploidia no grupo e reprodução apomítica com casos raros de citótipos diploides. Já foram encontrados espécimes diploides e sexuais nas seguintes espécies *P. compressifolium* Swallen, (QUARIN *et al.*, 1996), *P. glaucescens* Hack. (PRITCHARD, 1962), *P. plicatulum* Michx (ESPINOZA e QUARIN, 1997), *P. wrightii* Hitchc. & Chase (MARTINEZ e QUARIN, 1999), *P. lenticulare* Kunth e *P. rojasii* Hack (GONÇALVEZ *et al.*, 2021).

Genótipos apomíticos e tetraplóides do grupo Plicatula que se destacaram como forrageiros foram lançadas como cultivares (ACUÑA *et al.*, 2019) em países como Austrália, Paraguai, Argentina e Estados Unidos. Entretanto, a descoberta de genótipos sexuais possibilitou o início dos trabalhos envolvendo cruzamentos interespecíficos após a tetraploidização de acessos sexuais. Aguilera *et al.* (2011) realizaram o cruzamento entre um genótipo tetraploide sexual induzido de *P. plicatulum* e um acesso tetraploide apomítico de *P. guenoarum*.

- *Paspalum compressifolium* Swallen: nativa da América do Sul e distribuída no Brasil, Argentina e Paraguai. Já foram descritos citótipos diploides sexuais,

tetraploides e hexaploides apomíticos para a espécie, dado que há predominância de tetraploidia. O comportamento meiótico dos tetraploides indica a origem da ploidia por autotetraploidia, pois identificou-se alta frequência de associações multivalentes. Os hexaploides identificados podem ser advindos de hibridização interespecífica visto que há diferenças morfológicas e comportamentais em relação aos demais citótipos (QUARÍN *et al.*, 1996).

- *Paspalum lenticulare* Kunth: é comumente encontrada em savanas sazonalmente inundadas na Bolívia, Paraguai e pelo centro-oeste do Brasil. É, predominantemente, tetraploide com reprodução apomítica, dado que o comportamento meiótico é irregular pela formação de associações multivalentes entre os cromossomos. Recentemente, foram documentados acessos sexuais e diploides, confirmando o potencial para reprodução sexual evidenciada na literatura. (ESPINOZA *et al.*, 2001, GONÇALVEZ *et al.*, 2021).
- *Paspalum rojasii* Hack: classificada em 1954 por Hack, há controvérsias na literatura a respeito da espécie, considerada por alguns autores como uma cultivar de *P. guenoarum* (BURSON & HUSSEY, 2004). *P. guenoarum* e *P. rojasii* são ambos classificados como apomíticos e tetraploides com associação de bivalentes e quadrivalentes na meiose I, estudos recentes identificaram acessos diploides e sexuais (GONÇALVEZ *et al.*, 2021). Algumas cultivares liberadas, Pasto Rojas e Pasto Ramirez, ganharam destaque no Paraguai, Argentina e sul do Brasil entre 1950 e 1970, contudo, por problemas na disponibilidade de sementes foram perdendo a popularidade (BURSON & HUSSEY., 2004).

3.1.5 Grupo Malacophylla

Chase considerou *Anachysis* um subgênero de *Paspalum* caracterizado por agrupar seis espécies com espiguetas côncavo-convexas, com glumas ausentes. No entanto, em 1929 em nova análise sistemática, Chase agrupou essas espécies no grupo informal Malacophylla. Entre as espécies do grupo, destaca-se *Paspalum malacophyllum*. (MORRONE *et al.*, 2000).

- *P. malacophyllum* Trin: é nativa da América do Sul, com distribuição geográfica da Argentina ao México, e em todo o Brasil (PIMENTA *et al.*,

2012). Estudos referentes ao potencial como forrageira foram realizados em diferentes regiões no sul dos Estados Unidos e demonstraram aplicações como feno e pasto, com produção elevada de sementes (BURTON, 1942). Tem sido predominante genótipos tetraploides, no entanto há diploides e hexaploides descritos. O modo de reprodução relatado até o momento é sexual nos diploides e apomítico facultativo nos tetraploides (HOJSGAARD *et al.*, 2008; BENNET e BASHAW, 1966).

3.2 A importância da citogenética para programas de melhoramento

A citogenética é a ciência que estuda os cromossomos, estrutura celular que contém o material genético, termo criado em 1888 por Waldeyer-Hartz. Os estudos citológicos do final do século XIX e início do século XX fortaleceram as teorias científicas que hoje são a base da citogenética. A teoria cromossômica da herança genética, consolidada por Thomas Hunt em 1915 e proposta por Sutton e Boveri em meados de 1900, afirmava que os cromossomos possuíam regiões específicas contendo os genes. O estudo do comportamento cromossômico, portanto, possibilita a compreensão sobre o modo como os genes são herdados, por meio dos mecanismos envolvidos na organização e regulação da atividade gênica no processo de divisão celular (SUMNER, 2003).

A mitose e meiose são os dois processos de divisão celular estudados na citogenética. Enquanto no primeiro há formação de duas células equivalentes geneticamente, no segundo processo há formação de gametas e esporos. Ambos são essenciais para a transmissão e continuidade das características herdadas, no entanto, a meiose, por se tratar de células germinativas, fornece informações a respeito da fertilidade das espécies (MUNIZ, 2009). A recombinação genética e a viabilidade dos gametas podem ser inferidas pelo pareamento cromossômico e regularidade meiótica. Segundo Souza *et al.* (2003), erros no pareamento, como falhas na manutenção ou formação das fibras do fuso, podem levar ao desbalanço gênico e conseqüentemente ao menor número de gametas viáveis.

No estudo de híbridos, a meiose é o processo determinante da fertilidade, pois anormalidades meióticas influenciam na estabilidade genética e viabilidade polínica. Logo, a análise da meiose nos híbridos é essencial para direcionar os programas de melhoramento nas fases seguintes, aumentando as chances de obter híbridos de acordo com as características desejadas (PAGLIARINI, 2001). Em hibridações interespecíficas, mutações meióticas podem ocorrer durante a síntese de DNA ou ao final da segunda divisão. Mutações na síntese de

DNA resultam em disjunção meiótica com a observação de assinapses desde a anáfase I até a telófase II (SINGH, 2003). Quando ocorrem mutações que afetam a formação do complexo sinaptonêmico, seja pelo não pareamento dos cromossomos homólogos, ou por desfazer o pareamento precocemente é observada a formação de univalentes (LIU e QU, 2008).

Em espécies com importância econômica, como as pertencentes ao gênero *Paspalum* L., o estudo citogenético antecede etapas de cruzamentos interespecíficos nos programas de melhoramento, pois fornecem informações fundamentais a respeito da variabilidade genética, como a taxa de fertilidade, a não disjunção cromossômica, polimorfismos estruturais ou numéricos. A partir disso, é possível selecionar acessos com potencial para hibridações (DE CARVALHO, 2009). A predominância de poliploidia no gênero ampara a necessidade de caracterização citogenética contínua nos acessos para escolha de genótipos para seleção e futuro lançamento de cultivares, dado que, a instabilidade meiótica associada afeta diretamente a fertilidade das plantas (ACUÑA *et al.*, 2019).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, a citogenética ampliou seu campo ao incluir o uso de sondas de DNA para caracterização do genoma e fluxo gênico. Técnicas como hibridização fluorescente *in situ* - FISH, e hibridização genômica *in situ* – GISH, são exemplos da citogenética molecular, que vem sendo aplicada nos estudos de caracterização de espécies e híbridos dentro dos programas de melhoramento. O trabalho de Vaio *et al.*, (2019) com espécies do grupo Dilatata, por exemplo, utilizou sondas de rDNA 35S e 5S para sequenciamento de sequências de espaçadores internos transcritos (ITS) para compreensão dos processos evolutivos de poliploidização.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta dos materiais

Para a realização da contagem cromossômica e observação do comportamento meiótico, as inflorescências foram coletadas a campo, no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste ainda em fase de cartucho, quando as mesmas ainda estão imaturas e envoltas na folha bandeira. Tal atividade foi realizada no período de floração entre agosto/2021 e março/2022. Inflorescências eram retiradas do cartucho e imediatamente fixadas em Solução de Carnoy (6 Álcool Etílico: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) por 24hrs. Após esse tempo, o material foi armazenado em geladeira em álcool 70% até o momento das análises.

4.2 Contagem e comportamento meiótico de genótipos elite do programa de melhoramento

Na Tabela 1 é possível observar os genótipos considerados elite coletados para análise. Esses foram anteriormente selecionados dentro do programa de melhoramento por possuírem características de interesse como alta produção de matéria seca, alta qualidade bromatológica, tolerância a encharcamento, etc. Os acessos fazem parte do projeto da Embrapa “Melhoramento Genético de *Paspalum*: desenvolvimento de forrageiras para nichos especiais”.

Tabela 1. Código dos acessos, nome das espécies, grupo informal ao qual pertencem e local de coleta.

Acesso	Espécie	Local de coleta	Grupo
BGP 380	<i>P. compressifolium</i> Swallen	-	Plicatula
BGP 401	<i>P. conjugatum</i> P. J. Bergius	Bertioga – SP	Conjugata
BGP 436	<i>P. dilatatum</i> Poir.	Apiaí – SP	Dilatata
BGP 281	<i>P. lenticulare</i> Kunth.	Anastácio – MS	Plicatula
BGP 289	<i>P. malacophyllum</i> Trin.	Aral Moreira - MS	Malacophylla
BGP 486	<i>P. malacophyllum</i> Trin.	Ponta Porã - MS	Malacophylla
BGP 210	<i>P. maritimum</i> Trind.	Oiapoque – AP	Paniculata
BGP 337	<i>P. maritimum</i> Trind.	São Carlos – SP	Paniculata
BGP 149	<i>P. rojasii</i> Hack.	Campo Belo do Sul - SC	Plicatula
BGP 272	<i>P. rojasii</i> Hack.	Dois Irmãos do Buriti – MS	Plicatula

4.3 Contagem e comportamento meiótico de híbridos interespecíficos

No projeto financiado pela Fapesp “Poliploidização e caracterização de acessos de *Paspalum compressifolium* e *Paspalum lenticulare*”, três acessos, BGP 281, BGP 380 e BGP 272, de três espécies citadas acima, caracterizados como sexuais e diploides foram plantados a campo e próximos para desenvolvimento de plantas híbridas ainda diploides com potencial para uso como genitores femininos dentro do programa de melhoramento. Sabendo-se que são plantas com alta autoincompatibilidade, sementes geradas dessas plantas foram posteriormente confirmadas como híbridas. Após colheita dessas sementes, essas foram tratadas com colchicina para induzir a poliploidização, e as plantas caracterizadas e selecionadas por citometria de fluxo quanto ao conteúdo de DNA. Essas etapas foram realizadas em experimentos anteriores.

Plantas com alto conteúdo de DNA foram selecionadas para contagem de cromossomos e observação do comportamento meiótico nesse trabalho. Na tabela 2, pode-se observar o número da planta e o cruzamento confirmado anteriormente por marcadores moleculares. As plantas 77, 89, 206 e 298 apresentaram conteúdo de DNA compatível a plantas tetraploides em análise por citometria de fluxo, sendo necessária confirmação por contagem cromossômica. Entre as plantas selecionadas, foram utilizados três tratamentos de colchicina distintos. Já as plantas 2, 37 e 285, por citometria de fluxo, foram consideradas diploides, porém seria interessante confirmar o número de cromossomos e observar o pareamento entre os cromossomos das diferentes espécies.

As plantas estavam conservadas em vasos em condições de telado. Diferentes plantas foram replicadas vegetativamente baseadas em diferentes perfilhos para observação da manutenção da ploidia após a duplicação de cromossomos com uso de colchicina. Por isso, na Tabela 2 é possível observar numeração após a identificação das plantas como Planta 77h-8, Planta 77h-9, etc.

Tabela 2: Híbridos oriundos de cruzamentos entre espécies do grupo *Plicatula*, *P. lenticulare* (BGP 281); *P. compressifolium* (BGP 380), *P. rojasii* (BGP 272).¹

Híbrido	Genótipo
Planta 2	BGP 380 x BGP 281
Planta 37	BGP 380 x BGP 281
Planta 77 h – 8	BGP 281 x BGP 380
Planta 77 h – 9	BGP 281 x BGP 380
Planta 77 k – 1	BGP 281 x BGP 380
Planta 77 k – 7	BGP 281 x BGP 380
Planta 77 n – 1	BGP 281 x BGP 380
Planta 77 n – 10	BGP 281 x BGP 380
Planta 89 e – 1	BGP 281 x BGP 380
Planta 89 e – 2	BGP 281 x BGP 380
Planta 89 i -1	BGP 281 x BGP 380
Planta 89 i -10	BGP 281 x BGP 380
Planta 89 m – 1	BGP 281 x BGP 380
Planta 89 m – 6	BGP 281 x BGP 380
Planta 206	BGP 380 x BGP 281
Planta 285	BGP 272 x BGP 281
Planta 298	BGP 380 x BGP 281

4.4 Microscopia de contraste de fase e DAPI

Os floretes foram dissecados em microscópio estereoscópio, as anteras foram maceradas em lâmina com uma gota de ácido acético 45% e pressionadas com uma lamínula para análise por microscopia de contraste fase seguindo protocolo adaptado de Guerra e Souza (2002). As lâminas com metáfases tiveram suas lamínulas removidas para aplicação de DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol- marcador fluorescente que possibilita a visualização dos cromossomos individualizados. Para remoção da lamínula foram utilizadas duas abordagens distintas: I) imersão em ácido acético 100% por 24 horas, II) imersão em nitrogênio líquido e

¹ Na descrição do cruzamento em programas de melhoramento, é convencional apresentar o genitor feminino primeiro, seguido pelo genitor masculino. Logo, as tabelas apresentam genitor feminino x genitor masculino.

deixada para secar por 2h. As análises foram iniciadas seguindo a primeira abordagem, contudo, algumas amostras tiveram suas células degradadas pelo ácido acético impossibilitando a análise. Sendo assim, optou-se por seguir com a segunda abordagem nas análises posteriores. Aplicou 20 µl de DAPI na concentração de 1,5 µg/ml com lamínula. Para estabilizar o fluorocromo, as lâminas foram para geladeira por 30 minutos para então realizar-se a análise no microscópio de fluorescência sob o programa Isis Fluorescence Imaging System com o registro das figuras no aumento de 100x.

4.5 Microscopia ótica e Carmim acético 1%

Os híbridos confirmados tetraploides pela contagem cromossômica, planta 77, 89, 206 e 298, foram selecionados para análise de comportamento meiótico. Os floretes foram dissecados em microscópio estereoscópio e as anteras foram maceradas em lâmina com uma gota de carmim acético 1%. Após adição da lamínula, o material foi avaliado em microscópio ótico com contraste de fase nos aumentos 20, 40 e 80x. As fases identificadas de meiose I e II foram registradas pelo programa Axio Vision no aumento de 80x, dando preferência para as fases de anáfase, telófase e formação de tétrades.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem cromossômica e modo de reprodução

Para contagem cromossômica, teve-se como premissa, a contagem de ao menos 10 células de cada acesso, com exceção dos acessos 149, 401 e 436. A dificuldade de obtenção das células na fase adequada para os acessos em questão foi consequência de dois problemas: I) material coletado muito imaturo, identificação de células em prófase, II) material coletado em fase de formação de pólen, após meiose. Os acessos BGP 272, 281 e 380 como já documentados em análises anteriores (GONÇALVES *et al.*, 2021) apresentam comportamento meiótico regular e com formação de 10 bivalentes.

Entre os demais acessos analisados, foram contados 40 cromossomos indicando tetraploidia, com exceção do acesso 436, em que a dificuldade na obtenção das células impossibilitou confirmar a contagem, a qual variou entre 30 a 40 cromossomos, resultados identificados na Tabela 4. Os acessos BGP 149 (*P. rojasii*) e BGP 401 (*P. conjugatum*) se destacaram por maior frequência de anormalidades cromossômicas, sendo que associações multivalentes são observadas na literatura para ambas as espécies (BURSON & HUSSEY, 2004; MA *et al.*, 2009). Entre as irregularidades documentadas para espécie *P. conjugatum*, observa-se assinapses, a falta total ou parcial de pareamento dos cromossomos homólogos, promovendo a prevalência de univalentes (CHUAN, Y., 1974; MA *et al.*, 2009) entretanto, foi observado no BGP 401 predominância em associações multivalentes no pareamento com formação de bi e trivalentes. Em contrapartida, o acesso BGP 210 (*P. maritimum*), embora poliploide, apresentou comportamento regular no pareamento cromossômico com formação de 20 bivalentes, apoiando a literatura descrita para a espécie com maior frequência de regularidade meiótica em comparação a demais tetraploides do gênero (ADAMOWSKI *et al.*, 2000). O acesso BGP 337 (*P. maritimum*) teve comportamento similar ao BGP 210 observados na Figura 3, ambos acessos da mesma espécie do grupo informal Paniculata, o que pode justificar a semelhança. O acesso BGP 289 (*P. malacophyllum*) apresentou pareamento irregular com associações bivalentes e quadrivalentes, contudo observou-se predominância de bivalentes, o que pode estar relacionado à sexualidade descrita para a espécie em tetraploides (BENNET e BASHAW, 1966). Embora tenha sido observadas irregularidades no pareamento a meiose pode ser considerada regular, visto que foram observadas tétrades ao final da divisão celular. Já o acesso BGP 486, da mesma espécie, embora tenha sido contado 40 cromossomos, não foi possível confirmar a configuração cromossômica por falta de material.

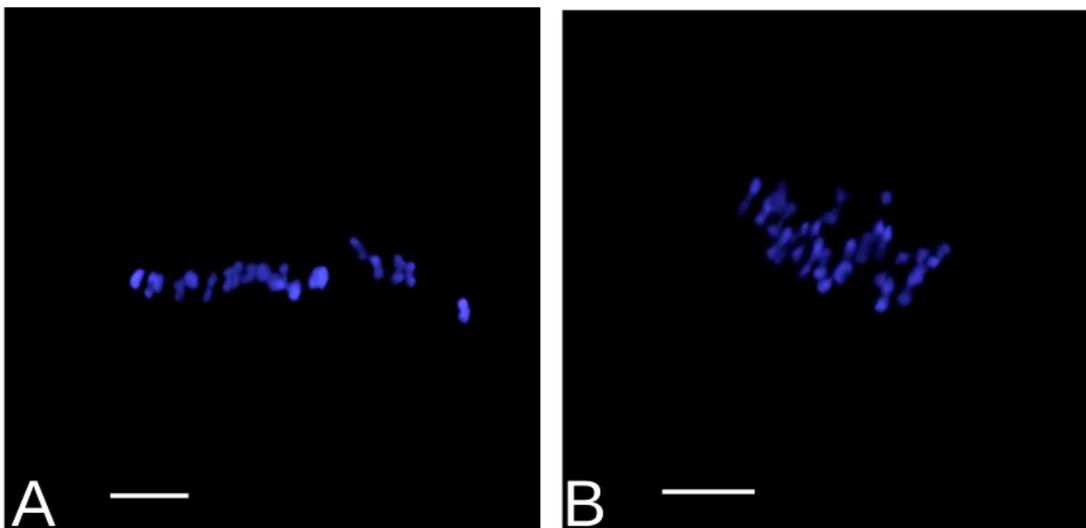
Como documentado na literatura, a poliploidia está associada a anormalidades meióticas (ORTIZ *et al.*, 2013) o que pode ser um indicativo de apomixia nas espécies analisadas. Em concomitância ao trabalho aqui descrito, as espécies descritas na Tabela 1 estão sendo analisadas por citometria de fluxo, técnica que possibilita confirmação de apomixia por análise do conteúdo de DNA (MCKINNON, K. M., 2018). Os dados da Tabela 3, Melaré, M. L. (2022 - em fase de elaboração), confirmam apomixia nos acessos BGP 289, 401, 436 e 486. Interessante ressaltar que nos acessos BGP 289 e BGP 486 apresentaram facultatividade na apomixia, corroborando com a literatura descrita para a espécie (BENNET e BASHAW, 1966; HOJSGAARD *et al.*, 2008). Os acessos BGP 210 e 337 que apresentaram regularidade meiótica e poliploidia demonstrada na Figura 3, foram caracterizados pela citometria como sexuais, sendo de grande interesse para o uso em cruzamentos futuros no programa de melhoramento.

Tabela 3: Modo de reprodução caracterizado por citometria de fluxo. Dados disponibilizados por Maria Luiza Melaré, 2022 – em fase de elaboração.

Acesso	Espécie	Modo de reprodução
BGP 401	<i>P. conjugatum</i>	apomítico
BGP 436	<i>P. dilatatum</i>	apomítico
BGP 289	<i>P. malacophyllum</i>	apomítico / apomítico facultativo
BGP 486	<i>P. malacophyllum</i>	apomítico / apomítico facultativo
BGP 210	<i>P. maritimum</i>	Sexual
BGP 337	<i>P. maritimum</i>	Sexual
BGP 149	<i>P. rojasii</i>	-

Além disso, entre as espécies tetraploides de *Paspalum* L. é documentado uma presença de alguns quadrivalentes, interpretados como resultado de alopoliploidia segmental (BURSON e BENNET, 1971; QUARÍN *et al.*, 1996). Contudo, segundo Sybenga (1996) tal característica não é um indicativo confiável de limitação na homologia, pois é comprovado que autopoliploides formam quadrivalentes com frequência menor em comparação ao que é teoricamente possível.

Figura 3: Acessos tetraplóides com predominância de regularidade na formação de 20 bivalentes. Imagens observadas pelo programa Fluorescence Imaging System no aumento de 100x, escala = 5 µm. A) BGP 210, *P. maritimum*, B) BGP 337, *P. maritimum*.



Entre os híbridos, as plantas 2, 37 e 285 apresentaram formação de 10 bivalentes, observados na Figura 4, demonstrando homologia entre as espécies. Sendo assim, o comportamento meiótico observado indica que as espécies partilham o complemento genômico básico, o qual possibilitou o pareamento cromossômico. Já entre as plantas tetraploides, todas advindas do cruzamento entre *P. compressifolium* x *P. lenticulare* ou o recíproco, apenas a planta 77 apresentou pareamento regular com formação de 20 bivalentes, nas demais plantas (89, 206 e 298) foi observada a predominância de 40 univalentes (Figura 5). Os híbridos com irregularidade no pareamento demonstraram baixa ou nenhuma viabilidade de pólen, observados pela Melaré, M. L (2022 – em fase de elaboração) em contraste com o híbrido 77 teve alta viabilidade de pólen. O comportamento meiótico dos híbridos inférteis pode ser resultante de falhas na manutenção ou formação das fibras do fuso, anormalidades meióticas que afetaram a fertilidade das plantas.

Figura 4: Híbridos caracterizados como diplóides usando DAPI, $2n=20$ A) Planta 2 com metáfase regular; B) Planta 37 em pró-metáfase, formação de 10 bivalentes. C) Planta 285 em pró-metáfase com 10 bivalentes. Imagens observadas pelo programa Fluorescence Imaging System no aumento de 100x.

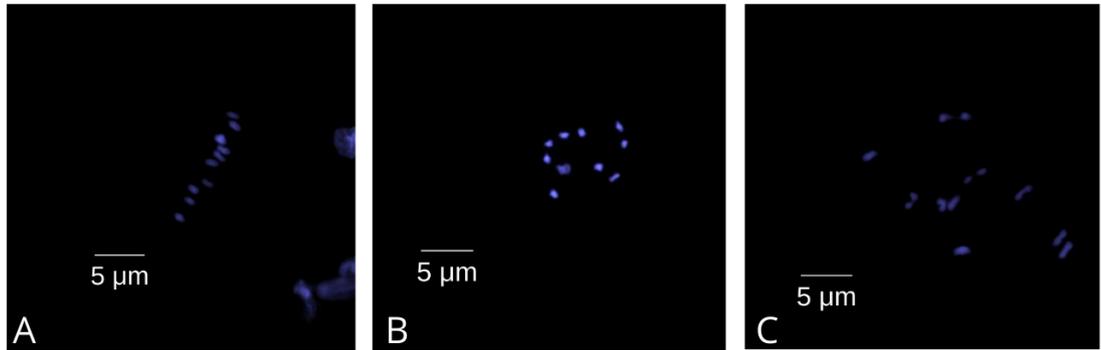
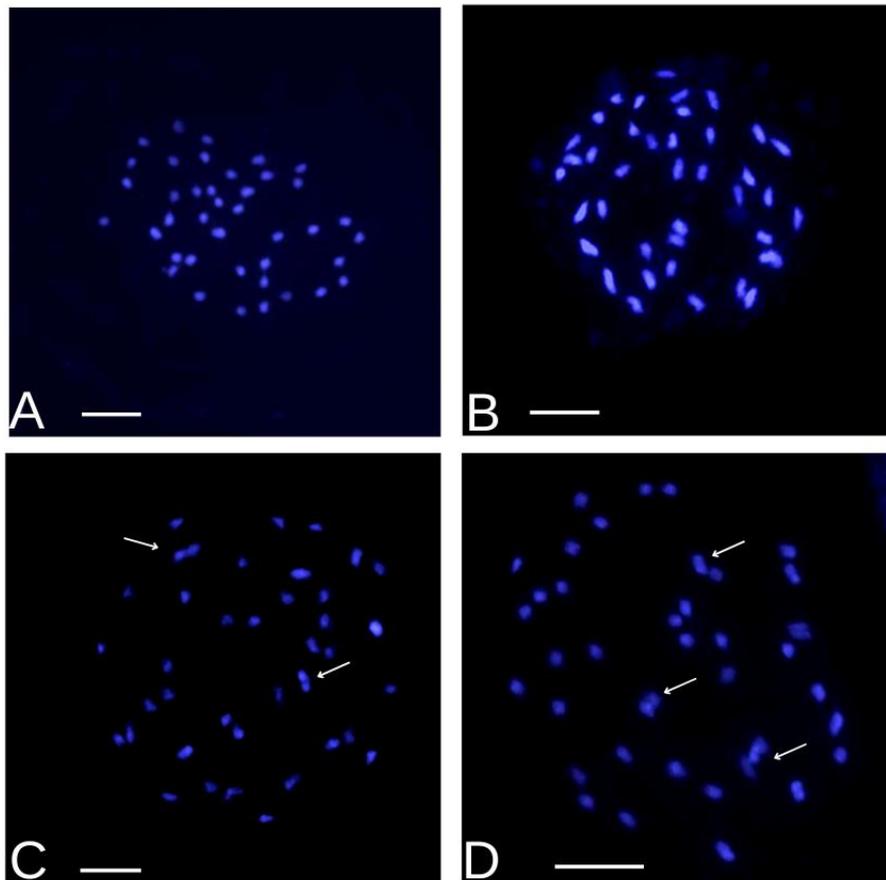


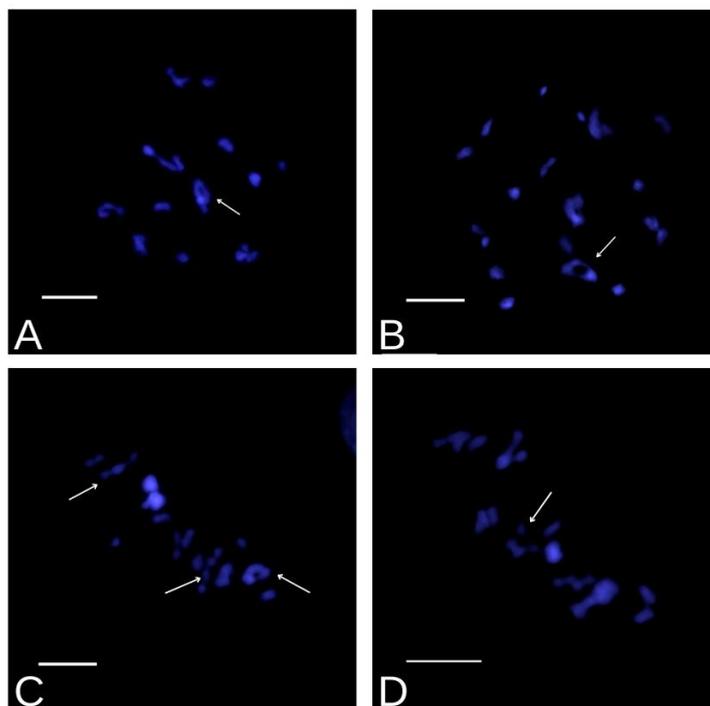
Figura 5: Plantas 89, 206, 298, metáfases caracterizadas usando DAPI. Imagens observadas pelo programa Isis Fluorescence Imaging System no aumento de 100x. A) Planta 206, 40 univalentes B) Planta 298, 40 bivalentes C) Planta 89, 36 univalentes e 2 bivalentes identificados com seta D) Plantas 89, associações multivalentes identificados por seta, 33 univalentes, 2 bivalentes e 1 trivalente.



Nos híbridos tetraploides, esperava-se observar a formação de quadrivalentes com o pareamento entre as espécies, como foi observado nos diplóides do mesmo cruzamento (plantas 2 e 37). No entanto, após o tratamento com colchicina obteve-se dois padrões: perda de homologia e predominância de assinapses, evidenciado nas plantas 89, 206 e 298, e

predominância de pareamento entre os cromossomos homólogos, observado na planta 77. Sabe-se que a colchicina, sendo um agente antimitótico, atua impedindo a polimerização das tubulinas e conseqüentemente a divisão celular, o que leva a duplicação do genoma (CAPERTA *et al.*, 2006). Por ser um agente mutagênico, a colchicina pode ter sido responsável por mutações em genes reguladores do pareamento cromossômico, impossibilitando assim a meiose regular. No trabalho de Aguilera *et al.* (2011) com o cruzamento entre as espécies *P. plicatulum* x *P. guenoarum*, ambas tetraploides, observou-se a formação de quadrivalentes e bivalentes. O comportamento observado por Aguilera *et al.* (2011) foi identificado na planta 77, com a formação de ao menos um quadrivalente na fase de pro-metáfase e metáfase, e presença de trivalentes e univalentes demonstrados na Figura 6. Faz-se necessária a compreensão dos mecanismos envolvidos na divisão celular meiótica a nível genômico para identificar a razão das diferenças encontradas entre os híbridos.

Figura 6: Híbridos tetraploides - Plantas 77, pro-metáfases e metáfases com pareamentos multivalentes, caracterizadas usando DAPI. Imagens observadas pelo programa Fluorescence Imaging System no aumento de 100x, escala = 5 µm. As associações quadrivalentes ocorreram em forma de anel e de ponta-a-ponta e estão identificadas pelas setas A-B) Quadrivalentes em forma de anel na pro-metáfase, C) Quadrivalentes de ponta a ponta e em formato de anel, D) Quadrivalente em forma de anel na metáfase.



A técnica utilizada para contagem cromossômica envolvendo o uso do DAPI contribuiu para individualização dos cromossomos de modo mais rápido e fácil em comparação ao método tradicional utilizando Carmim Acético. No entanto, para análise do

comportamento meiótico, o uso de DAPI limitou, em alguns casos, a identificação das fases da divisão celular, visto que corava exclusivamente os cromossomos. Sendo assim, após a contagem foi feita a análise das fases da divisão celular dos híbridos interespecíficos com o uso de carmim acético, tendo em vista que este corante se mostrou mais efetivo no contraste fornecido, em comparação ao DAPI.

5.2 Comportamento meiótico de híbridos tetraploides

Os híbridos tetraploides foram observados utilizando o carmim acético 1% para identificação das fases da divisão celular. A regularidade meiótica foi observada na planta 77, descrita na Figura 7, com a formação de tétrades ao final da meiose II. A viabilidade polínica foi observada por Melaré, M. L (2022 – em fase de elaboração) em torno de 70%, corroborando os resultados de meiose regular apresentados nesse trabalho. Entretanto, foram observadas algumas irregularidades como cromossomos retardatários nas fases de anáfase e telófase levando a formação de micronúcleos nas tétrades de algumas células (Figura 8), além de desbalanço na divisão dos cromossomos. As anormalidades meióticas observadas podem ser a causa da formação de grãos de pólen inviáveis ainda que em baixa frequência.

Figura 7: meiose regular Planta 77 k- 7, células coradas com carmim acético, observada em aumento de 80X pelo programa Axiovision. A-E) Meiose I, F-I) Meiose II. A) pro-metáfase I; B) metáfase I com 18 bivalentes e 1 quadrivalente em formação de placa metafásica; C) Anáfase I, D) Telófase I, E) diacinese; F) pro-metáfase II; G) metáfase II com a formação da placa metafásica; H) telófase II; I) formação de tétrades;

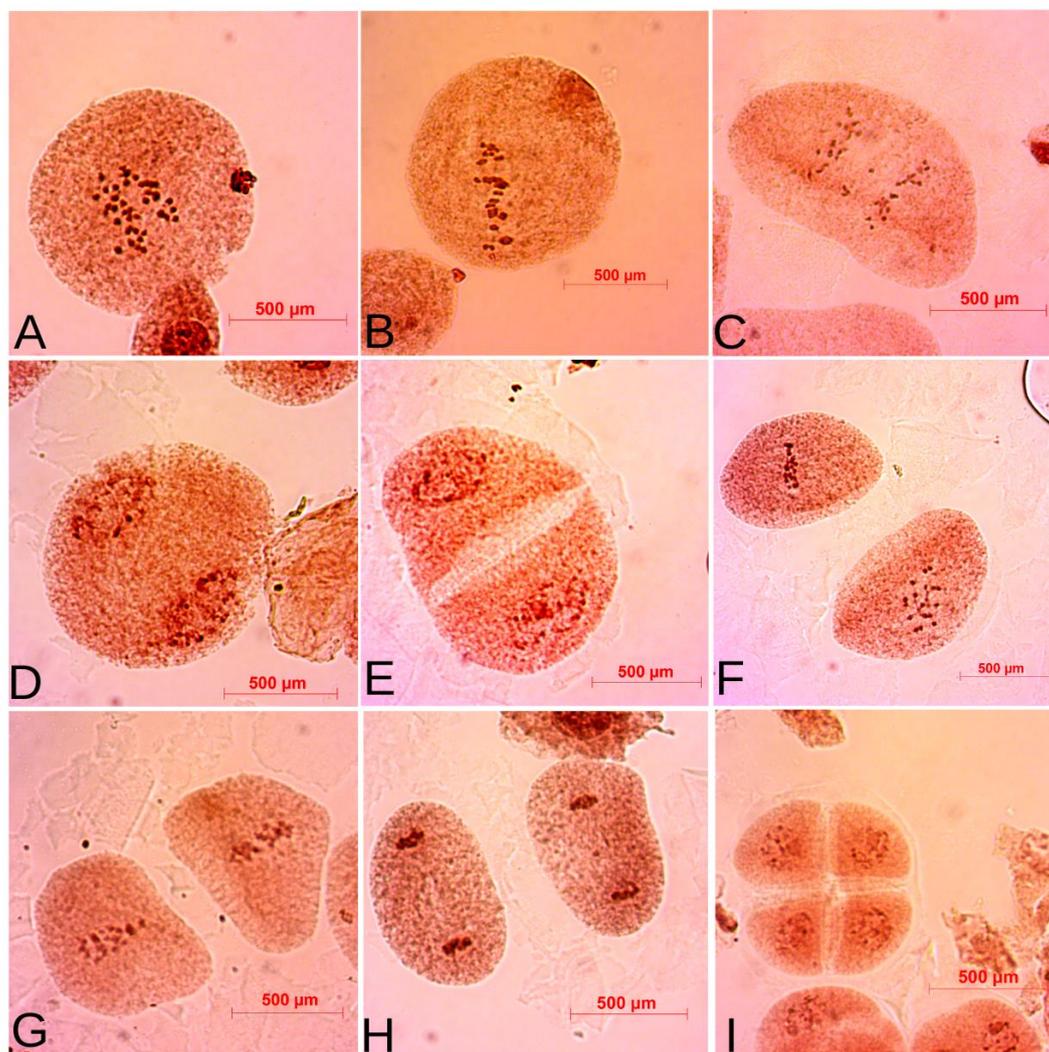
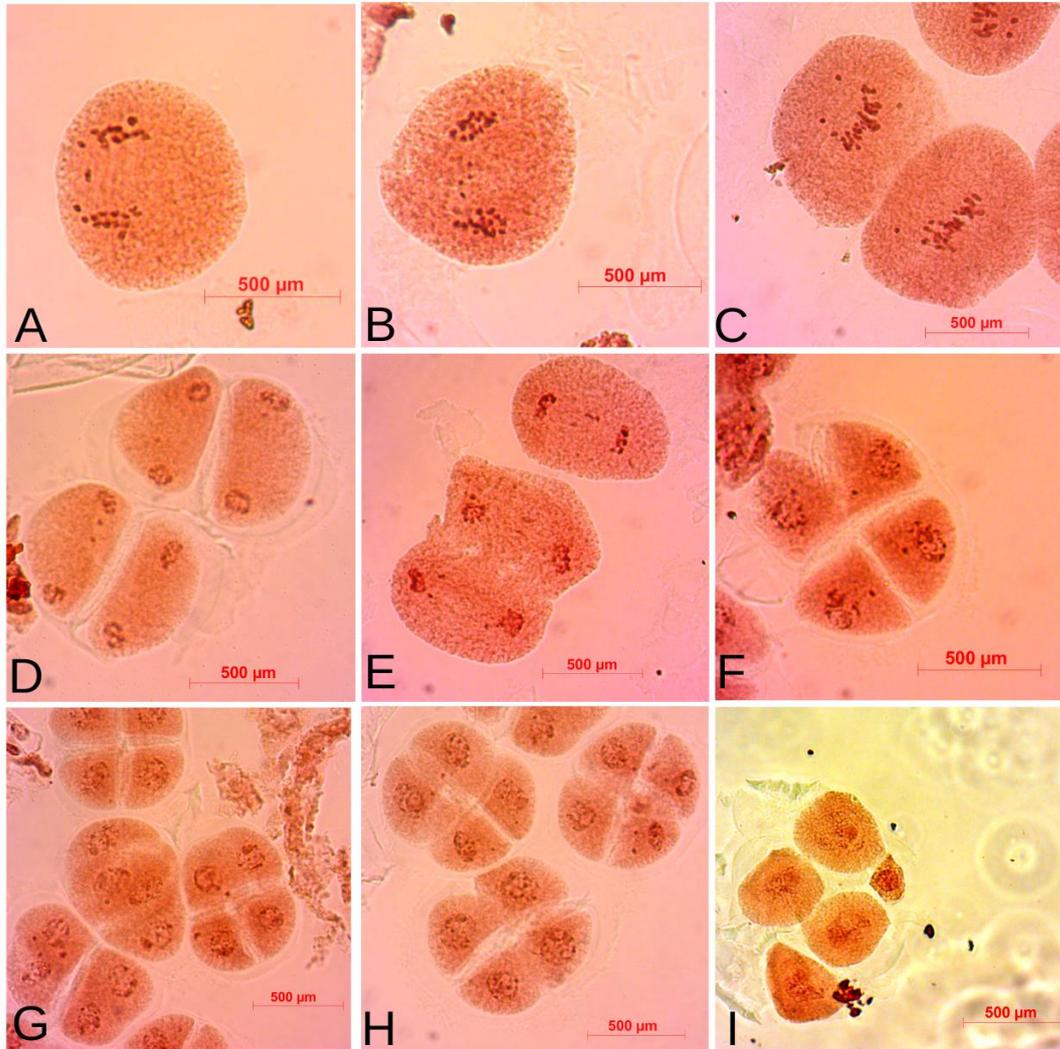


Figura 8: Irregularidades observada nas plantas 77, células coradas com carmim acético, observada em aumento de 80X pelo programa Axiovision. A-B) cromossomos retardatários na anáfase I, C) migração precoce de cromossomos e formação de placa irregular na metáfase II D-E) cromossomos retardatários na telófase II, F-H) micronúcleos nas tétrades e tétrades irregulares I) políade com células de tamanhos distintos



As plantas híbridas com baixa viabilidade de pólen apresentaram comportamento meiótico irregular. Foram observados problemas na diacinese resultando em células multinucleadas e políades demonstrados na figura 9. As anormalidades meióticas evidenciaram que a falha no pareamento cromossômico com a formação de univalentes pode ser devido a não formação de fibras do fuso visto que não houve segregação dos cromossomos nos polos. Acredita-se que a ação da colchicina pode ser uma das causas para a irregularidade meiótica, pois agentes antimitóticos causam mixoploidia como observado na figura 7i). As plantas 77 e 89 que são advindas do mesmo cruzamento, receberam o mesmo tratamento de colchicina, 0,5% de colchinha por 1h, e resultaram em comportamentos meióticos muito divergentes, enquanto as

plantas 206, com tratamento de colchicina na concentração 0,2% com DMSO 2% por 24hrs, e 298, com tratamento de colchicina na concentração de 0,1% com DMSO 2% por 24hrs, de cruzamento recíproco, apresentaram irregularidades semelhantes. O trabalho de Rocha *et al.* (2018) com *Lolium multiflorum* Lam, também pertencente à família *Poaceae*, demonstrou assincronia celular e formação de células binucleadas em tetraploides induzidos pelo tratamento com colchicina semelhantes aos observados no trabalho em questão. Além disso, a planta 206 apresentou citomixia (Figura 9-D), fenômeno caracterizado por transferência cromossômica por conexões citoplasmáticas (GAUTAM & KUMAR, 2013). O trabalho de Gautum & Kumar (2013) demonstrou citomixia em plantas tratadas com colchicina, evidenciada em diferentes fases afetando a fertilidade do pólen. Logo, é possível que haja um efeito da colchicina na alteração do comportamento meiótico e fertilidade dos híbridos tetraploidizados, entretanto, maiores estudos para compreensão da atuação da colchicina são necessários, principalmente com maior quantidade de plantas para análise estatística. Outra hipótese relacionada às anormalidades observadas é a reorganização nos núcleos pós-poliploidização. Uma vez que as espécies envolvidas no cruzamento podem apresentar complementariedade genômica básica, evidenciado no pareamento nas plantas híbridas diploides, a presença de genes duplicados pode levar a possível perda de DNA e inativação de sinais envolvidos na meiose (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). As tabelas 4 e 5 sintetizam os resultados encontrados a respeito da ploidia e comportamento meiótico observado nos acessos e híbridos de *Paspalum* L.

Figura 9: Irregularidades observada nas plantas 89, 206 e 298, células coradas com carmim acético, observada em aumento de 80X pelo programa Axiovision. A) Planta 89 com desbalanceamento dos cromossomos em anáfase I, B) Planta 206 com citomixia,

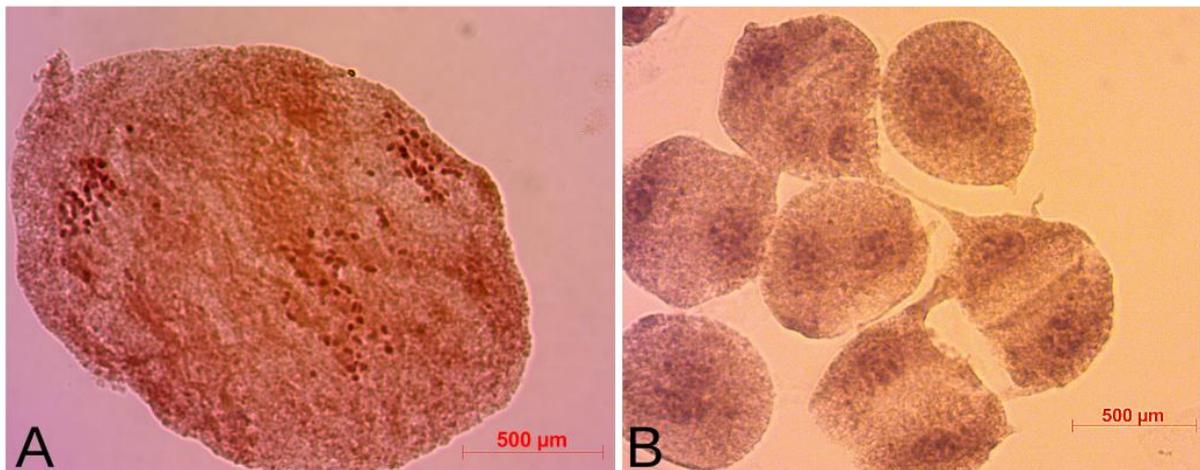


Tabela 4. Ploidia e comportamento meiótico de acessos de espécies de *Paspalum* L.,

Acesso	Espécie	n° de células	2n	Pareamento cromossômico	Meiose
BGP 272	<i>P. rojasii</i>	10	20	10 bivalentes	regular
BGP 380	<i>P. lenticulare</i>	10	20	10 bivalentes	regular
BGP 281	<i>P. compressifolium</i>	10	20	10 bivalentes	regular
BGP 149	<i>P. rojasii</i>	4	40	10 a 13 univalentes; 9 a 14 bivalentes; 1 a 3 trivalentes;	irregular
BGP 210	<i>P. maritimum</i>	10	40	20 bivalentes	regular
BGP 289	<i>P. malacophyllum</i>	10	40	20 bivalentes	regular
BGP 337	<i>P. maritimum</i>	10	40	20 bivalentes	regular
BGP 401	<i>P. conjugatum</i>	4	40	8 a 10 univalentes 15 a 16 bivalentes	irregular
BGP 436	<i>P. dilatatum</i>	5	-	-	-
BGP 486	<i>P. malacophyllum</i>	10	40	-	-

Tabela 5. Ploidia e comportamento meiótico de plantas híbridas de *Paspalum* L.,

Planta híbrida	Cruzamento	n° de células	2n	Pareamento cromossômico	Meiose
Pl. 2	BGP 380 x BGP 281	10	20	10 bivalentes	regular
Pl. 37	BGP 380 x BGP 281	10	20	10 bivalentes	regular
Pl.77 h-8	BGP 281 x BGP 380	20	40	16 bivalentes 1 quadrivalente	regular
Pl. 77 k-1	BGP 281 x BGP 380	20	40	16 bivalentes 1 quadrivalente	regular
Pl. 77 k-7	BGP 281 x BGP 380	20	40	16 bivalentes 1 quadrivalente	regular
Pl. 77 n-1	BGP 281 x BGP 380	20	40	16 bivalentes 1 quadrivalente	regular
Pl. 77 n-10	BGP 281 x BGP 380	20	40	16 bivalentes 1 quadrivalente	regular
Pl. 89 e-1	BGP 281 x BGP 380	20	40	38 a 40 univalentes 1 bivalente	irregular
Pl. 89 e-2	BGP 281 x BGP 380	20	40	38 a 40 univalentes	irregular

				1 bivalente	
Pl. 89 i-1	BGP 281 x BGP 380	20	40	36 a 40 univalentes 2 bivalentes	irregular
Pl. 89 i-10	BGP 281 x BGP 380	20	40	33 a 40 univalentes 2 bivalentes 1 trivalente	irregular
Pl. 89 m-1	BGP 281 x BGP 380	20	40	40 univalentes	irregular
Pl. 89 m-6	BGP 281 x BGP 380	20	40	40 univalentes	irregular
Pl. 206	BGP 380 x BGP 281	20	40	40 univalentes	irregular
Pl. 285	BGP 272 x BGP 281	10	20	10 bivalentes	regular
Pl. 298	BGP 380 x BGP 281	20	40	20 bivalentes	Irregular

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para confirmação e revisão da ploidia e comportamento meiótico de diferentes espécies e híbridos pertencentes ao gênero *Paspalum*. Cinco acessos foram considerados tetraploides, sendo três acessos com meiose regular. Todos os híbridos interespecíficos tetraploidizados artificialmente possuíram 40 cromossomos, sendo um deles com meiose regular e os três restantes com meiose irregular. A regularidade meiótica observada nos acessos BGP 210, 337 e 289 é de grande interesse para uso nos programas de melhoramento genético. O híbrido regular, sendo fértil, poderá seguir no programa de melhoramento.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados oriundos deste trabalho poderão direcionar a seleção das plantas híbridas e acessos para uso em cruzamento dentro do programa de melhoramento. Além disso, para maior compreensão a respeito dos mecanismos genéticos envolvidos na divisão celular das plantas híbridas, uma alternativa é o uso de técnicas de hibridização fluorescente *in situ* para investigar a origem parental dos cromossomos e sua influência nas irregularidades observadas.

8. REFERÊNCIAS

- ACUÑA, Carlos A. *et al.* Reproductive systems in *Paspalum*: Relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques, and adoption of released cultivars. **Frontiers in Plant Science**, p. 1377, 2019.
- ADAMOWSKI, Eleniza de Victor; PAGLIARINI, Maria Suely; BATISTA, Luiz Alberto Rocha. Chromosome number and microsporogenesis in *Paspalum maritimum* (Caespitosa Group; Gramineae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 301-305, 2000.
- AGÊNCIA BRASIL. Disponível em: [Censo Agropecuário: Brasil tem 5 milhões de estabelecimentos rurais | Agência Brasil \(ebc.com.br\)](https://censobrasil.gov.br/), Acesso em 15 de julho de 2022.
- AGUILERA, Patricia M. *et al.* Interspecific tetraploid hybrids between two forage grass species: sexual *Paspalum plicatulum* and apomictic *P. guenoarum*. **Crop Science**, v. 51, n. 4, p. 1544-1550, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Perfil da Pecuária no Brasil. **Relatório Anual 2022** Disponível em: <[Receita com as exportações brasileiras de carne bovina cresce 52% no primeiro semestre – ABIEC](https://www.abiec.org.br/)>. Acesso em 15 de julho de 2022
- BARRETO, I. L. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. 258f. **Tese de Doutorado. Tese (Livre Docência)** -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 1974
- BATISTA, LAR; GODOY, R. Aspectos vegetativos da biodiversidade do gênero *Paspalum*. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência** v. 45, p. 870, 1993.
- BATISTA, Luiz Alberto Rocha; REGITANO NETO, A. Espécies do gênero *Paspalum* com potencial forrageiro. In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Semana do Estudante, 13., p. 59-71, São Carlos, SP., 1999.
- BASHAW, E. C.; HOLT, E. C. Megasporeogenesis, Embryo Sac Development and Embryogenesis in Dallisgrass, *Paspalum Dilatatum*, Poir 1. **Agronomy Journal**, v. 50, n. 12, p. 753-756, 1958.
- BENNETT, Hugh W.; BASHAW, E. C. Interspecific Hybridization with *Paspalum* spp. 1. **Crop Science**, v. 6, n. 1, p. 52-54, 1966.
- BURTON, Glenn W. Observations on the flowering habits of four *Paspalum* species. **American Journal of Botany**, p. 843-848, 1942.
- BURTON, Glenn W. Conventional Breeding of Dallisgrass, *Paspalum dilatatum* Poir 1. **Crop Science**, v. 2, n. 6, p. 491-494, 1962.
- BURTON, Glenn W. A search for the origin of *Pensacola* Bahia grass. **Economic Botany**, v. 21, n. 4, p. 379-382, 1967.
- BURSON, Byron L.; BENNETT, Hugh W. Chromosome Numbers, Microsporogenesis, and Mode of Reproduction of Seven *Paspalum* Species 1. **Crop Science**, v. 11, n. 2, p. 292-294, 1971.
- BURSON, Byron L. Genome relationships between tetraploid and hexaploid biotypes of dallisgrass, *Paspalum dilatatum*. **Botanical Gazette**, v. 152, n. 2, p. 219-223, 1991.
- BURSON, & HUSSEY, M. A. Plant exploration: the foundation for *Paspalum* improvement. In: Proceedings of the Thirty-Seventh Grass Breeders' Work Planning Conference, Moscow, Idaho, USA/Pullman, **Western Regional Plant Introduction Station**. p. 26-34, 2004
- CAPERTA, A. D.; DELGADO, M.; RESSURREIÇÃO, F.; MEISTER, A.; JONES, R. Neil; VIEGAS, W.; HOUBEN, Andreas. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, v. 227, n. 2-4, p. 147-153, 2006
- CHASE, A. *et al.* The North American species of *Paspalum*. **The North American species of Paspalum.**, n. 28, p. 46-52, 1929.

- CHUAN, YING. Megasporogenesis and megagametogenesis in *Paspalum commersonii* and *P. longifolium* at two polyploid levels. **Pascal and Francis Bibliographic Databases** v. 127; n. 2; p. 267-275; 1974.
- DALL'AGNOL, M. *et al.* Perspectivas de lançamento de cultivares de espécies forrageiras nativas: o gênero *Paspalum*. **Anais do Simpósio de Forrageiras e Produção animal**, v. 1, p. 147-160, Porto Alegre, 2006.
- DALL'AGNOL, M.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Apomixia, genética e melhoramento de plantas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11. n. 2, p.127-133, 2005.
- DE CARVALHO, R., da Silva, K. V. P., de OLIVEIRA, I. F., & Alves, A. A. C *et al.* Citogenética como Ferramenta para o Melhoramento Genético Vegetal: Análise mitótica e meiótica em Espécies de *Manihot*. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, p. 645-650, 2009.
- DIAS-FILHO, M.B. Diagnóstico das pastagens no Brasil-. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. 36p. **Documentos**, **402**, 2014
- DIAS-FILHO, Moacyr Bernardino; DE ANDRADE, C. M. S. Pastagens no Trópico Úmido. -. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 30p. **Documentos**, **241**, 2006
- DOMBROWSKI, L.T.D. Gramíneas do Paraná, Londrina, IAPAR **Boletim técnico / Fundação Instituto Agrônômico do Paraná**; no. 28, 1989
- ESPINOZA, F., URBANI, M. H., MARTÍNEZ, E. J., & QUARIN, C. L., F. *et al.* The breeding system of three *Paspalum* species with forage potential. **Tropical Grasslands**, v. 35, n. 4, p. 211-217, 2001.
- ESPINOZA, Francisco; QUARÍN, Camilo L. Cytoembryology of *Paspalum chaseanum* and sexual diploid biotypes of two apomictic *Paspalum* species. **Australian Journal of Botany**, v. 45, n. 5, p. 871-877, 1997.
- EVERS, Gerald W.; BURSON, Byron L. Dallisgrass and other *Paspalum* species. **Warm-season (C4) grasses**, v. 45, p. 681-713, 2004.
- FREITAS, Patricia M. De *et al.* Evaluation of meiotic behavior in polyploid accessions of *Paspalum* (Plicatula group). **Nucleus-Calcutta-International Journal of Cytology**, v. 40, n. 1, p. 47-52, 1997.
- GAUTAM, Neelam; KUMAR, G. Consequences of colchicine induced intermeiocyte connections in *Helianthus annuus*. **Caryologia**, v. 66, n. 1, p. 65-69, 2013.
- GONÇALVES, T. M., VIGNA, B. B. Z., AZEVEDO, A. L. S., FERREIRA, J. R. G., POZZOBON, M. T., & FÁVERO, A. P. Reproductive mode and DNA content of *Paspalum* accessions from Plicatula group: Reproduction and DNA content of *Paspalum*. **Flora**, v. 279, p. 151810, 2021
- GOUVEA, A.P.M.L. VALLS, J. F. M., & OLIVEIRA, R. C. D. *Paspalum* (Poaceae) das formações savânicas e campestres do Parque Ecológico Bernardo Sayão, Distrito Federal, Brasil. **Rodriguésia**, 71 (Impresso), 71:1-19, 2020.
- GUERRA, M.; SOUZA, MJ de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, v. 201, 2002.
- GUERRA, M.; Chromosome numbers in plant cytotoxicity: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome research**, v. 120, n. 3-4, p. 339-350, 2008.
- HARRIMAN, Neil A. Revisión de las Especies de *Paspalum* para América del Sur Austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay, y Uruguay). **Economic Botany**, v. 59, n. 3, p. 304-304, 2005.
- HOJSGAARD, D., SCHEGG, E., VALLS, J. F., MARTÍNEZ, E. J., & QUARIN, C. L. Sexuality, apomixis, ploidy levels, and genomic relationships among four *Paspalum* species of the subgenus Anachyris (Poaceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 203, n. 7, p. 535-547, 2008.
- GÖRTS-VAN-RIJN, A. R. A.; JUDZIEWICZ, E. J. Flora of the guianas. Série A: **Phanerogams, Fascicle 5**. 187. Poaceae (Gramineae). 1990.

- LIU, Jingjing; QU, Li-Jia. Meiotic and mitotic cell cycle mutants involved in gametophyte development in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 1, n. 4, p. 564-574, 2008.
- MA, G., HUANG, X., XU, Q., & BUNN, E. Multiporate pollen and apomixis in Panicoideae. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2073-2082, 2009.
- MACIEL, Jefferson Rodrigues; OLIVEIRA, Regina Célia de; ALVES, Marccus. *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 1145-1161, 2009.
- MARTÍNEZ, Eric J.; QUARÍN, Camilo L. Citoembriología y comportamiento reproductivo de un citotipo diploide de *Paspalum hydrophilum* y sus híbridos con *P. palustre* (Poaceae, Paniceae). **Darwiniana**, p. 243-251, 1999.
- MORRONE, O., DENHAM, S. S., ALISCIONI, S. S., & ZULOAGA, F. O. Revisión de las especies de *Paspalum* (Panicoideae: Paniceae), subgénero *Anachyris*. **Revista Candollea Conservatoire et Jardin Botaniques Ville Genève**, P. 105-135, 2000.
- MORRONE, Osvaldo. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.
- MUNIZ, M *et al.* Citogenética. Florianópolis, 2009. Disponível em: <[Citogenética - Laura.indb \(ufsc.br\)](#)>. Acesso em 25 de julho de 2022.
- MCKINNON, K. M. Flow cytometry: An overview. **Current Protocols in Immunology**, 120, 5.1.1, 2018
- NOGUEIRA, Lucas. Quando e como usar as forrageiras em seu sistema de produção. Acesso em: 12/10/2022. Disponível em: <[Forrageiras: Quando e como usá-las em seu sistema de produção \(aegro.com.br\)](#)> 2020.
- ORTIZ, J.P.A., Quarin, C.L., Pessino, S.C., Acuna, C., Martinez, E.J., Espinoza, F., Hojsgaard, D.H., Sartor, M. E., Caceres, M.E., and Pupilli, F. 2013. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 767-787, 2013.
- PAGLIARINI MS, Citogenética Aplicada ao Melhoramento. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento - Plantas** (Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC, eds.). Fundação MT, Rondonópolis, 871-910, 2001
- PIMENTA, Karena Mendes; DÓREA, Marcos da Costa; OLIVEIRA, Reyjane Patrícia de. Panicoideae (Poaceae) em remanescentes florestais do sul da Bahia: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Rodriguésia**, v. 63, p. 933-955, 2012.
- POZZOBON, Marisa Toniolo; VALLS, José Franciso Montenegro; SANTOS, Sileuza dos. Contagens cromossômicas em espécies brasileiras de *Paspalum* L. (Gramineae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, p. 151-162, 2000.
- POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Caracterização citogenética em acessos de germoplasma de espécies brasileiras de *Paspalum* (Gramineae). **Encontro Internacional sobre melhoramento genético de Paspalum**. Anais., Nova Odessa. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 73-8, 1987.
- PRITCHARD, A. J. The cytology and reproduction of *Paspalum yaguaronense* (Henr). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 2, p. 206-211, 1962.
- QUARÍN, C. L.; POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Cytology and reproductive behavior of diploid, tetraploid and hexaploid germplasm accessions of a wild forage grass: *Paspalum compressifolium*. **Euphytica**, v. 90, n. 3, p. 345-349, 1996.
- QUARIN, C. L. The nature of apomixis and its origin in Panicoid grasses. **Apomixis Newslt.**, v. 5, p. 8-15, 1992.
- QUARÍN, Camilo L.; BURSON, Byron L. Cytology of sexual and apomictic *Paspalum* species. **Cytologia**, v. 56, n. 2, p. 223-228, 1991.

- RUA, Gabriel H. *et al.* Four new species of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae) from Central Brazil, and resurrection of an old one. **Systematic Botany**, v. 33, n. 2, p. 267-276, 2008.
- SCATAGLINI, María A. *et al.* Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) based on plastid and nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 5, p. 1051-1070, 2014
- SCHIFINO-WITTMANN, Maria T, Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira Agrociência**, v.10, n. 2, p. 151-157, abr-jun, 2004.
- SINGH, Ram J. **Cytogenetics in Plant Breeding**. 2^o edição, Boca Raton, Florida 2003;
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; SILVA, L.C.; REIS, D.S.S.; SUDRÉ, C.P. Karyotype of Six *Passiflora* Species Collected in the State of Rio de Janeiro. **Cytologia**. 68:165-171, 2003.
- STEINWAND, M.A., RONALD, P.C. Crop biotechnology and the future of food. **Nature Food** 1, 273–283 (2020).
- SYBENGA, J. Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? **Genome**, v. 39, n. 6, p. 1176-1184, 1996.
- SUMNER AT, Chromosomes: Organization and function. Malden, **Blackwell Science**. 286p. 2003
- URBANI, Mario Hugo *et al.* Cytogeography and reproduction of the *Paspalum* simplex polyploid complex. **Plant Systematics and Evolution**, v. 236, n. 1, p. 99-105, 2002.
- VAIO, Magdalena *et al.* Effects of the diploidisation process upon the 5S and 35S rDNA sequences in the allopolyploid species of the Dilatata group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Australian Journal of Botany**, v. 67, n. 7, p. 521-530, 2019.
- Valls, J. F. M. O potencial de plantas forrageiras tropicais americanas. In: **Anais do Simpósio Brasileiro de Forrageiras e Pastagens**. CBNA, Campinas, Pp. 11-24, 1994
- VALLE C. B.; PAGLIARINI M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of Brachiaria. In: Singh RJ (Ed.) **Genetic resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement**. v. 5. Boca Raton, CRC Press. p. 103, 2009
- Valls, J.F.M.; Maciel, J.R.; Sousa, M.W.D.S.; Oliveira, R.C.; Pimenta, K.M.; Rua, G.H. *Paspalum* L. in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13432>>. Acesso em: 25 jul. 2022
- WILLIAMS, W. M.; WILLIAMSON, M. L.; REAL, D. *Paspalum*. In: **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 197-216, 2011.
- ZIMMER, Ademir Hugo *et al.* Degradação, recuperação e renovação de pastagens. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, **Documentos**, 189, 2012.
- ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 102, p. 1-297, 2005.