

ELISANGELA MENDES DOS SANTOS

**MICROSPOROGÊNESE EM *BRACHIARIA BRIZANTHA* (POACEAE):  
ANÁLISE DE ACESSOS POLIPLÓIDES**

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
JUNHO – 2009

ELISANGELA MENDES DOS SANTOS

**MICROSPOROGÊNESE EM *BRACHIARIA BRIZANTHA* (POACEAE):  
ANÁLISE DE ACESSOS POLIPLÓIDES**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ  
PARANÁ - BRASIL  
JUNHO- 2009



*"Está certo que nos momentos de crise é que se cresce. Mas já estou batendo a cabeça no teto."*

*Mário Cury*

*Dedico:*

*À minha família que, com um sorriso ou um olhar, deixou-me protegida,  
impedindo-me de desistir, mesmo que quase sem forças.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que se fez presente em cada momento desta caminhada, iluminando-me nos momentos mais distintos, dos quais só o SENHOR sabe!

À Santa Terezinha do Menino Jesus, que sobre mim fez cair muitas rosas!

À minha mãe, a senhora Maria Batista, pela grandeza, sabedoria, fortaleza, humildade e dedicação a mim e a minha família. Sem ela, certamente, eu seria menor.

À Universidade Estadual de Maringá e Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, por possibilitar este curso de pós-graduação.

À Emprapa Gado de Corte, pela oportunidade de execução deste trabalho.

À UNIPASTO, pelos recursos financeiros destinados ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de estudos, possibilitando o desenvolvimento do meu trabalho.

À minha orientadora, professora doutora Maria Suely Pagliarini, pelo voto de credibilidade em meu trabalho, pelo apoio em todos os momentos, pela confiança em mim depositada desde o início, e ao crescimento inestimado concedido em todos setores de minha vida.

À professora doutora Cacilda Borges Valle, pela concessão do material analisado, e pela co-orientação.

Ao Joel Valdez Ramos, pela sabedoria, companhia e carinho nos momentos que me sentia só e infeliz.

Ao amigo e anjo, Claudemir de Souza, que me fez crer que esse sonho é possível.

Aos amigos: Alice, Ana Flávia, Boris, Carlos Alexandre, Francisco, Freddy, Gléia, Cleide, Marcelo, Mariana, Michele, Veridiana, Virgílio, Viviane, Valquíria e Zilvani que contribuíram, e muito, em meu crescimento pessoal e profissional.

À técnica do Laboratório de Citogenética Vegetal, Neide da Silva, pela dedicação, amizade e pela preparação dos materiais utilizados em meus experimentos.

A todos os que caminharam comigo durante este tempo, uns lado a lado, outros não tão perto, mas todos com a mesma importância nesta trajetória.

## **BIOGRAFIA**

Elisangela Mendes dos Santos, filha de Jadir Mendes dos Santos e Maria Batista, nasceu 05 de novembro de 1981, na cidade de Santa Cruz do Rio Pardo, São Paulo.

Em 1988, iniciou o Ensino Fundamental na Escola Municipal Rural Professora Núbia Pereira Zuliani, no município de Santa Cruz do Rio Pardo, concluindo-o no ano de 1995.

O Ensino Médio, iniciado em 1996 no Colégio Estadual Dr. Miguel Priante Calderaro, na cidade de Bernardino de Campos, foi concluído na mesma instituição de ensino no ano de 1998.

Em 1999, iniciou o curso Técnico em Turismo pelo Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza e concluiu o mesmo em 2000.

Ingressou, em 2003, no curso de Ciências Biológicas das Faculdades Integradas de Ourinhos, diplomando-se em 2006.

Durante a graduação, trabalhou em cultivo de flores no Orquidário Santa Cruz, onde teve o primeiro contato com Melhoramento Genético.

Em março de 2007, matriculou-se no curso de mestrado em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá.



## ÍNDICE

RESUMO .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Origem e Introdução da <i>Brachiaria brizantha</i> no Brasil .....	4
2.2. Principais Características Morfológicas de <i>Brachiaria brizantha</i> .....	5
2.3. Bancos de Germoplasma de <i>Brachiaria</i> .....	6
2.4. Produção de Semente e Importância Econômica .....	7
2.5. Principais Doenças e Pragas.....	7
2.6. Citogenética de <i>Brachiaria</i> .....	8
2.6.1. Número Básico de Cromossomos no Gênero <i>Brachiaria</i> .....	9
2.6.2. Número de Cromossomos e Nível de Ploidia no Gênero <i>Brachiaria</i> .....	9
2.6.3. Aspectos do Comportamento Meiótico em Acessos de <i>Brachiaria</i> .....	10
2.6.3.1. Aspectos do Comportamento Meiótico em Híbridos de <i>Brachiaria</i> .....	11
2.7. Modo de Reprodução em <i>Brachiaria</i> .....	12
2.7.1. Vantagens da Apomixia .....	13
2.8. Aspectos do Melhoramento de <i>Brachiaria</i> .....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Material .....	15
3.2. Métodos.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1. Número de Cromossomos e Nível de Ploidia .....	17
4.2. Anormalidades meióticas .....	18
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

## RESUMO

SANTOS, Elisangela Mendes dos. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, maio de 2009. **Microsporogênese em *Brachiaria brizantha* (Poaceae): análise de acessos poliplóides**. Orientadora: Maria Suely Pagliarini. Co-orientadora: Cacilda Borges do Valle.

Por apresentar várias características agrônômicas desejáveis, *Brachiaria brizantha* é a espécie melhor representada no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. Acessos desta espécie tem sido alvo não apenas de seleção direta para a produção de novas cultivares como também de hibridização interespecífica. Todavia, somente acessos tetraplóides e com meiose estável podem ser utilizados como genitores masculinos em cruzamentos. O objetivo deste trabalho foi, por meio da análise meiótica, determinar o número cromossômico, o nível de ploidia e o comportamento meiótico de acessos desta espécie como um subsídio ao programa de melhoramento em andamento na Embrapa Gado de Corte. Dentre os 21 acessos analisados citogeneticamente por metodologia convencional, 15 eram tetraplóides ( $2n=36$ ), quatro, pentaplóides ( $2n=45$ ), e dois, hexaplóides ( $2n=54$ ), todos derivados de  $x=9$ . Anormalidades meióticas foram observadas em todos os acessos, porém frequências variáveis. Anormalidades típicas de poliplóides, como ascensão precoce de cromossomos para os pólos, cromossomos retardatários e formação de micronúcleos foram as anormalidades mais comuns. Fusão celular, citomixia, aderência cromossômica e citocinese irregular também foram encontradas entre os acessos. Todas as anormalidades meióticas encontradas comprometem a viabilidade polínica. Assim, dentre os acessos analisados, alguns deles, por apresentarem frequência de anormalidades meióticas relativamente baixas, podem ser indicados para atuarem como doadores de pólen em cruzamentos intra- ou interespecíficos no programa de melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha*, meiose, poliploidia.

## ABSTRACT

SANTOS, Elisangela Mendes dos. M. Sc. State University of Maringá. M. Sc. May, 2009. **Microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Poaceae): analysis of polyploid accessions**. Adviser: Maria Suely Pagliarini. Committee Member: Cacilda Borges do Valle.

*Brachiaria brizantha* is one of the most promising *Brachiaria* species and is the best represented in the *Brachiaria* germplasm collection available at Embrapa Beef Cattle. Accessions of this species are under evaluation not only for the production of new cultivars but also to be used for interspecific hybridization. However, only tetraploid accessions ( $2n=36$ ) with high meiotic stability can be used as pollen donors in crosses. Thus, the objective of this research was to determine the chromosome number, the ploidy level and the meiotic behavior, through conventional methodology, of some accessions of this species as a subsidy to the breeding program underway at Embrapa Beef Cattle. Among the 17 accessions analyzed, 13 were tetraploid ( $2n=36$ ), two, pentaploid ( $2n=45$ ), and two, hexaploid ( $2n=54$ ), all derived from  $x=9$ . Meiotic abnormalities were recorded in all the accessions, but in variable frequencies. Abnormalities typical of polyploids, such as precocious chromosome migration to the poles and laggard chromosomes leading to micronuclei formation were the most common, but cell fusion, cytomixis, chromosome stickiness and irregular cytokinesis were also recorded among accessions. All the abnormalities recorded compromise pollen viability. Thus, among the accessions analyzed, some of them, by presenting low frequency of meiotic abnormalities, could be indicated to act as pollen donor in intra or interspecific crosses in the *Brachiaria* breeding program.

Key words: *Brachiaria brizantha*, meiosis, polyploidy

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Brachiaria*, amplamente distribuído no continente africano, conta com cerca de 100 espécies, dentre as quais, algumas apresentam grande potencial como planta forrageira. Espécies desse gênero são importantes gramíneas forrageiras nos países tropicais e subtropicais (Bogdan, 1977). A produção de carne, couro e leite no Brasil se faz quase que exclusivamente a pasto. As forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* são as mais cultivadas no país e apresentam grande importância, quando são observadas as extensas áreas cultivadas e o intenso comércio de sementes. Fernandes et al. (2000) estimaram que mais de 80% das pastagens cultivadas no Brasil são constituídas por cultivares destas forrageiras e os capins do gênero *Brachiaria* são fundamentais na engorda de gado, pois viabilizam a pecuária em solo ácidos e fracos.

Por apresentar grande importância para a pecuária dos trópicos, uma extensa coleta de germoplasma foi realizada na África pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colômbia), na década de 80, e resultou em uma coleção com cerca de 800 acessos, pertencentes a 24 espécies (Keller-Grein et al., 1996). Parte dessa coleção foi transferida para o Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen/Embrapa) e, após quarentena, enviada ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte/Embrapa, onde é mantida em parcelas no campo.

Algumas cultivares de *Brachiaria* encontram-se disponíveis no mercado de forrageiras. Dentre elas, 1) Piatã, Xaraés, Marandu, Arapoty e Capiorã (sendo essas duas últimas somente registradas mas não liberadas para o comércio), são cultivares de *B. brizantha*; 2) Tupi e Llanero, que são cultivares de *B. humidicola*; e 3) Basilisk e Ipean, de *B. decumbens*. Todas estas cultivares foram obtidas da variabilidade genética natural existente entre os acessos do banco de germoplasma. A produção de variedades híbridas está dentro dos objetivos do programa de melhoramento de *Brachiaria* desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte. *Brachiaria brizantha*, também conhecida como “brizantão”, “brizantha”, “capim

braquiária”, “braquiarão”, “capim marandu” e “Marandu”, espalhou-se rapidamente por todo o trópico americano. No Brasil, é considerada por muitos como uma espécie nativa, pois se encontra muito difundida no Centro-Oeste brasileiro, onde tem a preferência da maioria dos agropecuaristas, por apresentar boa adaptabilidade a solos ácidos, agressividade na competição com plantas invasoras e bom desempenho animal. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu é resistente a cigarrinhas-das-pastagens e, com isso, promoveu gradual substituição das áreas com *Brachiaria decumbens* (Nunes et al., 1984) e, a partir da década de 80, constituiu um novo monocultivo que perdura até hoje. Estes monocultivos são clonais, cuja vulnerabilidade coloca em risco todo o sistema produtivo de pastagens e produção de sementes do país (Valle et al., 2008).

No gênero *Brachiaria*, a maioria das espécies é poliplóide e a poliploidia está associada à apomixia, uma forma de reprodução assexuada, onde o embrião tem origem a partir do tecido materno. Todavia, para o desenvolvimento da semente, o núcleo secundário do saco embrionário necessita ser fertilizado pelo gameta masculino para que haja desenvolvimento do endosperma – apomixia pseudogâmica (Valle e Savidan, 1996). A poliploidia predominante no gênero acarreta anormalidades meióticas que inviabilizam os grãos de pólen. Estudos citogenéticos realizados em acessos de diferentes espécies de *Brachiaria* têm revelado frequência variável de anormalidades meióticas entre eles *B. decumbens* e *B. jubata* (Mendes-Bonato et al., 2002a, 2006a); *B. nigropedata* (Utsunomiya et al., 2005) e *B. dictyoneura* (Risso-Pascotto et al., 2006a). Assim, quando se deseja realizar cruzamentos intra- ou interespecíficos, é necessário que o genitor masculino tenha uma meiose estável que lhe garanta boa fertilidade de pólen.

A maioria das cultivares disponíveis no mercado é de *B. brizantha* e esta espécie é a melhor representada no banco de germoplasma da Embrapa Gado de Corte por apresentar várias características agrônomicas desejáveis, dentre elas, resistência à cigarrinha-das-pastagens. Acessos desta espécie têm sido alvo não apenas de seleção direta para a produção de novas cultivares como também para hibridação interespecífica, a princípio com *B. ruziziensis*. Todavia, como os acessos sexuais de interesse agrônomico desta última espécie são tetraplóides ( $2n = 4x =$

36), somente acessos de *B. brizantha* com este nível de ploidia podem ser utilizados como genitor masculino em cruzamentos. Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho é, por meio da análise meiótica, determinar o número cromossômico, o nível de ploidia e o comportamento meiótico de acessos disponíveis no banco de germoplasma desta espécie como subsídio ao programa de melhoramento.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Origem e introdução da *Brachiaria brizantha* no Brasil

A maioria das gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil é composta por espécies de origem africana, tais como *Brachiaria*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Andropogon*, *Setaria*, *Cynodon* e *Cenchrus*. Algumas espécies introduzidas na época do descobrimento do Brasil são consideradas “espécies naturalizadas”. O processo foi realizado de forma involuntária, tendo o material sido trazido no período colonial, possivelmente, como cama de escravos (Pereira et al., 2001).

*Brachiaria brizantha* está muito difundida na África e é encontrada em campos abertos e arborizados, ao longo das margens de bosques e de arbustos, e em campos situadas em zonas de maior altitude. As regiões de coleta do germoplasma disponível representam parte da distribuição geográfica natural da espécie na África oriental e sul oriental. A espécie de *B. brizantha* é, sem dúvida, a mais cosmopolita das espécies, tendo sido extensivamente coletada na Etiópia, Quênia, Uganda, Ruanda, Burundi, Tanzânia, Zâmbia, Zimbábue e norte da África do Sul. Aparece ainda nos países do Golfo da Guiné, como Nigéria, onde foi amplamente coletada e em Camarões (Pereira et al., 2001).

No Brasil, a primeira introdução oficial de braquiária foi de *B. decumbens*, pelo IPEAN (Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte), em Belém, em 1952, com o nome de *B. brizantha*, proveniente do Suriname (Serrão e Simão Neto, 1971). No ano de 1965, houve uma nova introdução do mesmo material, juntamente com uma variedade até então desconhecida. Como esta variedade teve uma baixa produção de semente, seu material era comumente distribuído para outros estados através de estacas. Essa variedade de *B. decumbens* se tornou conhecida como IPEAN, apresentando pouco destaque econômico na atualidade. Depois, uma segunda variedade de *B. decumbens* originária de Uganda foi introduzida em São Paulo por meio do IRI (International Research Institute), em Matão, no início da

década de 60 (Sendulski, 1978). Esta variedade ficou conhecida como “Australiana”, sendo registrada, em 1973, sob o nome de cv. Basilisk (Mackay, 1982).

Em 1967, introduzida pelo IRI, a variedade de *B. brizantha* originária do Zimbábue, após uma avaliação mais detalhada comprovando seu valor de uso foi liberada como cv. Marandu, lançada pela Embrapa em 1984 (Nunes et al., 1984). Esta cultivar é a mais cultivada nos países tropicais na atualidade, tornando-se uma monocultura.

## **2.2. Principais características morfológicas de *Brachiaria brizantha***

*Brachiaria brizantha* é uma gramínea forrageira tropical e perene com alta produção de massa verde e elevado teor de proteína. É resistente à cigarrinha-das-pastagens e adapta-se a solos de cerrados com boa capacidade de rebrota. É tolerante ao frio e ao fogo e seu hábito de crescimento é cespitoso, extremamente agressiva, de porte médio que varia de 1,5 a 2,5 m de altura. Possui, ainda, folhas largas e matiz verde escuro.

Em relação ao solo, dentre as braquiárias, é a mais exigente em fertilidade química do solo, mas suporta bem os solos ácidos, além de ter uma boa tolerância ao alumínio trocável. Responde extremamente bem à adubação, sendo esta recomendada para manter altos níveis de produção de forragem e vegeta bem em solos secos (Renvoize et al., 1996; Sementessolo, 2003; Matsuda, 2003).

A maioria das cultivares de *Brachiaria* em uso pertence à espécie *B. brizantha* e diferem entre si em várias características: 1) a cv. Marandu, que significa “novidade” na linguagem indígena, é uma planta cespitosa, as folhas são pouco pilosas na face ventral e sem pilosidade na face dorsal, bainhas pilosas, inflorescências com até 40 cm de comprimento, com quatro a seis racemos; apresenta boa produtividade de forragem de qualidade, boa cobertura de solos, capacidade de competição com as plantas invasoras e estabelecimento rápido; 2) a cv. Xaraés, que significa área “terra e povos do Pantanal” na linguagem indígena, é



uma planta cespitosa, com altura média de até 1,5 m; folhas Marandu, mais largas que a cv. lanceoladas e longas, verde escuras, com poucos pelos e com colmos que enraízam nos nós; 3) a cv. Piatã, do Tupi “valentia, corajosa”, apresenta um crescimento ereto e cespitoso, formando touceiras, apresenta porte médio, com altura entre 0,85 m e 1,10m; os colmos são verdes, finos, bainhas foliares com pouca pilosidade, lâmina foliar sem pilosidade; seu perfilhamento é aéreo e com inflorescências características apresentando muitos ramos, chegando a 12, (Safrasul, 2009; Embrapa Gado de Corte, 2004).

### **2.3. Bancos de germoplasma de *Brachiaria***

Existem sete coleções de *Brachiaria ex situ*, sendo três importantes e quatro de menor importância perfazendo um total, de 987 acessos de 33 espécies.

Destes acessos, 40% dos acessos são de *B. brizantha* enquanto 39% são de *B. humidicola*, *B. decumbens*, *B. nigropedata*, *B. jubata* e *B. ruziziensis* juntas.

Os principais bancos de germoplasma são: 1) CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), situado na Colômbia, com 700 acessos de 27 espécies já identificadas; 2) ILCA (International Livestock Centre for Africa), sendo esta a segunda maior coleção, com 522 acessos; 3) Embrapa Gado de Corte, com 475 acessos de 15 espécies. Outras coleções menores estão alocadas: 1) No ATFGRC/CSIRO (Australian Tropical Forage Genetic Resource Centre/Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation), que contém 177 acessos, dos quais 70% correspondem a *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. nigropedata*, e *B. ruziziensis*; 2) No USDA (United States Department of Agriculture), nos EUA, cerca de 60% dos 90 acessos pertencem a *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. fasciculata* e *B. humidicola* e além dessas contém outras 12 espécies; 3) No GBK (Banco de Genes do Kênia), com 51 acessos com 50% representados por *B. brizantha* e *B. decumbens*; 4) RGI/ARC (Roodeplaat Grassland Institute/African Research Council), compreendendo 39 acessos no qual 67% é *B. nigropedata* (Keller-Grein et al., 1996).

## **2.4. Produção de semente e importância econômica**

O Brasil é, sem dúvida, o maior produtor e exportador de sementes de braquiária no mundo tropical e movimenta mais de um milhão de dólares anuais (Verzignassi e Fernandes, 2001). Segundo o Anuário da Pecuária Brasileira, (Anualpec, 2007), o Brasil é o principal exportador de carne do mundo, com um rebanho de 207,2 milhões de cabeças. A base nacional da produção são os pastos que ocupam em torno de 200 milhões de hectares de pastagens dos quais 120 milhões são cultivados.

A espécie *B. brizantha*, devido às suas inúmeras características, tem várias cultivares no mercado. A cultivar Marandu, disponível desde 1984, gerou benefícios econômicos superiores a 3,9 bilhões de reais em 2006. A cultivar Xaraés está disponível no mercado desde 2003. Apresenta maior tolerância a solos com drenagem deficiente do que a cultivar Marandu, tendo uma produção de sementes puras de 100 a 120 Kg/ha, com cerca de 130 sementes por grama. A cultivar Piatã é uma opção para a diversificação das pastagens, pois apresenta uma forragem de melhor qualidade que a cultivar Marandu, bem como maior aptidão para o pastejo, ao contrário de outras cultivares. Produz cerca de 150 Kg de sementes puras/ha/ano em colheitas manuais, tendo, em média, 130 a 150 sementes puras viáveis por grama, (Safrasul, 2009; Embrapa Gado de Corte, 2004).

## **2.5. Principais doenças e pragas**

A uniformidade genética pode tornar uma cultura mais vulnerável a epidemias de pragas e doenças. Quando todos os agricultores cultivam a mesma variedade, uma praga ou doença que ataca uma planta rapidamente se estende por uma grande área (Hoyt, 1992). O monocultivo representa um risco ao equilíbrio do ecossistema, facilitando a propagação de pragas e doenças, tais como manchas foliares causadas por *Drechslera incurvata*, ferrugem causada por *Puccinia levis* var. *panici-sanguinalis*, e uma outra considerada uma das mais importantes, que é a mela das sementes da braquiária, causada pelo fungo *Claviceps sulcata* (forma

teleomórfica de *Sphacelia sp.*). Essa traz enorme prejuízo aos produtores de sementes e à economia do país. Outra doença recentemente encontrada e considerada exótica é o carvão da braquiária, causada pelo fungo *Ustilago operta*, afetando a produção de sementes. No ano de 2001, no Estado do Pará, foi constatada a morte de *B. brizantha* cv. Marandu causada pelos fungos *Pythium perillum* associado à *Rhizoctonia solani*, afetando 56 mil hectares (Verzignassi e Fernandes, 2001).

Dentre todas essas pragas e doenças, a mais preocupante praga é a cigarrinha-das-pastagens (Homoptera: Cercopideae), pois o dano causado pode levar à perda total da pastagem. Esta praga estende-se do Sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e, em cada país, encontram-se espécies e gêneros diferentes. Os gêneros mais importantes são *Zulia*, *Deiois*, *Aeneolamia* e *Mahanarva* (Valério, 1995). As cigarrinhas são insetos sugadores que permanecem nas pastagens no período da seca, na fase de ovo (ovos em diapausa) que originam as ninfas (forma jovem da cigarrinha) no início do período chuvoso, pois para seu desenvolvimento é necessário calor e umidade. Como ninfa, as cigarrinhas causam danos, mas menores quando comparado à fase adulta. Estas, ao se alimentarem nas folhas, injetam substâncias de dois tipos: umas que se coagulam no interior dos tecidos da folha, possivelmente desorganizando o transporte da seiva, e outras solúveis, que translocam-se nas folhas, predominantemente no tecido apical, determinando a morte dos tecidos (Valério, 1995). Para o controle dessa praga, recomenda-se o uso de inseticidas registrados para controle das cigarrinhas, em locais e momentos adequados, além controle da sobra de pasto, pois a palha restante proporciona um microclima ideal, garantindo a sobrevivência e o aumento da população.

## **2.6. Citogenética de *Brachiaria***

As dificuldades do melhoramento no gênero *Brachiaria* estão associadas ao número de cromossomos e ao modo de reprodução. No gênero, a maioria dos acessos é tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ) e apomítico, enquanto a sexualidade é rara e está associada à diploidia (Valle e Savidan, 1996). Poliplóides são geralmente

classificados como altamente apomíticos facultativos, com propagação clonal por sementes. Acessos tetraplóides apomíticos com meiose regular são importantes para o programa de melhoramento, podendo dar origem diretamente a novas cultivares ou atuarem como genitores masculinos em hibridações interespecíficas, com acessos sexuais tetraploidizados artificialmente de *B. ruziziensis*. Assim, a determinação do número de cromossomos, nível de ploidia e comportamento meiótico são indispensáveis para participar do programa de melhoramento.

### **2.6.1. Número básico de cromossomos no gênero *Brachiaria***

Darlington e Wylie (1955) estabeleceram como número básico de cromossomos para *Brachiaria*  $x = 7$  e  $x = 9$ , sendo que  $x = 9$  tem sido confirmado recentemente em diferentes acessos de *Brachiaria* (Mendes-Bonato et al., 2002b; Riso-Pascotto et al., 2003). Embora a maioria dos pesquisadores concorde com esses números, Basappa et al. (1987) relataram  $x = 8$  e Christopher e Abraham (1976)  $x = 5, 8, 10$  e  $12$  para este gênero. Um novo número básico de cromossomos,  $x = 6$ , foi descrito no gênero (Riso-Pascotto et al., 2006b). Todos os acessos de *B. dictyoneura* da coleção da Embrapa Gado de Corte apresentaram-se como tetraplóide derivados de  $x = 6$ . Recentemente,  $x = 6$  foi descrito também para *B. humidicola* (Boldrini, 2009), uma espécie pertencente ao mesmo grupo taxonômico de *B. dictyoneura*.

### **2.6.2. Número de cromossomos e nível de ploidia no gênero *Brachiaria***

Estudos citogenéticos realizados em *Brachiaria* tem revelado a existência de acessos diplóides, derivados de  $x = 9$  ( $2n = 2x = 18$ ) e acessos poliplóides, com nível de ploidia variando de tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ), pentaplóide ( $2n = 5x = 45$ ), até hexaplóide ( $2n = 6x = 54$ ) (Basappa et al., 1987; Valle e Savidan, 1996; Bernini e Marin-Morales, 2001; Mendes-Bonato et al., 2002b, 2006a; Utsunomiya et al., 2005; Riso-Pascotto et al., 2006b).

Penteado et al. (2000), utilizando citometria de fluxo, determinaram a quantidade de DNA da coleção de germoplasma de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte. Por meio dos valores obtidos inferiram sobre o nível de ploidia de cada acesso. Este estudo mostrou que dentre os 437 acessos avaliados, pertencentes a 14 espécies, 13,04% mostraram-se diplóides, 58,13% tetraplóides, 17,62% pentaplóides, 10,76 hexaplóides e 0,45% heptaplóide. Acessos diplóides foram encontrados em *B. brizantha* (2), *B. decumbens* (23), *B. jubata* (4), *B. ruziziensis* (24), *B. platinota* (1) e *B. subulifolia* (1).

Alguns desses níveis de ploidia obtidos pela citometria de fluxo tem se mostrado diferentes em determinações feitas pela citogenética por meio da contagem real do número de cromossomos. Estudos citogenéticos realizados nos oito acessos de *B. dictyoneura* (Risso-Pascotto et al., 2006a), baseados em  $x = 6$ , revelaram que todos os acessos disponíveis na Embrapa Gado de Corte são tetraplóides ( $2n = 2x = 24$ ), número estimado em  $2n = 4x = 36$ , pela citometria de fluxo. Resultados discrepantes também foram encontrados para a coleção de *B. humidicola* (Boldrini, 2009), onde o nível de ploidia, baseado em  $x = 6$ , não confere com o determinado pela citometria de fluxo, baseado em  $x = 9$ . Estes resultados mostram a necessidade de se avaliar toda a coleção de *Brachiaria* pelo método citogenético para se estabelecer o real número de cromossomos em cada acesso, ou usar um padrão  $x=6$  para a citometria.

### **2.6.3. Aspectos do comportamento meiótico em acessos de *Brachiaria***

Análises do comportamento meiótico em acessos de diferentes espécies do gênero *Brachiaria* têm revelado grande quantidade de anormalidades, sendo maioria relacionada ao nível de ploidia. As anormalidades encontradas com maior frequência são: ascensão precoce de cromossomos para os polos, cromossomos retardatários, levando à formação de micronúcleos, micrócitos e políades (Mendes-Bonato et al., 2002a b, 2006a; Utsunomiya et al., 2005; Risso-Pascotto et al., 2003, 2006a).

Outras anormalidades meióticas têm sido descritas durante a microsporogênese em vários acessos de diferentes espécies de *Brachiaria*. Dentre elas destacam-se: aderências cromossômicas (Mendes-Bonato et al., 2001a b; Utsunomiya et al., 2005); fusões celulares (Mendes-Bonato et al., 2001b c, Boldrini et al., 2006a; Risso-Pascotto et al., 2006a); ausência de citocinese (Risso-Pascotto et al., 2003, 2006a; Utsunomiya et al., 2005; Boldrini et al., 2006b; Gallo et al., 2007); citocinese irregular (Mendes-Bonato et al., 2002a; Boldrini et al., 2006b; Gallo et al., 2007; Adamowski et al., 2007; Calisto et al., 2008); citomixia (Utsunomiya et al., 2004; Boldrini et al., 2006a); fusos múltiplos e multipolares (Risso-Pascotto et al., 2006c); degeneração de meiócitos (Vieira et al., 2005); desintegração anormal do nucléolo (Risso-Pascotto et al., 2002), entre outras.

As anormalidades que podem comprometer o produto final da meiose, ou seja, a viabilidade do grão de pólen em *Brachiaria* não se limita à meiose. Anormalidades na mitose do grão de pólen, inviabilizando o mesmo, foram descritas em *B. decumbens* (Junqueira Filho et al., 2003) e *B. jubata* (Risso-Pascotto et al., 2005a).

#### **2.6.3.1. Aspectos do comportamento meiótico em híbridos de *Brachiaria***

Muitas anormalidades têm sido descritas em híbridos interespecíficos de *Brachiaria*. A maioria das anormalidades é devida ao nível de ploidia, pois a maioria dos híbridos é tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ). Assim, destacam-se a presença de cromossomos em ascensão precoce para os pólos, cromossomos retardatários e micronúcleos, levando à formação de grãos de pólen geneticamente desbalanceados (Risso-Pascotto et al., 2005b; Fuzinatto et al., 2007a; Adamowski et al., 2008).

Fusão celular, desintegração irregular do nucléolo, aderência cromossômica, fuso divergente e citocinese anormal também são anormalidades descritas em híbridos de *Brachiaria* (Risso-Pascotto et al., 2005a; Mendes-Bonato et al., 2006b; Fuzinatto et al., 2007a; Adamowski et al., 2008). Morte celular

programada levando a degeneração dos meiócitos também foi descrita em um híbrido entre *B. ruziziensis* e *B. brizantha* (Fuzinato et al., 2007b).

Em híbridos interespecíficos, também tem se destacado como anormalidade meiótica a assincronia entre os genomas, ou seja, o genoma dos genitores não apresenta o mesmo ritmo na meiose, ficando um genoma retardatário em relação ao outro (Risso-Pascotto et al., 2004; Mendes-Bonato et al., 2007), sendo, em alguns casos, eliminado. Outra anormalidade encontrada em um híbrido interespecífico e que denota falta de afinidade entre os genomas dos genitores foi descrita por Mendes-Bonato et al. (2006b), verificando que os genomas parentais organizaram-se em placa metafásicas distintas.

Assim como citado nos acessos, o híbrido entre *B. ruzizienses* e *B. decumbens* também apresentou anormalidades relacionadas à mitose do grão de pólen, deixando o mesmo inviável (Mendes-Bonato et al., 2004)

## **2.7. Modo de Reprodução em *Brachiaria***

Como visto anteriormente, no gênero *Brachiaria* a maioria dos acessos é poliplóide e, portanto, portadores de anormalidades meióticas. Ao longo da evolução, houve uma mudança do modo de reprodução sexuada, dependente de gametas viáveis, para reprodução assexuada ou apomítica. Acessos diplóides apresentam reprodução sexuada e acessos poliplóides são, em geral, apomíticos. Todavia, sexualidade foi descrita em um acesso de *B. humidicola* poliplóide (Valle e Glienke, 1991).

Na apomixia, o embrião é formado sem a fusão dos gametas masculino e feminino, ou seja, sua origem se dá a partir de uma célula do tecido materno (2n). Embora não haja necessidade de gametas viáveis para a formação do embrião, estes são indispensáveis para o desenvolvimento do endosperma, pois, em *Brachiaria*, a apomixia é pseudogâmica, ou seja, o núcleo secundário do saco embrionário deve ser fertilizado para a formação do endosperma (Valle e Savidan, 1996).

Em *Brachiaria*, a apomixia segue a hipótese de herança monogênica e dominante sobre a sexualidade, onde os genótipos tetraplóides apomíticos podem ser representados por Aaaa e os tetraplóides sexuais por aaaa. Assim, a proporção esperada na progênie F1 é de 1:1 (Valle e Savidan, 1996).

### **2.7.1. Vantagens da apomixia**

A vantagem adaptativa mais importante conferida pela apomixia é a restauração da fertilidade daquelas plantas que deveriam ser estéreis por apresentarem anormalidades cromossômicas durante a meiose (Bernini e Marin-Morales, 2001). Apomixia não somente aumenta a fecundidade em novos poliplóides, mas também facilita a colonização em novos habitats por preservarem alta adaptação dos genótipos heterozigotos (Nogler, 1984).

Como uma ferramenta nos programas de melhoramento, a apomixia oferece vantagens que combinam a fixação do vigor híbrido com o modo de propagação por sementes (Valle e Savidan, 1996).

### **2.8. Aspectos do melhoramento de *Brachiaria***

Na década de 70, a introdução de *B. decumbens* cv. Basilisk promoveu a substituição das pastagens nativas particularmente nos cerrados do Brasil devido a sua boa adaptação e produção em solos fracos e ácidos, mas sua susceptibilidade à cigarrinha-das-pastagens e a escassa viabilidade de semente mostrou ser necessário iniciar programas de melhoramento dirigidos para a obtenção de novas cultivares de desta gramínea (Miles et al., 1996).

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento de novas cultivares de *Brachiaria* dependia inteiramente da seleção entre genótipos naturais já existentes. Hoje o objetivo principal do programa de melhoramento de *Brachiaria*, em andamento na Embrapa Gado de Corte e no CIAT (Colômbia), é obter híbridos intra ou interespecíficos persistentes, que reúnam características desejáveis de dois ou



mais genitores agronomicamente promissores, tais como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e, principalmente, resistência a cigarrinhas-das-pastagens (Pereira et al., 2001; Miles et al., 2004)

No gênero *Brachiaria*, a hibridação não é fácil, pois os acessos tetraplóides com características agronômicas desejáveis são apomíticos, o que impede cruzamentos. A hibridação em *Brachiaria* só pode ser levada a cabo com a duplicação artificial de cromossomos de acessos diplóides de *B. ruziziensis*, na década de 80 (Gobbe et al., 1981; Swenne et al., 1981). Até pouco tempo, estes acessos eram a base do programa de melhoramento, pois foram cruzados com *B. brizantha* e *B. decumbens*. A descoberta de um acesso sexual poliplóide de *B. humidicola* (Valle e Glienke, 1991) permitiu iniciar a hibridação intraespecífica nesta espécie. A recente duplicação cromossômica de acessos diplóides sexuais de *B. brizantha* (Pinheiro et al., 2000) e de *B. decumbens* (Valle et al., 2007) traz boas perspectivas, tanto para a hibridação intra como interespecífica no gênero *Brachiaria*. Uma vez havendo acessos sexuais tetraplóides que possam atuar como fêmeas em cruzamentos, os genitores masculinos podem ser acessos sexuais ou apomíticos com o mesmo nível de ploidia e que apresentem meiose regular. Como a maioria dos acessos é tetraplóide e apomítico na coleção de *Brachiaria*, a seleção entre eles para serem doadores de pólen deve ser feita com base na regularidade meiótica e características agronômicas. Assim, a presente pesquisa teve por objetivo determinar o número de cromossomos e avaliar o comportamento meiótico de acessos de *B. brizantha* da coleção de germoplasma da Embrapa Gado de Corte como um subsídio ao programa de melhoramento desta gramínea.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

Os acessos de *Brachiaria brizantha* analisados foram coletados em parcelas do banco de germoplasma de *Brachiaria* do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC/Embrapa), sediado em Campo Grande – Mato Grosso do Sul. O ambiente onde os acessos são mantidos em campo apresenta as seguintes características: clima do tipo AW: savana tropical úmida com precipitação média anual de 1.526mm; temperatura média igual a 22<sup>0</sup>C; altitude igual 520m; latitude de 20<sup>0</sup> 28'S; longitude igual a 55<sup>0</sup> 40'W; solo latossolo vermelho escuro, álico (59% de areia; 08% de silte; 33% de argila; pH de 4,2; 2,7% de matéria orgânica e P igual a 1pmm; 0,05, 0,1, 0,9 Meq/100cc de K, Ca+ Mg, Al e CEC, respectivamente). O local de coleta desses acessos na África e suas características são apresentados no Quadro 1.

Para o estudo, foram analisados 17 acessos da espécie *Brachiaria brizantha*, dentre os 224 acessos dessa espécie existentes na coleção de germoplasma da Embrapa Gado de Corte. O material foi coletado ao longo de vários anos e acondicionado em freezer no Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia Celular e Genética, da Universidade Estadual de Maringá.

#### 3.2. Métodos

Para as análises de comportamento meiótico, foram utilizadas as inflorescências jovens colhidas ainda envoltas em folha bandeira. Estas foram fixadas em etanol, clorofórmio e ácido propiônico, nas proporções 6:3:2, por 24 horas. Após esse tempo, o material foi transferido para álcool 70% e condicionado sob refrigeração até o momento das análises meióticas. Os microsporócitos foram preparados pela técnica de esmagamento e corados com carmim propiônico a 1%.

A determinação do número de cromossomos foi feita em meiócitos em anáfase I. Para avaliação do comportamento meiótico, foram analisadas aproximadamente 1000 células por genótipo, representando as diferentes fases da meiose. Todas as anormalidades meióticas foram consideradas e as mais representativas foram microfotografadas em filme preto e branco, Kodak Imageling-HQ Asa 25 e ampliadas em papel fotográfico Kodabrome RCF3.

Para a determinação da média de anormalidades por acesso, fez-se somando a porcentagem de anormalidades de cada fase e dividindo pelo número de fase analisada, o gráfico foi feito pelo programa do Excel.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Número de cromossomos e nível de ploidia

Foram analisados 21 acessos de *B. brizantha*. Os números cromossômicos encontrados foram:  $2n = 36$ , em 15 acessos;  $2n = 45$ , em quatro acessos; e  $2n = 54$ , em dois acessos (Quadro 2). Os números cromossômicos encontrados são múltiplos de 9. Assim, infere-se número básico  $x = 9$ , conforme já descrito para *B. brizantha* (Mendes-Bonato et al., 2002b; Vieira, 2004). Os acessos seriam tetraplóides ( $2n = 4x = 36$ ), pentaplóides ( $2n = 5x = 45$ ) e hexaplóides ( $2n = 6x = 54$ )

Quadro 1 - Código dos acessos, local de coleta, quantidade de DNA por citometria de Fluxo (Penteado et al., 2000), (baseado em  $x=9$ ), nível de ploidia, e número de cromossomos encontrado por citogenética ( $2n$ ) e real nível de ploidia de acessos de *B. brizantha* analisados

Cód. do Acesso	Nº do Acesso	Origem		Quantidade de DNA (Nível de ploidia)	Números de cromossomos encontrados	Nível de Ploidia
		País	Estado			
BRA-002119	B039	Malawi	Southern	1,91 (4x)	36	4x
BRA-003646	B079	Etiópia	Gonder	2,25 (4x)	36	4x
BRA-003727	B080	Quênia	Bungoma	2,34 (4x)	36	4x
BRA-003743	B082	Quênia	Bungoma	2,28 (4x)	36	4x
BRA-003760	B083	Quênia	Siaya	2,38 (4x)	36	4x
BRA-003778	B084	Quênia	Siaya	2,12 (4x)	36	4x
BRA-003816	B085	Quênia	South Nyanza	2,01 (4x)	36	4x
BRA-003883	B086	Quênia	Nandi	2,20 (4x)	36	4x
BRA-003913	B088	Quênia	Kwale	2,29 (4x)	36	4x
BRA-003956	B090	Quênia	Trans Nzoia	2,27 (4x)	36	4x
BRA-004049	B093	Quênia	Kwale	2,27 (4x)	36	4x
BRA-004146	B095	Zimbabwe	Kadoma	2,19 (4x)	36	4x
BRA-004219	B096	Zimbabwe	Mutasa	2,39 (4x)	36	4x
BRA-004227	B097	Zimbabwe	Umtali	2,37 (4x)	36	4x
BRA-004235	B098	Zimbabwe	Umtali	2,01 (4x)	36	4x
BRA-002160	B038	Quênia	Rift Valley	2,95 (6x)	45	5x
BRA-003506	B074	Etiópia	Welega	2,74 (5x)	45	5x
BRA-003514	B075	Etiópia	Gojjam	2,75 (5x)	45	5x
BRA-003638	B078	Etiópia	Gonder	2,80 (6x)	45	5x
BRA-003611	B076	Etiópia	Gonder	2,83(6x)	54	6x
BRA-003735	B081	Quênia	Bungoma	2,88(6x)	54	6x

A maioria dos acessos analisados mostrou-se tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ). Estes dados conferem com outros obtidos nesta espécie, tanto por citogenética convencional (Mendes-Bonato et al., 2002b; Vieira, 2004) como por citometria de fluxo (Penteado et al., 2000). Dentre 222 acessos analisados por citometria de fluxo, 157 (70,72%) mostraram-se tetraplóides. Todavia, nem sempre os dados obtidos pela citometria de fluxo conferem com os obtidos pela contagem de cromossomos. O Quadro 1, apresentando dados de citometria de fluxo e número de cromossomos encontrados, revela que, pela citometria de fluxo, 13 acessos analisados haviam sido classificados como tetraplóides, um como pentaplóide e três como hexaplóides.

A contagem do número de cromossomos pela citogenética revelou que os acessos classificados como tetraplóides pela citometria tinham realmente  $2n = 36$  cromossomos, assim como os acessos hexaplóides ( $2n = 54$ ).

Dentre os dois acessos encontrados com  $2n = 45$  cromossomos, só um deles, o acesso B074, havia sido classificado como pentaplóide pela citometria de fluxo. O acesso B078 havia sido classificado como hexaplóide. Estes resultados mostram a necessidade de se analisar a coleção de germoplasma de *Brachiaria* por meio da citogenética convencional para se confirmar o real número de cromossomos dos acessos.

#### **4.2. Anormalidades meióticas**

O Quadro 2 apresenta a porcentagem de células com anormalidades meióticas encontradas entre os acessos analisados. Uma análise deste quadro revela que houve variação na frequência de anormalidades entre eles. A média de anormalidades por acesso foi, em geral, menor entre os acessos tetraplóides, variando de 8,97% no acesso B090 a 62,98% no acesso B082. Dentre os acessos tetraplóides, seis acessos (B088, B093, B090, B095, B096, e B098) apresentaram menos que 32% de células com anormalidades. Nos acessos penta e hexaplóides, a frequência de anormalidades meióticas foi maior. Nos pentaplóides, a porcentagem variou de 52,57% à 64,75% de células anormais entre os acessos, enquanto que nos hexaplóides a porcentagem de anormalidades meióticas foi 50,21% no B081 e

51,22% no acesso B076. A maior frequência de células anormais entre os pentaplóides era esperada, pois níveis ímpares de ploidia predispõem o meiócito a mais anormalidades segregacionais pelas diferentes formas em que os cromossomos podem se parar na prófase I. A figura 1 também ilustra esta tendência de maior quantidade de anormalidades entre os penta e hexaplóides.

Quadro 2 - Números dos acessos, nível de ploidia e números cromossômicos encontrados, números de células mãe de pólen (PMCs) analisados e percentagem de células meióticas nas diferentes fases da meiose

Nº do Acesso	Nº de cromossomos	Nº. de PMCs	% de células com anormalidades meióticas								Média
			Met I*	Ana I	Tel I	Pro II	Met II	Ana II	Tel II	Tetra	
B039	2n = 4x = 36	1135	27,86	47,36	30,55	64,02	65,38	93,24	83,24	77,37	61,12
B079	2n = 4x = 36	1336	2,51	60,25	26,28	27,70	10,57	53,70	44,00	69,13	36,76
B080	2n = 4x = 36	1492	4,85	62,70	50,23	58,97	31,85	82,50	72,15	61,55	53,10
B082	2n = 4x = 36	1323	11,33	65,34	65,00	56,14	67,32	61,10	90,36	87,32	62,98
B083	2n = 4x = 36	1483	15,85	72,16	37,58	24,26	53,89	69,59	78,51	94,46	55,78
B084	2n = 4x = 36	1310	8,57	78,37	14,17	36,79	39,30	39,52	65,88	82,64	45,65
B085	2n = 4x = 36	1356	8,02	59,89	54,24	69,69	38,51	52,00	83,09	57,74	52,89
B086	2n = 4x = 36	1180	5,55	72,14	81,25	79,19	29,82	56,97	70,00	64,83	57,46
B088	2n = 4x = 36	1093	17,06	44,80	17,26	04,30	11,11	33,33	24,42	22,28	21,82
B090	2n = 4x = 36	768	00	00	00	00	1,92	00	00	16,03	8,97
B093	2n = 4x = 36	1080	5,83	31,85	3,66	3,73	4,34	37,11	45,05	50,69	22,78
B095	2n = 4x = 36	573	05,7	49,25	11,65	4,54	18,60	00,00	14,28	27,53	18,79
B096	2n = 4x = 36	1146	24,46	32,98	12,82	13,79	6,42	32,67	21,92	4,58	18,70
B097	2n = 4x = 36	899	8,09	18,96	47,05	5,97	2,80	52,83	60	72,50	33,52
B098	2n = 4x = 36	1179	10,86	43,80	36,72	1,90	13,84	48,64	48,88	45,27	31,23
B038	2n = 5x = 45	1693	23,60	79,79	48,83	42,10	32,98	63,85	42,21	87,20	52,57
B074	2n = 5x = 45	1545	36,97	87,62	72,12	12,57	47,88	82,89	81,12	96,88	64,75
B075	2n = 5x = 45	989	20,07	61,26	67,69	48,64	65,65	60,0	62,2	53,0	54,81
B078	2n = 5x = 45	1338	10,81	60,29	7,01	47,65	79,41	99,09	80,83	82,42	58,43
B076	2n = 6x = 54	1579	30,18	57,61	25,53	33,33	27,69	92,38	51,49	91,56	51,22
B081	2n = 6x = 54	806	46,61	93,00	40,74	11,36	55,00	10,34	77,66	66,99	50,21

\*Met I = metáfase I, Ana I = anáfase I, Tel I = telófase I, Pro II = prófase II, Met II = metáfase II, Ana II = anáfase II, Tel II = telófase II, Tetra = tétrade.

Dentre as anormalidades meióticas encontradas, destacam-se aquelas relacionadas à segregação irregular de cromossomos causada pela poliploidia que ocorreram em maior frequência (Quadro 3). Estas anormalidades consistiram em ascensão precoce de cromossomos para os polos em metáfase I e II (Fig. 2b, 2f e 3b), cromossomos retardatários em anáfase I (Fig. 2c, 2g, 3a e 3d), formação de

micronúcleos em telófase I (Fig. 2d, 2e, 2h, 3e e 3f). Os micronúcleos permaneceram na tétrade (Fig. 2i) ou deram origem a micrócitos (Fig. 2j, 2k e 2l). O comportamento de micronúcleos em *Brachiaria* parece ser genótipo-específico, pois em alguns acessos permanece como micronúcleo na tétrade (Mendes-Bonato et al., 2002ab, 2006b; Risso-Pascotto et al., 2003 2006a; Utsunomiya et al., 2005). Em outros, é eliminado como micrócito após a ocorrência de citocinese irregular (Mendes-Bonato et al., 2002ab, Utsunomiya et al., 2005). Ainda pode permanecer como micronúcleo ou ser eliminado como micrócito na mesma tétrade (Mendes-Bonato et al., 2001b, 2002b; Risso-Pascotto et al., 2003).

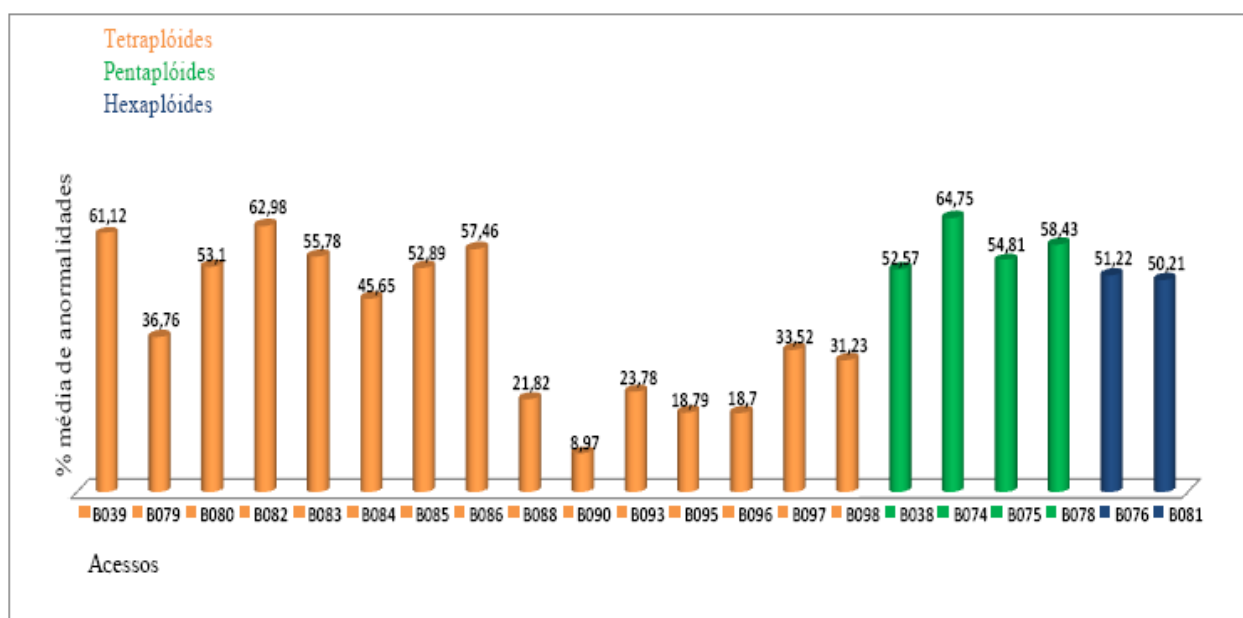


Figura 1 - Porcentagem média de anormalidades

Outra anormalidade encontrada entre os acessos B038, B078, B085 e B086 foi a transferência de cromossomos de uma célula para outra através de canais citomíticos, também conhecida como citomixia. Este fenômeno, também fora descrito em acessos de *Brachiaria* (Utsunomiya et al., 2004; Boldrini et al., 2006a). Todavia, nos acessos sob análise, a transferência de cromossomos teve uma característica distinta, ou seja, ocorria apenas entre os dois meiócitos da segunda divisão meiótica (Fig. 4), transferindo micronúcleos da primeira divisão após a ocorrência de uma citocinese incompleta. O número de meiócitos afetados por esta anormalidade foi muito baixo (Quadro 3).





Quadro 3 - Código dos acessos, número de células analisadas e anormalidades com suas respectivas porcentagens.

Acessos	Número de células com anormalidades meióticas (%)											
	Nº de células analisadas	Segregação Irregular	2 placas metafásicas	Fusão celular	Citomixia	Aderência Cromossômica	Ausência de Citocinese	Núcleo de Restituição	Micronúcleos	Micrócitos	Políades	Díades e Tríades
B039	1135	99 (8,72)	-	-	-	-	475 (35,58)	120 (10,57)	224 (19,73)	-	-	-
B079	1336	89 (6,66)	-	-	-	10 (0,74)	-	-	453 (33,90)	-	-	03 (0,22)
B080	1492	189 (12,66)	-	-	-	28 (1,87)	-	-	516 (34,58)	01 (0,06)	01 (0,06)	-
B082	1323	221 (16,70)	-	-	-	78 (5,89)	-	-	538 (40,66)	28 (2,11)	-	-
B083	1483	294 (19,82)	-	-	-	68 (4,58)	-	-	469 (31,62)	26 (1,75)	05 (0,33)	-
B084	1310	175 (13,35)	-	-	-	88 (6,71)	-	-	31 (23,74)	60 (4,58)	23 (1,75)	-
B085	1356	230 (16,96)	-	-	06 (0,44)	52 (3,83)	-	-	409 (30,16)	21 (1,54)	02 (0,14)	-
B086	1180	199 (16,86)	-	-	08 (0,67)	39 (3,30)	-	-	379 (32,11)	19 (1,61)	09 (0,76)	-
B088	1093	142 (12,99)	-	-	-	01 (0,09)	-	-	96 (8,78)	-	-	-
B090	768	2 (0,26)	-	-	-	-	-	-	21 (2,73)	-	-	-
B093	1080	92 (8,51)	-	-	-	08 (0,74)	-	-	143 (13,24)	34 (3,14)	13 (1,20)	-
B095	573	47 (8,20)	-	-	-	-	-	-	56 (9,77)	-	-	-
B096	1146	131 (11,43)	-	-	-	-	-	-	71 (6,19)	02 (0,17)	-	-
B097	899	56 (6,22)	-	-	-	-	-	-	112 (12,45)	15 (1,66)	2 (0,22)	1 (0,11)
B098	1179	125 (10,60)	-	-	-	07 (0,59)	-	-	239 (20,27)	-	-	-
B038	1693	321 (18,96)	-	83 (4,90)	1 (0,05)	-	-	-	551 (32,54)	223 (13,17)	-	-
B074	1545	397 (25,69)	-	-	-	08 (5,17)	-	-	572 (37,02)	107 (6,92)	-	17 (1,10)
B075	989	155 (12,67)	33 (3,33)	-	-	9 (0,91)	-	-	281 (24,41)	-	-	-
B078	1338	277 (20,70)	-	-	02 (0,14)	24 (1,79)	-	-	331 (24,73)	126 (7,97)	-	14 (0,88)
B076	1579	387 (24,50)	-	-	-	01 (0,06)	03 (0,18)	-	422 (26,72)	09 (0,56)	-	28 (1,77)
B081	806	228 (0,28)	-	-	-	-	-	-	195 (24,19)	01 (0,12)	-	-

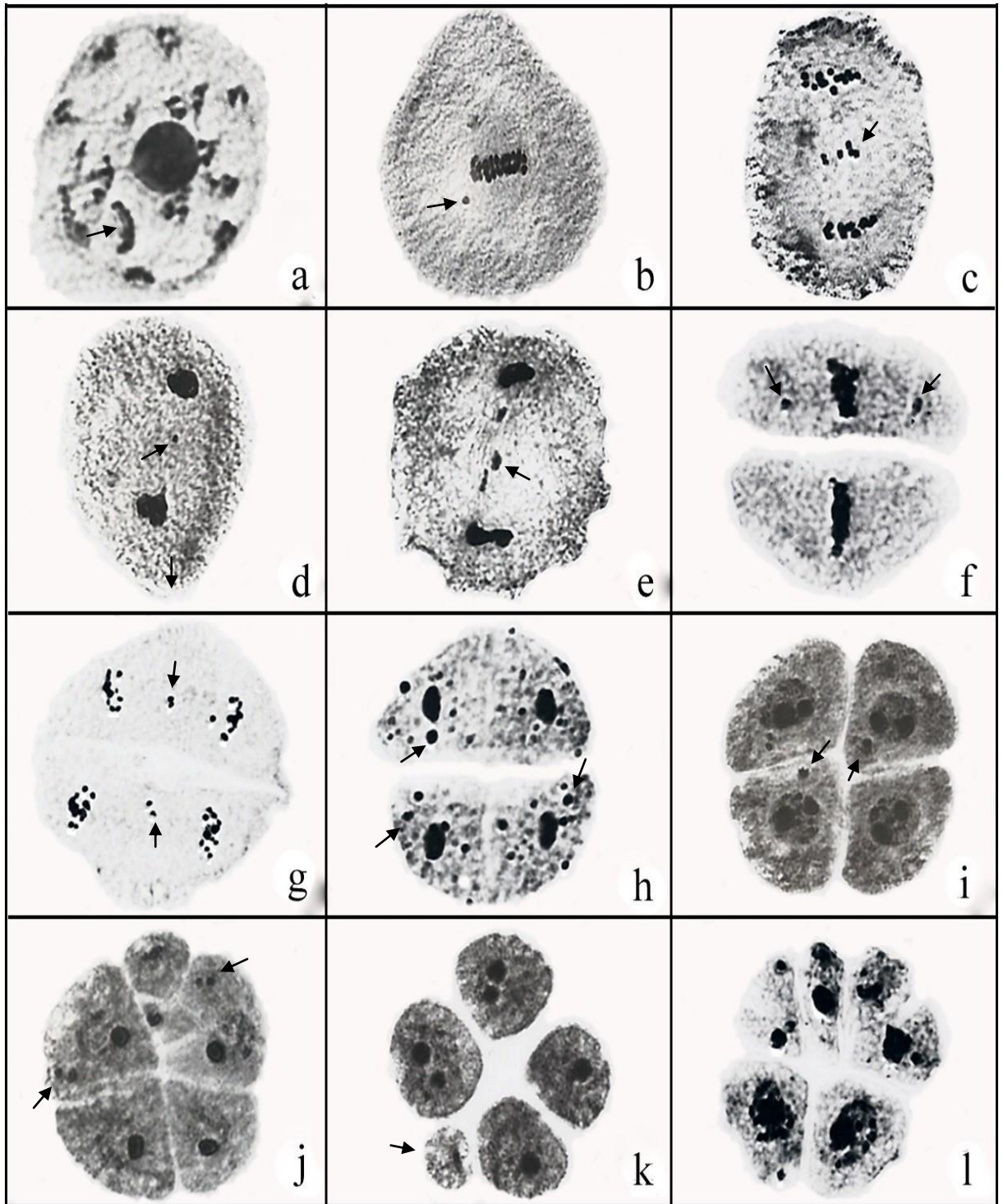


Figura 2 - Comportamento meiótico de acessos tetraplóides de *Brachiaria brizantha* relacionados à segregação irregular de cromossomos (setas). a) Diacinese com formação de tetravalente; b) Metáfase I com cromossomos em ascensão precoce; c) Anáfase I com cromossomos retardatários; d,e) Telófases I com micronúcleos; f) Metáfase II com cromossomos em ascensão precoce para os pólos; g) Anáfase II com cromossomos retardatários; h) Telófase II com vários micronúcleos; i) Tétrade com micronúcleos; j, k) Tétrades com micróctos; l) Políade.

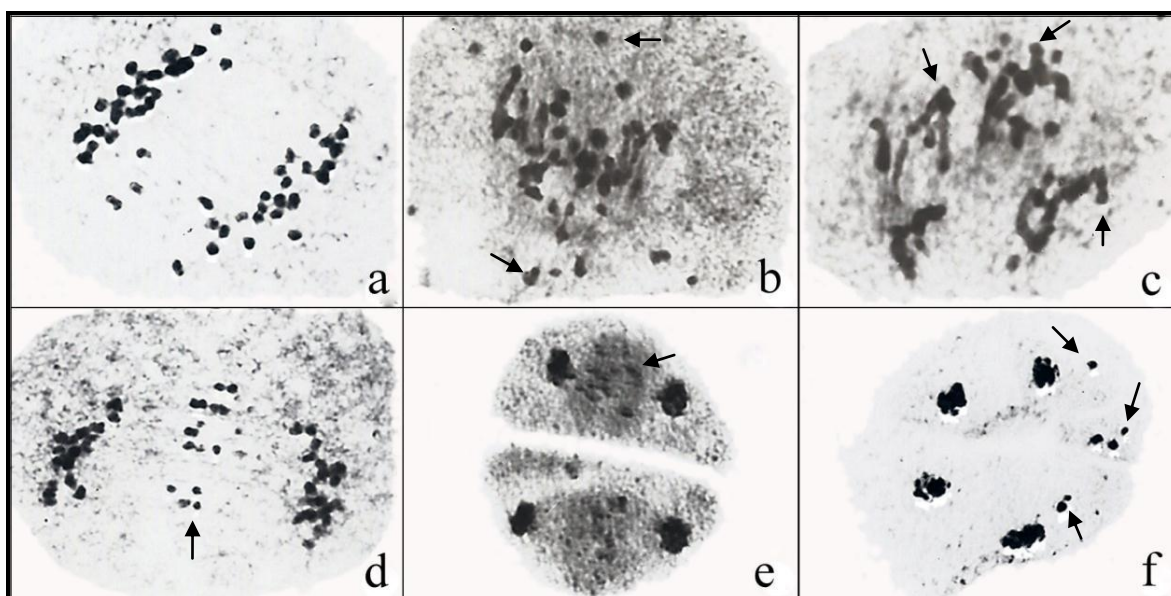


Figura 3 - Comportamento meiótico em acesso hexaplóide de *Brachiaria brizantha* (setas). a) Anáfase I com 54 cromossomos; b) Metáfase I com cromossomos em ascensão precoce; c) Metáfase I com multivalentes na placa metafásica; d) Anáfase I com cromossomos retardatários; e, f) Telófases II com micronúcleos.

Aderência cromossômica (Fig. 6b) foi observada em vários acessos (Quadro 3) em frequências variadas. A aderência pode ser causada por fatores ambientais ou genéticos (Mendes-Bonato et al., 2001a). Em *Zea mays*, a aderência cromossômica foi descrita como sendo controlada por um único gene recessivo (Beadle, 1932; Golubovskaya, 1989). Todavia, fatores externos também podem levar à aderência cromossômica como raio-X, raios-gama, temperatura, herbicidas, produtos químicos e elementos do solo.

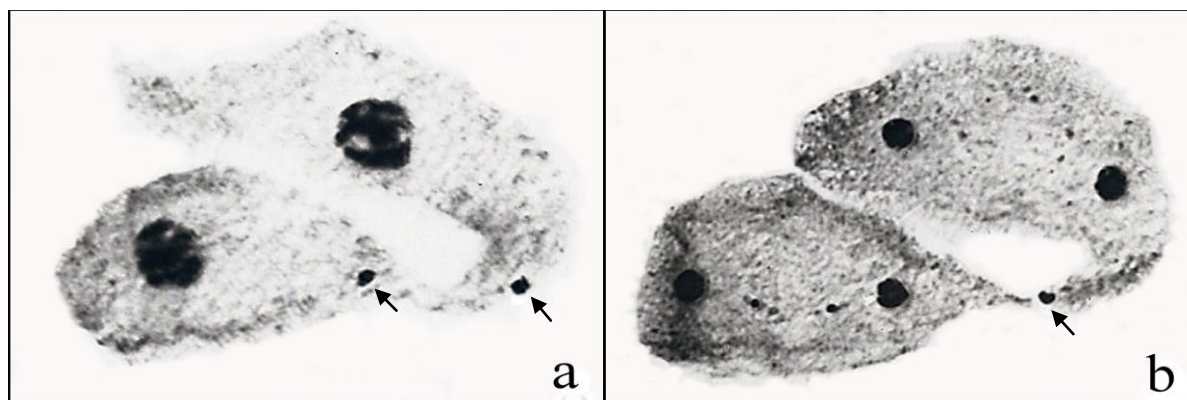


Figura 4 - Citomixia em acesso de *B. brizantha*. a) Prófase II com canal citomítico e micronúcleos; b) Telófase II com micronúcleos e citomixia.

Citocinese tardia e incompleta foi observada no acesso B039. Este tipo de citocinese caracteriza-se por fato de que a primeira citocinese tem início na metáfase II (Fig. 5b), ocupando apenas a região central da célula. Muitas vezes, a citocinese se completa em uma extremidade da célula, permanecendo a outra ainda unida (Fig. 5c, 5d). Em muitos casos, as duas placas metafásicas da metáfase II são muito próximas e o fuso convergente, levando à reunião de dois núcleos telofásicos de células irmãs (Fig. 5d), ou seja, à formação de um núcleo de restituição. Este tipo de anormalidade já foi muito bem documentado por Gallo et al. (2007) em acessos de *B. humidicola*, *B. decumbens* e *B. dura*.

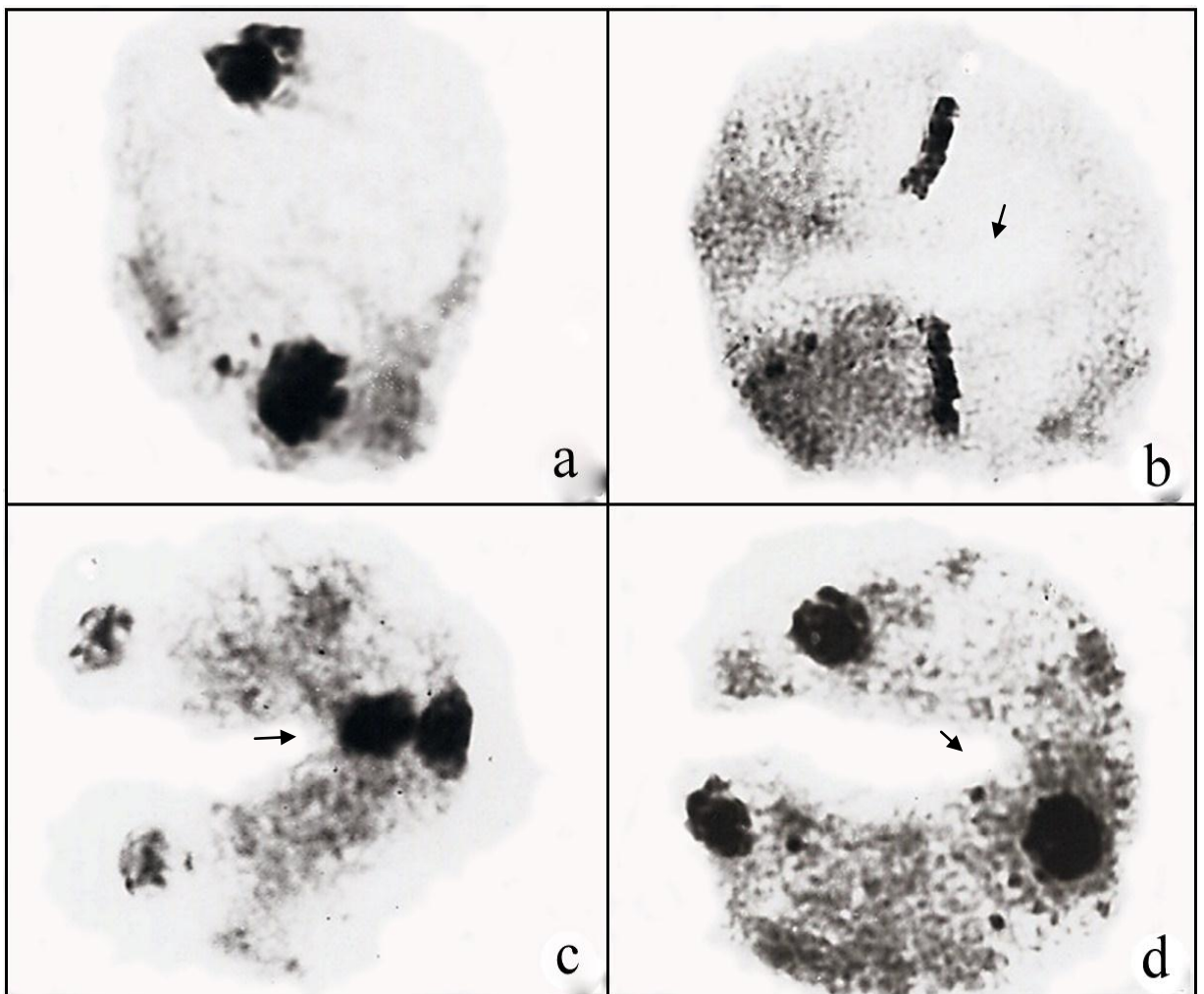


Figura 5 - Citocinese irregular e incompleta no acesso B0039 de *B. brizantha* (setas). a) Profase II ausência de citocinese; b) Metáfase II com citocinese tardia e incompleta; c) Telófase II com citocinese tardia e incompleta levando a aproximação de dois núcleos; d) Telófase II com citocinese tardia e incompleta levando à formação de núcleo de restituição.

Outras formas de citocinese irregular (Fig. 6a), dividindo o meiócito em políades ou levando à formação de díades e tríades (Fig. 6cd), também foram encontradas entre os acessos analisados, porém em baixa frequência (Quadro 3).

Anormalidades descritas nas fases iniciais no gênero *Brachiaria* foram observadas em diferentes espécies, dentre elas, a fusão celular gerando cincísios em flores masculinas de *Brachiaria brizantha* (Mendes-Bonato et al., 2001c); fusão em *Brachiaria jubata* resultando em óctades normais (Mendes-Bonato et al., 2003); em *Brachiaria humidicola* (Boldrini et al., 2006a) e *Brachiaria decumbens* (Mendes-Bonato et al., 2001b).

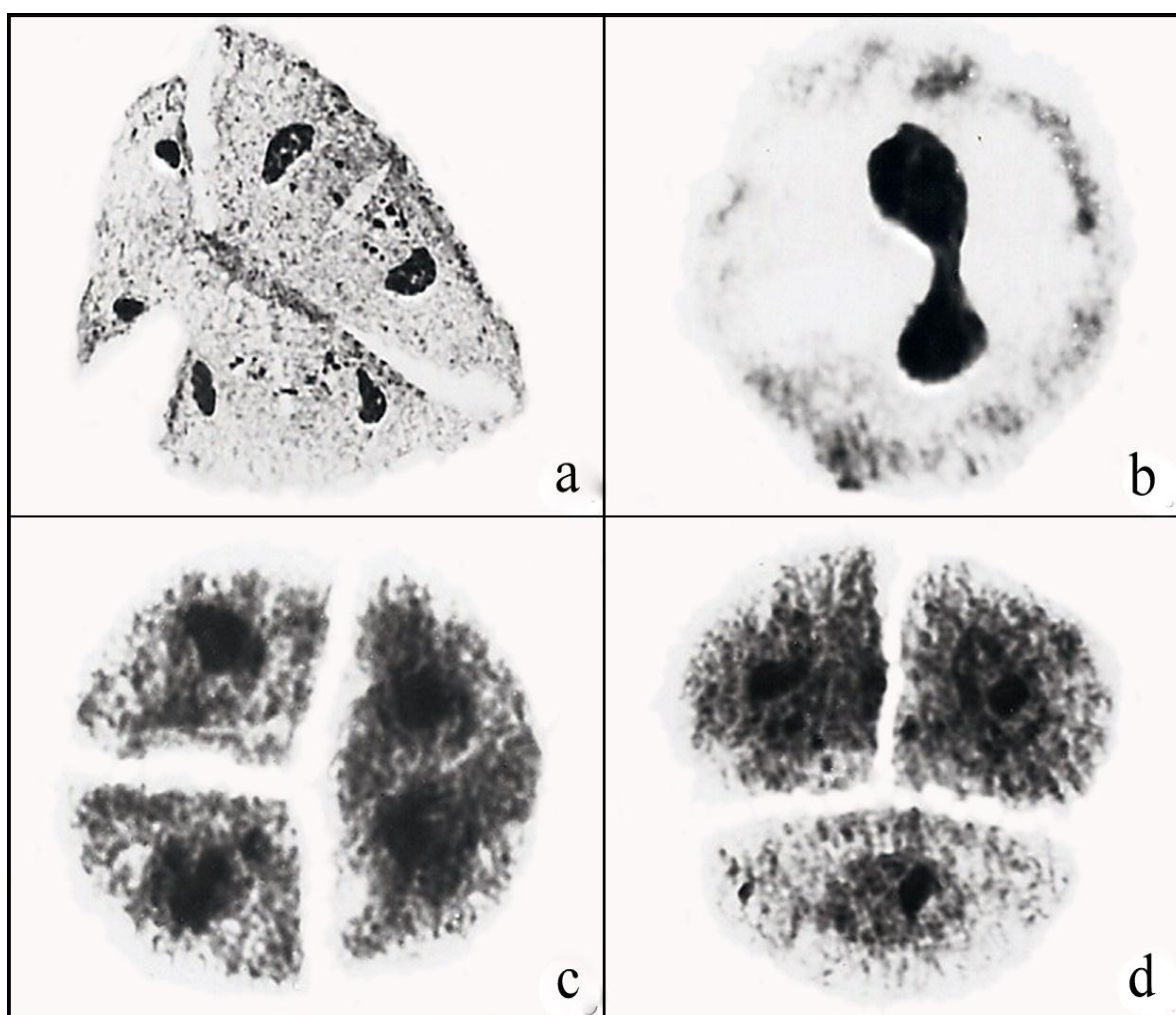


Figura 6 - Anormalidades diversas em acessos de *B. brizantha*. (a) Telófase II com eliminação de micronúcleo grandes em forma de micrócitos; (b) Prófase II com aderência; (c) Tríade com um micrósporo binucleada; (d) Tríade com um micrósporo 2n (núcleo de restituição).

A fusão pode ser o resultado da supressão da parede celular formada durante a mitose pré-meiótica. Muitos fatores podem causar essa anormalidade, tais como exposição química, raio-X, temperatura, condições da cultura e fatores genéticos (Nirmala e Rao, 1996). Também segundo Nirmala e Rao (1996), cincísios são definidos como uma massa periplasmoidal contendo mais de um núcleo. Assim como nos acessos de *Brachiaria humidicola* (Boldrini et al., 2006a) e de *Brachiaria brizantha* (Mendes-Bonato et al., 2001c), o acesso B038 (figura 7) mostra que a fusão celular está relacionado a fatores genéticos, porque foi cultivado em condições ambientais similar aos demais que não apresentaram a mesma anomalia. Foi observado um número diferente de células: na figura 7a, a fusão são de duas células; três células nas figuras 7b-c e cinco células na figura 7d.

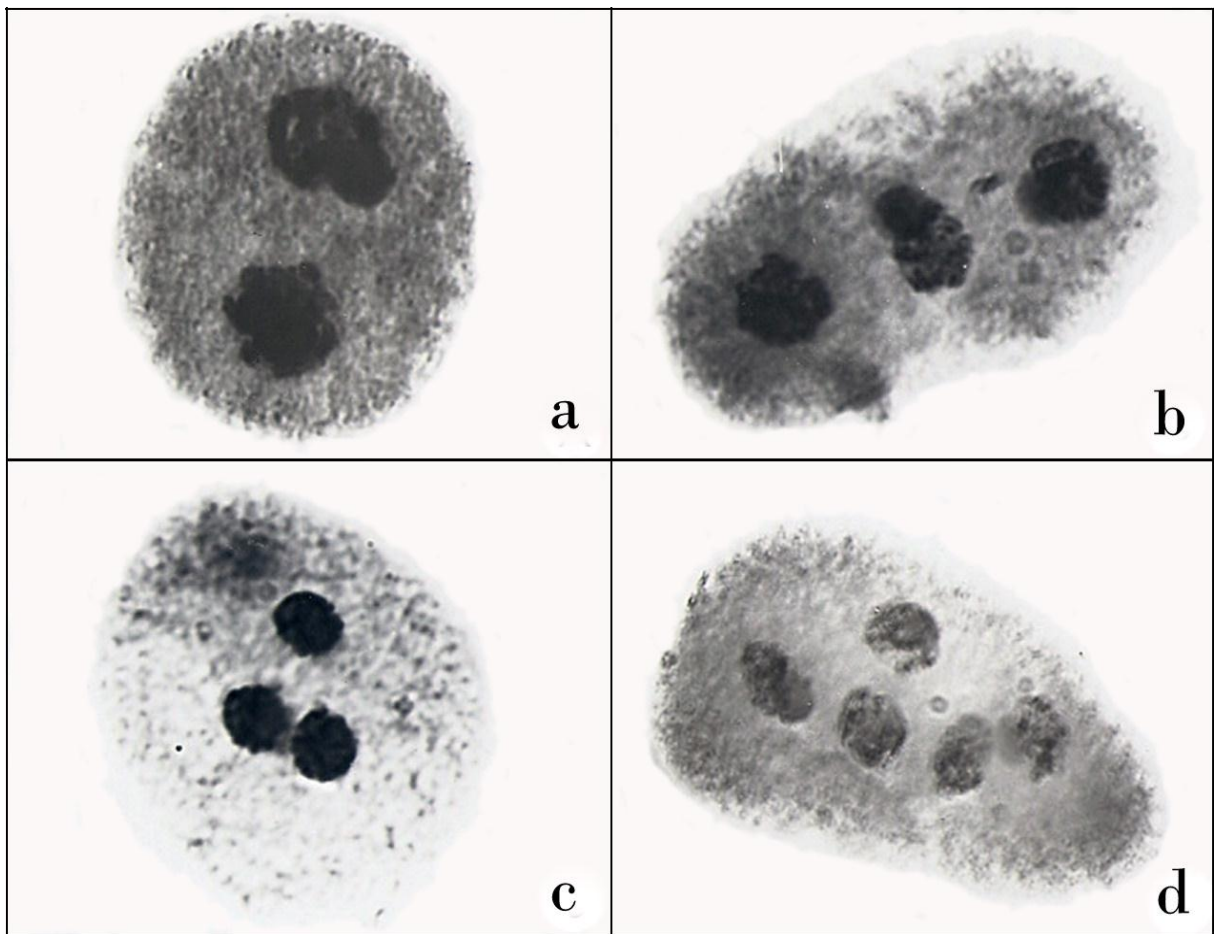


Figura 7 - Fusão celular em fases iniciais da meiose em acessos de *B. brizantha*. Fusão de células em leptóteno (a); Fusão de três células em leptóteno (b-c); Fusão de cinco células em leptóteno (d).

A produção de grãos de pólen funcionais envolve uma complexa série de processos regulados e requer a expressão de um amplo número de genes esporofíticos e gametofíticos (McCormick, 1993). Todas as anormalidades meióticas encontradas entre os acessos analisados e aqui relacionadas comprometem a produção de gametas viáveis por gerar micrósporos geneticamente desbalanceados. Assim, dentre os acessos analisados, alguns deles, por apresentarem frequência de anormalidade meiótica relativamente baixa, podem ser indicados para atuarem como doadores de pólen em cruzamentos intra ou interespecíficos no programa de melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte. Alguns acessos apresentam características particulares, como é o caso do acesso B039, que apresentou citocinese tardia e incompleta, levando à formação de 10,57% de meiócitos com núcleos de restituição, ou seja, gametas  $2n$ , que podem ser explorados no programa de melhoramento.

## 5. CONCLUSÕES

Os estudos citológicos, realizados em 17 acessos de *Brachiaria brizantha* do banco de germoplasma de *Brachiaria* do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte/Embrapa, situado em Campo Grande – MS, permitiram as seguintes conclusões:

- a) Dos 21 acessos analisados, 15 mostraram-se tetraplóides ( $2n = 36$ ); quatro pentaplóides ( $2n = 45$ ); e dois hexaplóides ( $2n = 54$ ), sendo todos derivados de  $x = 9$ .
- b) Todos os acessos apresentaram anormalidades típicas de poliplóides, como ascensão precoce de cromossomos para os pólos nas metáfases e cromossomos retardatários nas anáfases, levando à formação de micronúcleos em telófases, os quais permaneceram nas tétrades ou foram eliminados como micrócitos.
- c) Outras anormalidades meióticas que comprometem a produção de gametas viáveis também foram encontradas entre os acessos.
- d) O acesso B039 apresentou uma forma irregular de citocinese, levando à formação de elevado número de micrósporos  $2n$ .
- e) A frequência de anormalidades meióticas variou de 8,97% à 64,75% entre os acessos.

Todas as anormalidades meióticas encontradas entre os acessos analisados e aqui relacionadas comprometem a produção de gametas viáveis por gerar micrósporos geneticamente desbalanceados. Porém, dentre os acessos analisados, alguns deles apresentam frequência de anormalidade meiótica relativamente baixa, e, portanto, podem ser indicados para atuarem como doadores de pólen em cruzamentos intra ou interespecíficos no programa de melhoramento de *Brachiaria* da Embrapa Gado de Corte.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal cytokinesis in microsporogenesis of *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, 6:616-621, 2007.

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *B. ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Poaceae). **Journal of Genetics**, 29: 33-38, 2008.

ANUALPEC 2007. Disponível em: <http://www.seag.es.gov.br/pedeag/setores/corte.pdf>. Acesso em: 17, janeiro, 2009.

BASAPPA, G.P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPPA, C.C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, 65:2297-2309, 1987.

BEADLE, G.W. A gene for sticky chromosomes in *Zea mays*. *Z. Indukt. Abstamm Vererbungs.*, 63:195-217, 1932.

BERNINI C.; MARIN-MORALES, M.A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, 104: 157-171, 2001.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. Londres: Longman, 1977. 475p.

BOLDRINI, K.R.. **Acessos alopoliplóides, níveis ímpares de poliploidia e assincronia na microsporogênese como evidências citológicas de número básico de cromossomos  $x = 6$  em *Brachiaria humidicola* (Poaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2009. 64p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal timing of cytokinesis in microsporogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, 85:225-228, 2006b.

BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Cell fusion and cytomixis during microspogenesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **South African Journal of Botany**, 72:478-481, 2006a.

CALISTO, V.; FUZINATTO, V.A.; MESSAGE, H.J.; MENDES-BONATO, A.B.; BOLDRINI, K.R.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Desynapsis and precocious cytokinesis in *Brachiaria humidicola* (Poaceae) compromise meiotic division. **Journal of Genetics**, 87:33-38, 2008.

CHRISTOPHER J.; ABRAHAN, A. Studies on the cytology and phylogeny of south Indian grasses. III. Subfamily V, Panicoidea; tribe (i) the Paniceae. **Cytologia**, 41:621-37, 1976.

DARLINGTON, C.D.; WILIE, A.P. **Chromosome atlas of flowering plants**. Allen and Unwin, London, 1955.

Embrapa Gado de Corte, 2004. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2002/abril/bn.2004-11-25.2184590530/>. Acesso em: 18, fevereiro, 2009.

FERNANDES, C.D.; VALÉRIO, J.R.; FERNANDES, A.T.F. 1 Ameaças apresentadas pelo atual sistema de produção de sementes à agropecuária na transmissão de doenças e pragas. In: **WORKSHOP SOBRE SEMENTES DE FORRAGEIRAS**, Sete Lagoas, 1999. Embrapa Negócios Tecnológicos: Sete Lagoas: Embrapa, 1999. p. 55-68.

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE C.B. Evidence of programmed cell death during microspogenesis in na interespecific *Brachiaria* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) hybrid. **Genetics and Molecular Research**, 2:208-215, 2007b.

FUZINATTO, V.A.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, 4:1107-1117, 2007a.

GALLO, P.H.; MICHELETTI, P.M.; BOLDRINI, K.R.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. 2n Gamete formation in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). **Euphytica**, 154:255-260, 2007.

GOBBE, J.; SWENNE, A.; LOUANT, B.P. Diploides naturels et autotetraploïdes induits chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Edvard: critères d'identification. **Agronomía Tropical**, 36:339-346, 1981.

GOLUBOVSKAYA, I.N. Meiosis in maize: *mei* genes and conception of genetic control of meiosis. **Advances in Genetics**, 26:149-192, 1989.

HOYT, E. **Conservation of Wild Relatives of Cultivated Plants**. Wellington: Delaware, 1992. 52p.

JUNQUEIRA FILHO, R.G.; MENDES-BONATO; PAGLIARINI, M.S.; BIONE, N.C.P.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Absence of microspore polarity, symmetric divisions and pollen cell fate in *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Genome**. 46:83-88, 2003.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasm collections. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C. B. (eds.) ***Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement***. Brasília: EMBRAPA, 1996. p. 17-42.

MACKAY, J.H.E. **Register of Australian herbage plant cultivars**. Canberra: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), 1982. 122p.

MATSUDA. Caracterização morfológica da *Brachiaria brizantha*. Disponível em: <http://www.matsuda.com.br/html/mg4.html>. Acesso em: 30, novembro, 2007.

- McCORMICK, S. Male gametophyte development. **Plant Cell**, 5:1265-1275, 1993.
- MENDES-BONATO, A.B.; JUNQUEIRA-FILHO, R.G.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M.I.O. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, 26:641-646, 2002a.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI M.S.; RISSO-PASCOTTO, C.; VALLE, C. B.; et al. Chromosome number and meiotic behavior in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Journal of Genetics**, 85:83-87, 2006a.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; FORLI, F.; VALLE, C.B.; Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, 125:419-425, 2002b.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; PENTEADO, M.I.O.; VALLE, C.B. Archesporial syncytes restricted to male flowers in a hexaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Hochst) Stapf (Gramineae). **The Nucleus**, 44:137-140, 2001c.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; SILVA, N.; VALLE, C.B. Meiotic instability in invader plants of signal Grass *Brachiaria decumbens* Stapf (Gramineae). **Acta Scientiarum**, 23:619-615, 2001b.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal spindle orientation during microspogenesis in an interespecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. **Genetics and Molecular Biology**, 29:122-125, 2006b.
- MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 50:831-837, 2007.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; PENTEADO, M. I.O. A severe case of chromosome stickiness in pollen mother cells of *Brachiaria brizantha* (Hochst.) Stapf (Gramineae). **Cytologia**, 66:287-291, 2001a.

MENDES-BONATO, A.B.; RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI; VALLE, C.B. Normal microspore production after cell fusion in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Genetics and Molecular Biology**, 4:517-520, 2003.

MILES, J.W.; VALLE, C.B.; RAO, I.M.; EUCLIDES, V.P. Brachiariagrasses. In: SOLLENBERGER, L. (ed.). **Warm-Season (C4) Grasses**. Madison: ASA, 2004. p. 745-760.

MILES, J.W.; VALLE, C.B. Manipulation of Apomixis in *Brachiaria* Breeding. In: MILES, J.W.; VALLE, C.B. (eds.). **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. CIAT, Colômbia, pp. 164-177, 1996.

NIRMALA, A.; RAO, P.N. Genesis of chromosome numerical mosaicism in higher plants. **The Nucleus**, 39:151-175, 1996.

NOGLER, G. A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI, B.M. (ed). **Embriology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlang, 1984. p. 475-578.

NUNES, S.G.; BOOCK, A.; PENTEADO, M.I.O.; GOMES, D.T. 1984. *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Documentos nº 21. CNPGC/EMBRAPA**, Campo Grande, MS, Brasil. 1984,31p.

PENTEADO, M.I.O.; SANTOS, A.C.M.; RODRIGUES, I.F.; VALLE, C.B.; SEIXAS, M.A.C.; ESTEVES, A. Determinação de poliploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies de gênero *Brachiaria*. **Boletim de Pesquisa nº 11** Campo Grande-MS. Embrapa Gado de Corte, 2000, 19p.

PEREIRA, A.V.; VALLE, C.B.; FERREIRA, R..P.; MILES, J.W. Melhoramento de Forrageiras Tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADORES-INGLIS, M.C. (eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, 549-597.

PINHEIRO, A.A.; POZZOBON, M.T.; VALLE, C.B. PENTEADO, M.I.O.; CARNEIRO, V.T.C. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Rep.**, 9:274-728, 2000.

RENVOIZE, S.A.; CLAYTON, W.D.; KABUYE, C.H.S. Morphology, Taxonomy, and Natural Distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. En: MILES, J. W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Colômbia: CIAT, 1996, p. 1-15.

RISSE-PASCOTTO, C.; MENDES, D.V.; SILVA, N.; PAGLIARINI, M.S.; Evidence of allopolyploidy in *Brachiaria brizantha* (Poaceae: Paniceae) through chromosome arrangement at metaphase plate during microspogenesis. **Genetics and Molecular Research**, 5:797-803, 2006c.

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

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Abnormal nucleolar cycle in microsporogenesis of *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Cytologia**, 4: 355-360, 2002.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in interespecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, 145: 155-159, 2005b.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). **Genetics and Molecular Research**, 54:837-845, 2006a.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant Cell Reports**, 23:522-527, 2005c.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. **Plant Cell Reports**, 22: 945-950, 2004.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. Symmetric pollen mitosis I and suppression of pollen mitosis II prevent pollen development in *Brachiaria jubata* (Gramineae). **Brazilian Journal Medical Biological Research**, 38:1603-1608, 2005.

RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.; MENDES-BONATO, A.B. Chromosome number and microspogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breeding**, 122:136-140, 2003.

SAFRASUL. Disponível em: <http://www.safrasulsementes.com.br/produtos.aspx>. Acesso em: 18, fevereiro, 2009.

SEMENTESSOLO. Disponível: [www.sementessolo.com.br/sementes](http://www.sementessolo.com.br/sementes). Acesso em: 30 nov. 2007.

SENDULSKY, T. *Brachiaria*: Taxonomy of cultivated and native species in Brazil. **Hoehnea**, 7: 99-139, 1978.

SERRÃO, E.A.S.; SIMÃO NETO, M.S. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evard. IPEAN série estudos sobre forrageiras na Amazônia. **IPEAN, Belém, PA, Brasil. Vol. 2**, no. 1, 31 p. 1971.

SWENNE, A.; LOUANT, B.P.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraplóides chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evard (Graminée). **Agronomía Tropical**, 36:134-141, 1981.

UTSUNOMIYA, K.S.; PAGLIARINI, M.S. VALLE, C.B. Microspogenesis in tetraploid accessions of *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (gramineae). **Biocell**, 29:295- 301, 2005.

UTSUNOMIYA, K.S.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Chromosome transfer among meiocytes in *Brachiaria nigropedata* (Ficalho & Hiern) Stapf (Gramineae). **Cytologia**, 69:395-398, 2004.

VALÉRIO, J.R. **Cigarrinha-das-pastagens: uma praga que retorna com as chuvas**, 1995. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD08.html>. Acesso em: 25, fevereiro, 2009.

VALLE, C.B.; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**. 3:11-13, 1991.

VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S.; JANK, L.; EUCLIDES, V.P.B.; VALÉRIO, J. R.; MACEDO, M.C.M.; BARBOSA, R.A.; FERNANDES, C.D. Breeding and selection of *Brachiaria*. In: **Simpósio Internacional sobre Melhoramento de Forrageiras**. Palestras e Resumos em *CD Room*. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS; 2007.

VALLE, C.B.; SAVIDAN, Y.H. Genetics, Cytogenetics and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: MILES, J.W.; MAASS, B.L.; VALLE, C.B. (eds.) **Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement**. Cali, Colombia: CIAT, 1996. p. 147-163.

VALLE, C.B.; SIMIONI, C.; RESENDE, R.M.S; JANK, L. Melhoramento de *Brachiaria*. In: RESENDE, R.M.S.; VALLE, C.B.; JANK, L. (Eds.) **Forrageiras Tropicais**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2008. p. 13-55.

VERZIGNASSI, J.R.; FERNANDES, C.D. **Doenças em Forrageiras**, 2001. Disponível em: [http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/divulga\\_pdf/gdcd50PeB.pdf](http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/divulga_pdf/gdcd50PeB.pdf). Acesso em: 17, janeiro, 2009.

VIEIRA, D.M. **Avaliação citogenética de acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae)**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.



VIEIRA, D.M.; MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B.  
Abnormal meiotic behavior in *Brachiaria brizantha* (Poaceae) leading to  
microspore degeneration. **Caryologia**, 4:396-42, 2005.