

**Cariótipos de acesso diplóide sexual (BRA-00274) e tetraplóide apomítico (BRA-00591, cv. Marandu) de *Brachiaria brizantha***

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 215***

**Cariótipos de acesso diplóide sexual  
(BRA-00274) e tetraplóide apomítico  
(BRA-00591, cv. Marandu) de *Brachiaria  
brizantha***

Stephan Nielen  
Lucas M. Almeida  
Vera T. C. Carneiro  
Ana Claudia G. Araujo

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Brasília, DF  
2008

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*  
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*  
Membros: *Arthur da Silva Marante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*  
Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Figura da Capa: Hibridização in situ por fluorescência (FISH) em cromossomos de *B. brizantha*.

1ª edição  
1ª impressão (2008):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

C 293    Cariótipos de acesso diplóide sexual (BRA-00274) e tetraplóide apomítico  
          (BRA-00591, cv. Marandu) de *Brachiaria brizantha*. / Stephan Nielen ...  
          [et  
          al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.  
          - p.: il. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos  
          Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 215).

1. Gramínea. 2. Apomixia. 3. Citogenética. I. Nielen, Stephan. II. Série.

575.1 – CDD 21.

# SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>6</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>7</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>8</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>11</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>12</b>
<b>Referências.....</b>	<b>13</b>

# **Cariótipos de acesso diplóide sexual (BRA-00274) e tetraplóide apomítico (BRA-00591, cv. Marandu) de *Brachiaria brizantha***

***Stephan Nielen*<sup>1</sup>**

***Lucas M. Almeida*<sup>2</sup>**

***Vera T. C. Carneiro*<sup>3</sup>**

***Ana Claudia G. Araujo*<sup>3</sup>**

## **Resumo**

*Brachiaria* (Trin.) Griseb. é um gênero pertencente à família Poaceae onde a apomixia e sexualidade estão presentes em vários acessos dentro de uma mesma espécie. Apomixia é um modo de reprodução assexual onde a progênie gerada é geneticamente idêntica à planta mãe. O principal interesse na pesquisa em apomixia se deve a possibilidade de transferência desse caráter para híbridos e assim perpetuar genótipos de interesse. Além disso, o controle da apomixia poderá auxiliar no aumento da variabilidade genética de plantas. Análises citogenéticas contribuirão para análises filogenéticas e comparativas de cariótipos de plantas sexuais e apomíticas. Além disso, o mapeamento físico de genes em plantas por hibridização in situ por fluorescência (FISH) é uma importante ferramenta, pois potencialmente permite a localização de seqüências específicas em cromossomos. No futuro, FISH auxiliará a localização do apolocus da apomixia em *Brachiaria*. O objetivo desse trabalho foi elaborar cariótipos de *B. brizantha* por meio de estudos morfológicos e localização de genes de DNA ribossomal por FISH em cromossomos metafásicos. O comprimento e posição centromérica dos cromossomos foi determinada em BRA-00274 (diplóide sexual) e BRA-00591 (tetraplóide apomítico) e comparados com outros acessos diplóides e tetraplóides e sítios de DNAr por meio de FISH. Os resultados corroboraram a hipótese de origem alopoliplóide de BRA-00591, cv. Marandu.

---

<sup>1</sup> Biólogo, PhD, Consultor da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> Biólogo, BsC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Abstract

*Brachiaria (Trin.) Griseb. is a genus belonging to the family Poaceae. In the genus, apomixis and sexuality are present in many different accessions within the same species. Apomixis is an asexual mode of reproduction that results in genetically identical progeny. The main interest in apomixis research is the possibility of the transfer of this character to hybrids to perpetuate interesting genotypes. Also, the knowledge on apomixis control can help to recover the genetic variability of plants that reproduce by apomixis. Analyses of the mechanisms of apomixis are conducted at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Brasília-DF using Brachiaria as a model. This includes as well cytogenetic studies. Cytogenetic studies including the use of FISH (fluorescent in situ hybridization) will contribute to the better comprehension of apomixis based on phylogenetic analysis and comparative karyotypes of sexual and apomictic plants. Additionally, the physical mapping of genes by FISH is an important tool that potentially allows the localization of specific DNA sequences within chromosomes without the need for genetic polymorphisms and large segregating populations. In the future, FISH is expected to help in the localization of the apomixis apolocus in Brachiaria. The aim of this work was to elaborate the karyotypes of B. brizantha based on morphological data and localization of rDNA sites in metaphase chromosomes. The length and centromere position of the chromosomes was determined in BRA-00274 (diploid sexual) and BRA-00591 (tetraploid apomictic) and compared to other diploid and sexual accessions of Brachiaria and rDNA sites were identified. The presented data corroborate the hypothesis of the allopolyploid origin of BRA-00591.*

**Palavras-chave:** gramínea, citogenética, FISH, centrômero, cromossomos, apomixia.

## Introdução

*Brachiaria* (Trin.) Griseb. é um gênero de forrageiras pertencente à família Poaceae que possui cerca de 100 espécies que ocorrem principalmente na África. Algumas espécies são economicamente importantes em diversos países tropicais (Renvoize et al. 1996) como, por exemplo, o cultivar Marandu de *B. brizantha* e Basilisk de *B. decumbens* que ocupam aproximadamente 98 milhões de hectares de áreas de pastagem no Brasil (Valle & Milles 1992, ANUALPEC 2004). Uma análise do modo de reprodução de 14 espécies de *Brachiaria* reunidas pelo CIAT – Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colômbia e (verificar) realizada numa coleção de 251 acessos indicou a ocorrência de apomixia e sexualidade em vários acessos dentro de uma mesma espécie, para várias espécies no gênero (Valle 1990). Apomixia é um modo de reprodução assexual presente em mais de 300 espécies em 36 famílias de angiospermas, tais como Poaceae (Gramineae), Asteraceae (Compositae), Rosaceae e Rutaceae (Hanna & Bashaw 1987). Neste modo de reprodução a produção de sementes viáveis independe de fertilização do gameta feminino, processo chamado de agamospermia. O embrião é formado por meio do desenvolvimento autônomo da oosfera e, conseqüentemente, a planta formada é geneticamente idêntica à planta mãe (Asker & Jerling 1992). Estudos sobre herança da apomixia em *Brachiaria* indicaram que o controle genético desse caráter está ligado a um único locus dominante (Valle et al. 1994).

Existe um grande interesse na pesquisa em apomixia devido à perspectiva de, através da biotecnologia, transferir esta característica para genótipos de interesse e assim perpetuar híbridos, trazendo para o agricultor, a independência para multiplicação de sementes de híbridos e a diminuição da incidência de doenças transmitidas por vírus em variedades multiplicadas por estaquia. Por outro lado, o controle da apomixia permitiria o aumento da base genética de diferentes espécies que se reproduzem exclusivamente por apomixia.

Análises citogenéticas em *Brachiaria* poderão contribuir para o entendimento da apomixia por meio de comparações entre diferentes cariótipos, permitindo a identificação de regiões cromossômicas associadas ao modo de reprodução, taxas de transmissão e recombinação gênica nessas regiões. Estudos citogenéticos também auxiliam a interpretação da evolução da estrutura cromossômica em análises filogenéticas. Além disso, o mapeamento físico de genes em plantas por hibridização in situ por fluorescência (FISH) é uma importante ferramenta, pois potencialmente permite a localização física no cromossomo de seqüências específicas (revisto por Schwarzacher, 2003) e em *Brachiaria* poderá facilitar a localização do apolocus da apomixia como já anteriormente realizado em *Pennisetum squamulatum* (Akiyama et al., 2004). Esse é de especial interesse pois não há necessidade de grandes populações segregantes e nem de polimorfismos genéticos como se faz necessário para mapeamentos genéticos.

No gênero *Brachiaria*, estudos citogenéticos sugerem o número básico de cromossomos igual a nove (Basapa et al. 1987, Dujardin 1979, Thompson & Estes 1986, Christopher & Abrahan

1976, Valle & Savidan 1996). Na espécie, *brizantha* (A. Rich.) Stapf, (Valle & Savidan 1996), em uma coleção de 251 acessos, apenas um foi caracterizado como diplóide ( $2n = 2x = 18$ ) sexual, BRA002747 (Carnahan & Hill 1958, Valle & Glienke 1991). Os demais são poliplóides, sendo tetraplóides na maioria ( $2n = 4x = 36$ ) (Valle & Savidan 1996). Esses estudos em *B. brizantha* e em outras espécies sugeriram relação entre o nível de ploidia e o modo de reprodução no gênero: diploidia e sexualidade, poliploidia e apomixia. Mais recentemente, ideogramas de acessos diplóides e poliplóides de cinco espécies de *Brachiaria* foram confeccionados (Bernine & Marin-Morales 2001) e irregularidades meióticas foram observadas em acessos tetraplóides e em híbridos (Valle et al. 1987, Valle & Savidan 1996; Mendes-Bonato et al. 2002, 2005, 2006). O objetivo desse trabalho foi elaborar os cariótipos do acesso diplóide sexual BRA-002747 e tetraplóide apomítico BRA-00591 de *B. brizantha* por meio da avaliação da posição centromérica, comprimento de cromossomos e localização de genes de DNA ribossomal por FISH em cromossomos metafásicos. Os cariótipos foram confeccionados e os resultados mostraram a relação entre comprimento e posição centromérica dos cromossomos desses acessos comparados com outros acessos diplóides e tetraplóides do gênero e a relação da localização de sítios de DNA ribossomal por meio de FISH entre os acessos estudados. Os resultados corroboraram a hipótese de origem alopoliplóide de BRA-00591.

## Material e métodos

### **Material vegetal**

Plantas de *B. brizantha* acesso diplóide ( $2n = 2x = 18$ ) sexual, BRA-002747 e acesso tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ), apomítico BRA-000591 (cv. Marandu) mantidas em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

### **Coleta de amostras**

Extremidades de meristemas radiculares jovens com aproximadamente 2 mm de comprimento foram coletadas de plantas às 08h30min e incubadas em solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002M por 1h à temperatura ambiente e posteriormente a 4°C por 1h. Amostras foram lavadas em água destilada, incubadas em solução fixadora Carnoy (ácido acético: etanol absoluto, 3:1, v/v) recém preparada por 1h à temperatura ambiente, posteriormente a 4°C por 24h e armazenadas em etanol 70% à 4°C.

### **Preparação de amostras em lâminas histológicas e seleção de lâminas**

As extremidades de meristemas radiculares jovens foram lavadas em tampão citrato (de sódio 0,01 M, pH 4,8 por 30 min e incubados neste mesmo tampão contendo 11,9% de pectinase (Sigma P2401 de *Rhizopus sp.*) e 7% de celulase (Sigma C1184 de *Aspergillus niger*) à 37°C



por 2h. Após hidrólise enzimática da parede celular vegetal, as raízes foram incubadas no mesmo tampão por 30 min e individualmente transferidas para as lâminas histológicas limpas. A limpeza foi realizada pela imersão de lâminas histológicas novas em ácido crômico por 12h, lavadas em água destilada, incubadas em álcool 70% durante 40 min e secas em fluxo laminar. Os fragmentos radiculares tiveram seus meristemas isolados em uma gota de ácido acético 45%, com auxílio de agulha, bisturi e pinça sob microscópio estereoscópico Zeiss SV16. Uma lamínula foi colocada sobre os fragmentos e as células espalhadas por leves pressões sobre a lamínula. Lamínulas foram retiradas por meio de imersão rápida em nitrogênio líquido e as lâminas com as células hidrolisadas foram secas ao ar livre e armazenadas a 4°C. A seleção de lâminas contendo cromossomos metafásicos foi feita sob microscopia de fase em Microscópio Zeiss Axiskope. Lâminas contendo pelo menos cinco células metafásicas, com espalhamento adequado dos cromossomos e poucos restos citoplasmáticos foram selecionadas.

### ***Análises morfológicas***

Após tratamento por Feulgen, as extremidades de meristemas radiculares jovens foram incubadas em solução de carmim acético a 45%. Dezoito imagens de células metafásicas de *B. brizantha* coradas com Feulgen (Feulgen & Rosemberg 1924) foram selecionadas e utilizadas para análises cariotípicas, sendo nove para cada acesso. Outras foram coradas com DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol), um corante A-T específico que fluoresce na cor azul quando excitado com luz ultravioleta. As lâminas foram incubadas em água por 30 min, em tampão McIlvaine pH 7 por 30 min e os cromossomos corados com 50 µl de DAPI por 30 min em ambiente escuro. Novamente foram lavadas em tampão McIlvaine, secas e armazenadas em ambiente escuro por três dias, à temperatura ambiente. As lâminas foram, em seguida, montadas em tampão McIlvaine pH 7,0 e analisadas sob microscopia de fluorescência com auxílio de um microscópio Zeiss Axiophot. Lâminas tratadas com DAPI foram observadas com o filtro de fluorescência Zeiss nº 1 (excitação BP 365/12 e emissão LP 397).

As micrografias foram digitalizadas (600 dpi, tons de cinza), transferidas para o Microsoft Adobe Photoshop 7.0 para recorte, montagem e análises.

### ***Medição do comprimento dos cromossomos***

O comprimento de cada cromossomo foi medido nas nove micrografias das células de cada acesso, utilizando uma ocular micrométrica sob microscópio estereoscópico Zeiss SV16. A média do comprimento ( $\bar{X}$ ) de cada par de cromossomos homólogos foi calculada pela fórmula

$\bar{X} = \frac{\sum x}{N}$ , onde x representa a coluna correspondente a um dos cromossomos do par e suas

diversas medidas nas nove células e N o número de medições feitas. O desvio padrão foi

calculado baseado em dados avulsos, utilizando a fórmula:  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum x'^2}{N}}$ , onde  $\sigma$  representa o

desvio padrão,  $\bar{x}$  a média ou valor individual ( $x$ ) e  $N$  é o número total de medidas. A posição do centrômero foi determinada e a razão do comprimento dos braços cromossômicos de cada par de cromossomos homólogos foi calculada pela fórmula:  $r = \frac{bl}{bc}$ , onde  $r$  é a razão a ser calculada,  $bl$

e  $bc$  os comprimentos dos braços longos e curtos, respectivamente.

O pareamento dos cromossomos homólogos foi feito de acordo com o comprimento médio dos pares homólogos, da posição centromérica e presença de satélites. Os pares de cromossomos homólogos foram organizados em ordem decrescente de comprimento e numerados com algarismos romanos em conformidade com aqueles apresentados para o gênero por Bernini e Marin-Morales (2001).

### **FISH**

As sondas utilizadas na hibridização in situ foram sintetizadas a partir dos plasmídeos pTA71 contendo genes de DNA ribossomal 18S-5.8S-25S de *Triticum aestivum* (Gerlach & Bedbrook, 1979) e pTA794, contendo a sequência completa do gene de DNAr 5S de *T. aestivum* (Gerlach & Dyer, 1980). As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP (pTA794) e biotina-11-dUTP (pTA71) por “kits de random primed labeling” (Roche). O protocolo de hibridização, lavagem e detecção foram adaptados a partir de Schwarzbacher & Heslop-Harrison (2000). Lâminas selecionadas com qualidade para FISH contendo cromossomos metafásicos completos e bem espalhados foram submetidas à pré-tratamentos incluindo RNase A (100  $\mu\text{g/ml}$ ), pepsina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) para remoção de citoplasma restante, e o material fixado em solução contendo paraformaldeído 4%. Entre as etapas de incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão SSC 2x e finalmente desidratadas em série crescente de etanol 70%, 90% e etanol absoluto. A solução de hibridização contendo as duas sondas de DNAr (3,75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de cada), formamida 50% (v/v), SSC 2x, sulfato de dextran 10% (p/v), DNA de esperma de salmão (25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), EDTA 125 mM, SDS e 0,125% (p/v) foi aquecida a 85°C por 10 min para desnaturar o DNA. Foram adicionados 40  $\mu\text{l}$  da solução de hibridização em cada lâmina e foram recobertas com lamínula plástica. As lâminas foram aquecidas a 80°C por 10 min em uma câmara úmida flutuando em um banho aquecedor, e posteriormente a câmara foi resfriada a 37°C e as lâminas incubadas por 16 h. Lavagens pós-hibridização foram feitas em uma solução contendo SSC 0,1x e formamida 20% (v/v) a 40°C elevando a estrigência para 81%. Para detecção imunológica, as lâminas foram inicialmente pré-tratadas em tampão de bloqueio (SSC4x, Tween 20® 0,2% (v/v) contendo albumina de soro bovino (BSA) 5% a 37°C em câmara úmida por 30 min. Em seguida, as lâminas foram tratadas com solução de detecção contendo anticorpo anti-digoxigenina de cabra (2  $\mu\text{g/ml}$ ) conjugado com fluoresceína (Roche) e com Streptavidina conjugada com Cy3 (3.33  $\mu\text{g/ml}$ ) (Rockland). Após 1h de incubação a 37°C, as lâminas foram lavadas em tampão de detecção três vezes a 42°C. O sinal da fluoresceína foi amplificado após etapa de bloqueio, utilizando tampão de detecção contendo soro normal de coelho 5% com anticorpo anti-cabra

conjugado com fluoresceína produzido em coelho (Vector) diluído em soro normal de coelho (20 µg/ml). Após lavagens finais em tampão, os cromossomos foram contra-corados DAPI (2 µg/ml). Para evitar desvanecimento, as lâminas foram montadas com a solução Vectashield® (Vector) e mantidas em condição escura a 4°C.


#### *Observação e fotodocumentação de FISH*

As lâminas foram observadas no microscópio epifluorescente Axiophot Zeiss utilizando filtros adequados. Fotomicrografias foram obtidas em negativos coloridos Kodak Super ISO 400, digitalizadas e editadas com Microsoft® Adobe Photoshop 7.0 para análises.

#### *Ideogramas*

O ideograma de cada acesso foi montado esquematicamente, baseado no comprimento dos cromossomos, na posição dos centrômeros e na posição dos genes de DNA ribossomal.

## **Resultados**

Os ideogramas de BRA-002747 e BRA-000591 montados resumem os dados aqui apresentados mostrando esquematicamente o tamanho dos braços dos cromossomos de cada par, posição de centrômero e a posição dos genes de DNA ribossomal 5S e 18S-26S (Fig. 1). As análises confirmaram o número de cromossomos  $2n = 2x = 18$  e  $2n = 4x = 36$  em BRA002747 e BRA000591, respectivamente, com número básico  $x = 9$  (Fig. 1). BRA-002747 apresentou seu menor par de cromossomos (IX) com 2,4 µm e o maior par (I) com 5,15 µm. Foram encontrados cinco pares de cromossomos submedianos, três medianos e um subterminal (Fig. 2). A razão entre braço longo e curto foi de 4,13 para o par I, sendo este o único par de cromossomos subterminal e de 1,38 para o par IX, o menor par de cromossomos. Este acesso apresentou o par V com desvio padrão do comprimento dos cromossomos  relativamente baixo em comparação aos demais pares. Resultados estão apresentados na Tabela I. Em BRA-00591, os comprimentos médios dos pares de cromossomos homólogos eram de 5,6 e 2,2 µm e variação de 3,5 µm entre o maior e menor par de cromossomos. Quase todos os seus cromossomos mostraram-se medianos, exceto o par XIV classificado como submediano (Fig. 2). Este acesso apresentou desvios padrão dos comprimentos cromossômicos elevados, desde o par I até o XIII, e somente a partir do par XIV, valores menores foram observados. Resultados estão apresentados na Tabela II.

Um par de cromossomos satélites foi identificado no par VIII de BRA-002747 e outro em BRA-000591 (Fig. 1). A presença de satélites (par VIII) em BRA-002747 foi corroborada com FISH utilizando a sonda 18S-26S. Os sinais evidentes estão localizados em loci de região organizadora do nucléolo (NOR), que possuem uma grande quantidade de unidades de genes RNA ribossomais 18S-5.8S-26S organizadas em tandem (Flavell and O'Dell 1979). (Fig. 3b). Em BRA-000591, a

sonda 18S-26S hibridizou com um par de satélites e com a região telomérica de outro par de cromossomos (Fig. 4c, 5b). O sinal evidente aqui também presente corresponde à região NOR em satélite. Este satélite foi detectado com uso de DAPI (Fig. 5a), enquanto sítios de DNAr 5S foram evidenciados em região intersticial de um par de cromossomos no acesso BRA-002747 (Fig. 3b) e em três pares no acesso BRA-000591 (Fig. 4b, 4d).

## Discussão

Os dois acessos estudados confirmaram o número básico  $x = 9$ , comum no gênero *Brachiaria*. Análises prévias na tribo Paniceae registraram  $x = 7, 8$  e  $10$ , no entanto, os mais comuns são  $9$  e  $7$  (Davidse & Pohl 1972, Dujardin 1979, Basapa et al. 1987, Christopher & Abraham 1976). Os cromossomos de BRA-00591 mostraram razão dos braços dos cromossomos bem semelhantes entre si, o que sugere estabilidade estrutural. Análises indicaram similaridade entre esse acesso com outros tetraplóides descritos por Bernini e Marin-Morales (2001) em relação à posição dos centrômeros - mediano. Entretanto, o acesso tetraplóide aqui descrito possui cromossomos bem mais longos do que aqueles caracterizados para os outros acessos de *B. brizantha*. Já os cromossomos de BRA-002747, do tipo submediano diferem daqueles presentes em outros acessos diplóides com centrômeros medianos e bem mais curtos (Bernini e Marin-Morales 2001). Esses resultados sugerem que os dois acessos analisados apresentam uma distância filogenética com aqueles analisados anteriormente ou ainda, sugerem a ocorrência de possíveis alterações estruturais durante a evolução desses acessos.

Tanto BRA-002747 como acesso de *B. ruziziensis* R134 diplóide sexual (Bernini e Marin-Morales 2001) apresentam cromossomos satélites no par VIII. A presença de satélites em posições e cromossomos semelhantes, como observado nesses acessos, pode indicar a conservação de porções de material genético ao longo da diferenciação de espécies.

A relação observada no comprimento de cromossomos de BRA-002747 e BRA-00591 (o comprimento do par I do acesso diplóide é similar aos dos pares I e II do acesso tetraplóide e a mesma relação pode ser encontrada para os demais pares de cromossomos) poderia sugerir que esse acesso tetraplóide seria oriundo de um evento de autoduplicação do acesso diplóide.

Entretanto, durante análises do comportamento meiótico de BRA-000591 foi observada uma baixa frequência de associação de multivalentes, sugerindo que BRA-00591 apresente alopoliploidia segmental (Mendes Bonato et al. 2002). De fato, a diferença na posição centromérica indicada neste estudo confirma que o acesso tetraplóide dificilmente seria um autopoliploide de BRA-002747. Mas a presença de apenas um par do DNAr 5S em BRA-002747 e de três pares em BRA-000591 corrobora definitivamente a hipótese de origem alopoliplóide de BRA-00591, visto que o número de genes 5S de DNAr deveria ser o dobro em um autopoliplóide. Esse estudo é o primeiro relato da aplicação da técnica de FISH com sucesso em *Brachiaria*.

Esses resultados facilitarão futuros experimentos para mapear fisicamente seqüências de DNA associadas à apomixia.

## Referências

- AKIYAMA, Y., CONNER, J.A., GOEL, S., MORISHIGE, D.T., MULLET, J.E., HANNA, W.W. & OZIAS-AKINS, P. High-resolution physical mapping in *Pinnisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixes. *Plant Physiology*, 134: 1733-1741
- ANUALPEC 2004. Anuário de pecuária brasileira. São Paulo: Argos Comunicação FNP, 376p. 2004.
- ASKER, S.E., JERLING, L. Apomixis in Plants. Boca Raton, Florida, USA, CRC press, inc. 1992.
- 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.
- BERNINI, C., MARIN-MORALES, M.A. Karyotype analisis in *Brachiaria* (Poaceae) especies. *Cytobios*, 104: 157-171. 2001.
- CARNAHAN, H.L., HILL H.D. Apomixis in the Gramineae: Panicoideae. *American Journal of Botany* 54: 253-253. 1961.
- CHRISTOPHER J., ABRAHAN A. Studies on the cytology and phylogeny of south Indian grasses. III. Subfamily V, Panicoidea; tribe (i) the Paniceae. *Cytologia*: 41 621-637. 1976.
- DAVIDSE G., POHL R.W. Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on some grasses from Central America and the West Indies. *Canadian Journal of Botany* 47 1-2: 44-55. 1972.
- DUJARDIN M. Additional chromosome numbers and meiotic behavior in tropical African grasses from western Zaire. *Canadian Journal of Botany*: 57, 864-876. 1979.
- FEULGEN, R., & ROSEMBERG, E., (1924) apud BEÇAK, W. & PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. Ed. Livros técnicos e científicos S.A. 1976.
- FLAVELL, R. B., O'DELL, M. The genetic control of nucleolus formation in wheat. *Chromosoma* 71: 135–152. 1979.
- GERLACH, W.L. and BEDBROOK, J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7: 1869-1885. 1979.

GERLACH, W.L. and DYER, T.A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contains 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research* 8: 4851-4865. 1980.

HANNA, W.W., BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science*: 27, 1136-1139. 1987.

MENDES-BONATO, A.B., PAGLIARINI, M.S., FORLI, F., VALLE C.B. & PENTEADO M.I.O. 2002. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Euphytica*: 125, 419-425.

MENDES-BONATO AB; PAGLIARINI MS; VALLE CB. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Euphytica*, v. 145, p.155-159. 2005.

MENDES-BONATO, A.B.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. do. Analysis of genomic affinity between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* through meiotic behavior. *Australian Journal of Botany*, (submetido). 2006.

RENVOIZE S.A., CLAYTON W.D. & KABUYE C.H.S. Morphology, Taxonomy and Natural Distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J.W., MAASS. B.L. & VALLE, C.B.DO (eds). ***Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement***. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. CIAT Publication N° 259. 1996. pp-16-42.

SCHWARZACHER, T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome*: 46, 953-962. 2003

SCHWARZACHER, T. and HESLOP-HARRISON, J.S. Practical *in situ* Hybridization. Springer-Verlag, New York. 2000

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescence chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324. 1976.

THOMPSON R. A. ,ESTES J. R. Anthecial and foliar micromorphology and foliar anatomy of *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae). *American Journal of Botany*: 3, 398-408. 1986.

VALLE, C.B. DO. Coleção de germoplasma de espécies de *Brachiaria* no CIAT: estudos básicos visando ao melhoramento genético. Campo Grande. Embrapa – CNPQC. *Documentos*, 46. Campo Grande, Brasil. 1990.

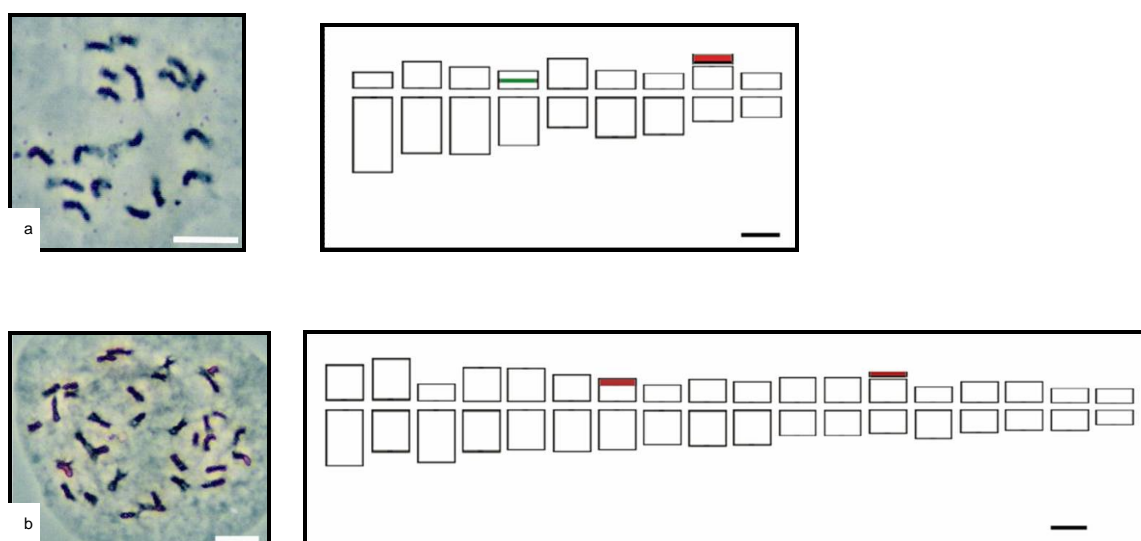
VALLE, C.B. DO, GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. *Apomixis Newsletter*: 3, 11-13. 1991.

VALLE, C. B. DO, MILES J.W. Breeding of apomitic species. *Apomixis News Letter*: 5, 37-47. 1992.

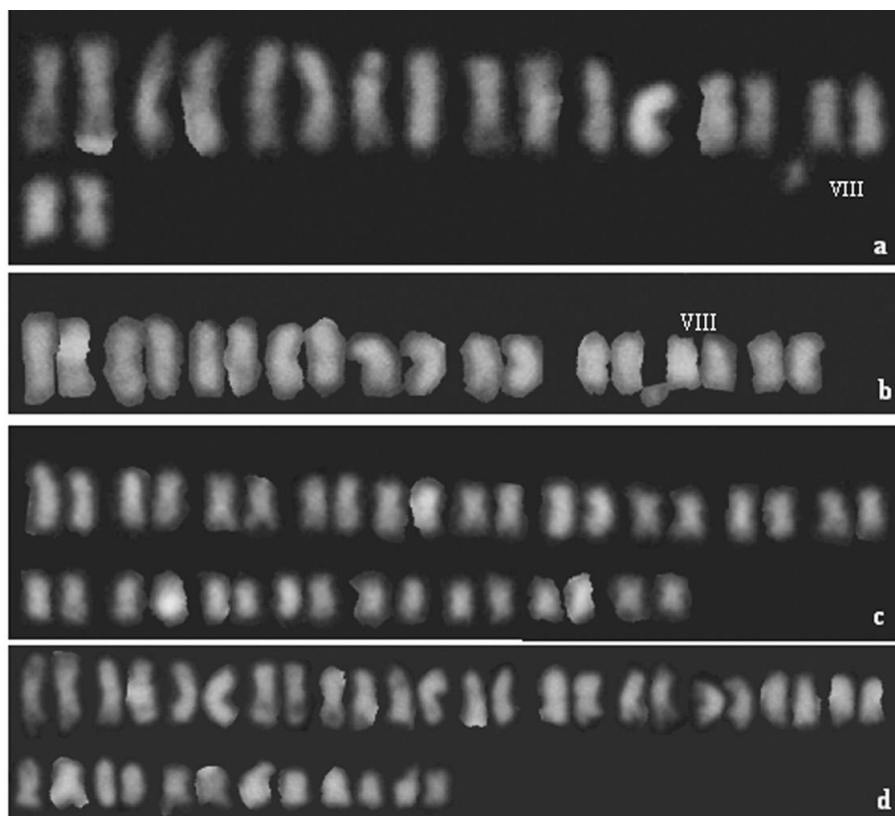
VALLE, C. B. D., GLIENKE, C.; LEGUISAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria* a tropical forage grass. *Apomixis Newsletter* 7, 42-43 1994.

VALLE, C.B. DO. & SAVIDAN, Y. Genetics, Cytogenetics and Reproductive Biology of *Brachiaria*. In: *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. CIAT Publication N° 259. 1996.

VALLE, C.B. DO, SINGH R.I. & MILLER D.A. Pachytenes chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Ger. Et Evrard. *Plant Breeding* v.78, pp 75-78. 1987.

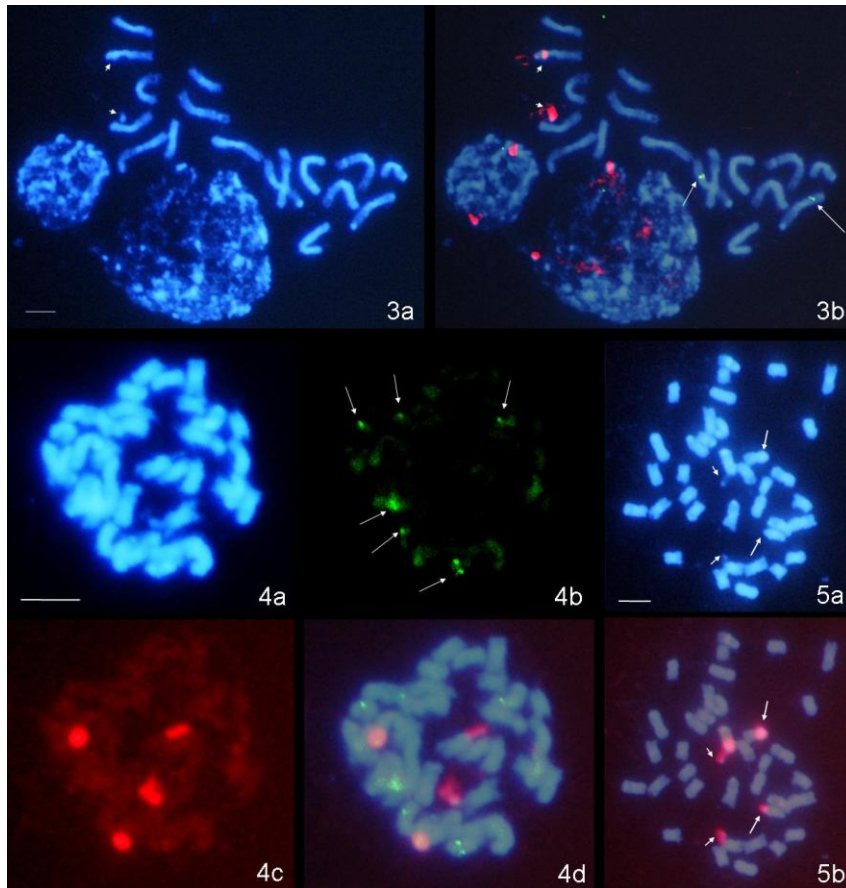


**Figura 1:** Fotomicrografias de cromossomos mitóticos tratados com Feulgen e carmim acético e seus respectivos ideogramas. **a)** acesso diplóide sexual, BRA-002747. **b)** acesso tetraplóide apomítico, BRA-000591. Observe a presença de cromossomos satélites e a localização de sítios de DNAr 5S (verde) e 18-25S (vermelho) detectados por FISH. Barras das figuras: 60  $\mu$ m. Barras dos ideogramas: 2  $\mu$ m.



**Figura 2:** Fotomicrografias de cromossomos mitóticos tratados com Feulgen e carmim acético. **a,b)** acesso diplóide sexual, BRA-002747. **c,d)** acesso tetraplóide apomítico, BRA-000591.





Figuras **3- 5**: Hibridização in situ por fluorescência (FISH) em cromossomos de *B. brizantha*. (**3**) BRA-002747. **3a**) coloração DAPI; **3b**) após dupla hibridização mostrando dois sítios de DNAr 5S (verde, setas) e dois sítios principais no satélite (vermelho, cabeça de seta) após hibridização com 18S-26S. (**4-5**) BRA-000591. **4a, 5a**) coloração DAPI; **4b, 4d**) seis sítios de DNAr 5S; **4c, 5b**) Quatro principais sítios de DNAr 18S-26S. **5b**) hibridização da sonda pTa71 com o par de cromossomos satélites (cabeças de seta) e com a região telomérica de outro par de cromossomos (setas). Barras = 5 µm.

**Tabela 1** Comprimento em micrômetros dos cromossomos de nove células mitóticas obtidas de fragmentos de meristema jovem caulinar de plantas de *B. brizantha*, acesso diplóide sexual BRA002747

( $2n = 2x = 18$ ), mostrando a média ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) das medidas, média do comprimento do par de cromossomos homólogos ( $\mu\text{m}$ ), razão entre braço longo e curto de cada par de cromossomos e a posição do centrômero no par.

Par de cromossomos	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX	
Células	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	6,0	6,0	5,8	5,5	5,7	5,7	5,5	5,5	5,1	5,1	4,1	4,1	3,8	3,8	3,7	3,7	3,4	3,3
2	4,8	4,8	4,7	4,7	4,7	4,7	4,1	4,1	3,8	3,8	3,6	3,5	3,5	3,5	3,4	3,3	2,9	2,6
3	5,1	5,1	5,1	5,1	4,7	4,7	4,5	4,5	3,9	3,9	3,6	3,6	3,5	3,5	3,3	3,3	2,6	2,4
4	5,5	5,5	5,5	5,5	4,9	4,9	4,5	4,5	4,1	3,8	3,7	3,7	3,4	3,4	3,0	2,8	2,6	2,4
5	4,6	4,5	4,3	4,1	4,1	4,1	4,1	3,8	3,6	3,4	2,6	2,5	2,6	2,4	2,2	2,2	1,9	1,7
6	5,3	5,3	4,2	4,2	4,1	3,9	3,8	3,6	3,8	3,5	3,5	3,5	3,2	2,6	2,6	2,6	2,0	2,0
7	4,4	4,1	4,1	4,1	3,8	3,8	3,5	3,5	3,5	3,2	3,0	3,0	2,9	2,9	2,6	2,5	2,3	2,3
8	5,8	5,8	5,1	5,1	5,2	5,1	4,6	4,6	4,1	4,1	3,6	3,6	3,4	3,2	3,3	3,0	2,7	2,4
9	5,5	5,2	4,6	4,6	4,3	4,3	4,3	4,3	3,9	3,9	3,6	3,6	3,6	3,6	3,2	3,0	2,4	2,2
$\bar{X}$	5,20	5,10	4,80	4,70	4,60	4,50	4,30	4,20	3,90	3,80	3,40	3,40	3,30	3,20	3,00	2,90	2,50	2,30
$\sigma$	0,44	0,46	0,44	0,53	0,46	0,58	0,53	0,58	0,20	0,27	0,41	0,34	0,31	0,45	0,45	0,43	0,43	0,41
$\bar{X}$ do par	5,15		4,75		4,55		4,25		3,85		3,40		3,25		2,95		2,40	
Razão entre braços	4,13		1,87		2,33		2,00		1,11		1,96		2,50		1,02		1,38	
Posição do centrômero	st		sm		sm		sm		m		sm		sm		m		M	

m: mediano; sm: submediano; st: subterminal

**Tabela 2:** Comprimento em micrômetros dos cromossomos de nove células mitóticas obtidas de fragmentos de meristema jovem caulinar de plantas de *B. brizantha*, acesso tetraplóide apomítico, BRA000591

( $2n = 4x = 36$ ), mostrando a média ( $\bar{X}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) das medidas, média do comprimento do par de cromossomos homólogos, razão entre braço longo e curto de cada par de cromossomos e a posição do centrômero no par.

Par de cromossomos	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		IX		X		XI		XII		XIII		XIV		XV		XVI		XVII		XVIII		
Células	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
1	ND	ND	3,9	3,7	3,4	3,4	3,4	3,3	3,4	3,2	3,1	3,0	3,0	2,9	3,0	2,9	2,9	2,8	2,7	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,5	2,4	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,0	2,0	2,0	1,9
2	4,2	4,1	4,1	4,0	3,9	3,8	3,7	3,6	3,5	3,5	3,4	3,2	3,2	3,2	3,1	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,7	2,6	2,6	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,6	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2	2,2	2,0	2,0
3	5,5	5,3	5,1	4,8	4,7	4,6	4,6	4,6	4,4	4,4	4,3	4,1	3,7	3,5	3,4	3,3	3,5	3,3	3,7	3,3	3,2	3,1	3,2	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0	2,8	2,5	2,3	2,3	2,3	2,2	2,3	2,2	
4	6,3	6,2	6,1	5,9	5,9	5,5	5,5	5,2	5,4	5,2	5,2	5,1	4,7	4,7	4,6	4,5	4,6	4,6	4,3	4,0	4,1	3,9	4,1	3,7	4,0	3,8	3,4	3,3	3,3	3,3	3,3	3,2	2,7	2,6	2,5	2,3	
5	5,9	ND	5,6	5,3	5,3	5,2	5,3	5,2	4,9	4,7	4,8	4,5	4,5	4,4	3,5	3,2	3,0	3,3	3,1	3,0	3,0	3,0	3,1	2,9	2,9	2,8	2,8	2,7	2,8	2,7	2,9	2,5	2,3	2,3	2,2	2,1	
6	5,8	5,7	5,6	5,3	5,5	5,5	5,3	5,3	5,3	5,3	5,0	4,8	4,8	4,6	4,6	4,4	4,1	4,1	4,1	3,9	3,7	3,7	3,8	3,5	3,6	3,3	3,4	2,4	3,0	3,0	2,7	2,7	2,6	2,5	2,2	1,9	
7	6,0	6,0	6,0	5,8	5,3	5,3	5,3	5,0	5,1	5,1	4,8	4,4	4,5	4,3	4,5	4,2	4,1	4,1	4,1	4,0	4,0	3,9	3,9	3,6	3,6	3,3	3,4	3,2	3,3	3,3	3,2	3,1	2,6	2,5	ND	ND	
8	6,1	6,1	6,0	5,9	5,8	5,5	5,8	5,5	5,5	5,4	5,5	5,2	5,0	4,7	4,8	4,3	4,7	4,7	4,6	4,6	4,5	3,9	4,1	3,9	3,9	3,9	3,8	ND	3,6	3,4	3,3	3,2	3,0	2,9	2,4	2,1	
9	6,2	ND	5,8	5,5	4,8	ND	4,6	4,6	4,4	4,3	4,3	4,0	3,8	3,8	3,8	3,6	3,8	3,6	3,7	3,7	3,7	ND	3,6	3,5	3,2	3,0	3,1	2,5	3,0	2,9	2,7	2,5	2,6	2,4	2,4	2,3	
$\overline{X}$	5,70	5,50	5,30	5,10	4,90	4,80	4,80	4,70	4,60	4,50	4,40	4,20	4,10	4,00	3,80	3,70	3,70	3,70	3,70	3,50	3,00	3,30	3,40	3,20	3,20	3,10	3,00	2,70	2,90	2,80	2,70	2,60	2,40	2,40	2,10	2,10	
$\sigma$	0,63	0,72	0,78	0,76	0,80	0,78	0,78	0,72	0,74	0,75	0,73	0,72	0,68	0,64	0,61	0,68	0,63	0,68	0,63	0,59	0,70	0,55	0,50	0,44	0,51	0,47	0,44	0,39	0,38	0,40	0,40	0,37	0,29	0,24	0,22	0,15	
$\overline{X}$ do par	5,60		5,20		4,85		4,75		4,55		4,30		4,05		3,75		3,70		3,60		3,30		3,30		3,15		2,95		2,85		2,65		2,40		2,10		
Razão entre braços	1,60		1,00		1,97		1,25		1,21		1,56		1,65		1,25		1,66		1,70		1,00		1,03		1,06		1,77		1,03		1,00		1,36		1,00		
Posição do centrômero	m		m		m		m		m		m		m		m		m		m		m		m		m		sm		m		m		m		m		

ND: não determinado; m: mediano; sm: submediano