

CONTRIBUIÇÕES DA CITOGENÉTICA AO MELHORAMENTO DE PLANTAS

Cacilda Borges do Valle¹, Maria Suely Pagliarini², Liana Jank¹ e Rosângela Maria Simeão Resende¹

¹Embrapa Gado de Corte, BR 262 Km4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS; ²Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá, PR; (e-mail para contato: cacilda@cnpqg.embrapa.br)

RESUMO

A combinação da citologia envolvendo o estudo dos cromossomos e outros componentes celulares, com a genética ou estudo da herança, faz da citogenética uma ferramenta poderosa para explicar fenômenos hereditários de difícil explicação por outros meios.

Explicitar a contribuição dessa ciência para o melhoramento de plantas é descrever o próprio progresso do melhoramento nos últimos 50 anos. Desde a caracterização de ploidias, da descrição da meiose e mitose, à cariotipagem, bandeamento e identificação de alterações cromossômicas, ao desenvolvimento de linhas de adição, estudos da mutagênese e da herdabilidade por mapas de ligação, a citogenética acompanhou par e passo os sucessos na evolução dos métodos de melhoramento e produção de híbridos e variedades. Apesar da citogenética tradicional ter perdido parte do apelo inicial, a citogenética associada a métodos moleculares e ao rol de equipamentos sofisticados continua a ser uma ferramenta poderosa no arsenal do melhorista principalmente quando a planta envolvida impõe barreiras como poliploidia e infertilidade. Além disso, a citogenética é um dos belos exemplos do que a somatória de esforços multidisciplinares pode fazer pelo avanço do conhecimento: assim a bioquímica, a imunologia, a genética molecular, a microscopia eletrônica, entre outras permitiram que essa fronteira fosse expandida a ponto de permitir a manipulação das moléculas que compõe ou são

determinadas pelos cromossomos, quais sejam, o DNA, os RNA e as proteínas. Com o progresso das técnicas de coloração e mapeamento o cromossomo exibiu variações inesperadas e reveladoras permitindo a compreensão de fenômenos até então inexplicáveis.

O suporte citogenético a um programa de melhoramento como o de braquiárias (envolvendo poliploidia, hibridação interespecífica e filogenia desconhecida) tornou-se crucial não apenas para auxiliar na seleção de genitores compatíveis - determinando-se o nível de ploidia e a ausência de anormalidades meióticas que comprometam a viabilidade dos gametas - como na elucidação de problemas de fertilidade e fecundidade na produção de sementes viáveis em híbridos selecionados pelo bom desenvolvimento vegetativo.

INTRODUÇÃO

A combinação da citologia envolvendo o estudo dos cromossomos e outros componentes celulares, com a genética ou estudo da herança, faz da citogenética uma ferramenta poderosa para explicar fenômenos hereditários de difícil explicação por outros meios. Esta ciência é talvez um dos mais belos exemplos do que a somatória de esforços multidisciplinares pode fazer pelo avanço do conhecimento. Assim a bioquímica, a imunologia, a genética molecular, a microscopia eletrônica, entre outras, permitiram que essa fronteira fosse expandida a ponto de permitir a manipulação das moléculas que compõe ou são determinadas pelos cromossomos, quais sejam, o DNA, RNA e proteínas. Com o progresso das técnicas de coloração e mapeamento o cromossomo exibiu variações inesperadas e reveladoras permitindo a compreensão de fenômenos até então inexplicáveis.

As primeiras idéias sobre cromossomos surgiram no final do século XIX, quando o núcleo foi identificado como a figura central das células e o principal agente responsável pela sua divisão. Em 1865 Mendel publicou as leis de herança a partir da experimentação com plantas, apesar destas terem sido reconhecidas apenas em 1900. Nos 30 anos seguintes, muito se estudou sobre

os cromossomos e a meiose e mitose foram descritas. O início do século XX trouxe rápidos avanços como a determinação do sexo pelo cromossomo X, teorias de linkage e quiasmas, desenvolvimento de mapas de ligação. Entretanto, foi apenas a partir dos meados do século que as técnicas se modernizaram. Associadas a poderosos microscópios e equipamentos tornaram possível elucidar a molécula de DNA e a forma como esta, associada a proteínas e diferentes RNAs agem como fonte de informação codificada que controla a célula e todo o organismo vivo. Estas moléculas, apesar de imensas e complexas podem ser manipuladas hoje com relativa facilidade e confiança e até suas atividades *in vivo* podem ser duplicadas em tubos de ensaio. A microscopia eletrônica, espectroscopia, cromatografia, eletroforese, enzimas de restrição com ação específica, marcadores radioativos, cultura de tecidos, fusão de protoplastos, e principalmente uma efusão de novas idéias fazem da citogenética uma ciência extremamente dinâmica e abrangente.

Explicitar a contribuição dessa ciência para o melhoramento de plantas é descrever o próprio progresso do melhoramento nos últimos 50 anos. Apesar da citogenética tradicional ter perdido parte do apelo inicial, a citogenética associada a métodos moleculares e ao rol de equipamentos sofisticados é uma ferramenta poderosa no arsenal do melhorista principalmente quando a planta envolvida impõe barreiras como poliploidia e infertilidade. Para facilidade de exposição, os tópicos a serem discutidos foram divididos em: efeitos da ploidia sobre a reprodução, problemas de meiose e mitose na fertilidade, relações entre espécies, e biotécnicas.

NÚMERO CROMOSSÔMICO (PLOIDIA) E REPRODUÇÃO

Muitas plantas de importância agronômica apresentam variações no número de cromossomos, como o trigo que é hexaplóide, ou a alfafa – tetraplóide e grande parte das gramíneas forrageiras tropicais, como o colonião (4x) e as braquiárias com grande variação de ploidia desde 2x até 8x. A poliploidia está muitas vezes associada a problemas de pareamento

cromossômico com conseqüente comprometimento da fertilidade do pólen e formação de sementes.

A poliploidia é considerada como um evento comum na evolução das plantas. Estimativas da freqüência de espécies poliplóides entre as angiospermas oscilam entre 30-35% até 80% (Masterson, 1994; Soltis & Soltis, 2000). Apesar de freqüente, a detecção de poliploidização nem sempre é fácil.

O levantamento do número de cromossomos caracterizou os trabalhos preliminares de citologia. Entre as gramíneas, estes são conhecidos em apenas um terço (cerca de 3500) do táxon (Hunziker & Stebbins, 1986). Justamente nesta família a poliploidia é muito comum entre gêneros e até espécies do mesmo gênero. Stebbins (1985) afirma que mais de 80% dos membros sofreram poliploidização durante sua evolução histórica. As conseqüências mais comuns da poliploidia são anormalidades meióticas devido a problemas de sinapse e segregação irregular de cromossomos.

No caso de gramíneas forrageiras, a *Setaria spachelata* é um complexo poliplóide, variando de diplóide a decaplóide, e foi considerada por Hacker (1966; 1968) uma séria autotetraplóide em estágio incompleto de especiação. No gênero *Brachiaria*, constituída por cerca de 100 espécies, a poliploidia é freqüente entre espécies e acessos (Valle & Savidan, 1996; Penteado *et al.*, 2000; Bernini & Marin-Morales, 2001; Mendes-Bonato *et al.*, 2002), mas há predominância de tetraplóides ($2n=4x=36$). Detectou-se uma clara série poliplóide em *B. brizantha* com acessos di, tetra, penta- e hexaplóides (Valle & Glienke, 1991; Penteado *et al.*, 2000; Risso-Pascotto *et al.*, 2003b). Além da variação em ploidia, o gênero é predominantemente apomítico e por essas complicações e da falta de variabilidade natural em coleções de trabalho, o melhoramento genético só teve início a partir da importação de uma grande coleção africana e elucidação de características básica de reprodução (Valle & Savidan, 1996; Miles *et al.*, 2004). Os cruzamentos são interespecíficos devido à ausência de acessos tetraplóides sexuais entre as duas espécies de maior importância. Estudos recentes de híbridos interespecíficos identificaram problemas de fertilidade no pólen devido a produtos anormais da meiose

(aneuploidia, apoptose em tétrades, eliminação de genoma). Apesar de apomíticas, estas gramíneas são pseudogâmicas, portanto o endosperma necessita fecundação para o bom desenvolvimento da semente. Assim, altas taxas de inviabilidade polínica comprometem a produção de sementes viáveis, essenciais à adoção e dispersão de novas cultivares híbridas.

O suporte citogenético a um programa de melhoramento como o de braquiárias tornou-se crucial não apenas para auxiliar na seleção de genitores compatíveis - determinando-se o nível de ploidia e a ausência de anormalidades meióticas que comprometam a viabilidade dos gametas - como na elucidação de problemas de fecundidade e produção de sementes viáveis em híbridos selecionados pelo bom desenvolvimento vegetativo.

COMPORTAMENTO CROMOSSÔMICO (MEIOSE E MITOSE) E FERTILIDADE

A meiose caracteriza-se pela ocorrência de uma série de eventos mecânicos e bioquímicos que resultam na formação de quatro micrósporos haplóides. A seqüência de eventos na meiose envolve pareamento de cromossomos homólogos, ocorrência de permuta genética, formação de quiasmas e segregação cromossômica. Todos os eventos da meiose são geneticamente controlados (Golubovskaya, 1989). Mutantes meióticos descritos em plantas e animais têm revelado que o processo meiótico é controlado por um grande número de genes que operam numa ordem hierárquica (Gottschalk & Kaul, 1974; Baker *et al.*, 1976; Golubovskaya, 1979, 1989). A utilização de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* incrementou a já extensa lista de mutantes meióticos e trouxe novas contribuições para o entendimento da meiose (Chaudhury *et al.*, 1992; He *et al.*, 1996; Hülskamp *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1998).

Anormalidades típicas da poliploidia, como associações cromossômicas múltiplas na diacinese e presença de univalentes, seguidas de segregações irregulares nas fases posteriores, fazem do estudo do comportamento cromossômico uma ferramenta essencial em programas de melhoramento

envolvendo espécies e híbridos poliplóides. Essas anormalidades observadas podem novamente comprometer sensivelmente a viabilidade gamética. A análise detalhada do comportamento meiótico permite identificar genótipos problemáticos que devem ser descartados como genitores no programa de melhoramento.

Uma das conseqüências mais comuns de anormalidades meióticas é migração precoce dos cromossomos para os pólos na metáfase e retardatários levando a formação de micronúcleos que permanecem nas tétrades mesmo após a dissolução da parede de calose e liberação do micrósporo. Outras anormalidades como aderência dos cromossomos ou assincronia na divisão seguida de citocinese podem gerar produtos anômalos como políades e micrósporos anucleados. Fusões nucleares dão origem a sincícios e falhas na citocinese podem originar díades ou tríades ou ainda núcleos de restituição dando origem a gametas $2n$.

Dependendo do grau de severidade das anormalidades, o resultado pode ser completa macho-esterilidade, característica de grande utilidade em programas de melhoramento por prescindir da emasculação, mas podendo comprometer um programa que dependa da fertilização, como é o caso das apomíticas pseudógamas. Daí o grande interesse e importância do estudo do comportamento cromossômico no melhoramento de plantas.

As anormalidades encontradas em meiose de inúmeros acessos do gênero *Brachiaria* sugerem ser resultantes de mutações, algumas das quais ainda não descritas em qualquer outra espécie vegetal, representando, portanto, um material biológico muito interessante para o entendimento do controle genético da meiose. Num dos casos, uma possível mutação que afeta o “ponto de checagem do fuso” interrompendo a segunda divisão meiótica foi detectada em *B. ruziziensis* (Risso-Pascotto *et al.*, 2003a). *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk apresentou duas formas distintas de anormalidades quando coletada em diferentes épocas do ano: numa os micronúcleos formados na primeira divisão organizaram fusos na segunda divisão e sofreram citocineses adicionais que levaram à formação de micrócitos de diferentes tamanhos. Na outra, algumas

plantas apresentaram uma anormalidade envolvendo o desenvolvimento do gametófito masculino. As mitoses do grão de pólen não seguiram o padrão normal, comprometendo a formação das células vegetativa e generativa (Mendes-Bonato *et al.*, 2001; Risso-Pascotto *et al.*, 2002, 2003c).

No melhoramento de alógamas como as braquiárias, possíveis mutações originando macho-esterilidade em acessos e híbridos sexuais favoreceriam a polinização cruzada sem necessidade de isolamento ou emasculação. No entanto, algumas destas anormalidades podem determinar a eliminação de genitores nos programas de melhoramento, pois macho-esterilidade nos acessos e híbridos apomíticos resultaria em altas taxas de sementes vazias, pela falha na fecundação dos núcleos polares e conseqüente não formação do endosperma. Além disso, a macho esterilidade inviabilizaria o uso desses genótipos como futuros genitores em novos cruzamentos no programa de melhoramento.

A grande quantidade de anormalidades originais, conjugada com a alta freqüência de diferentes níveis de poliploidia, sugere que o gênero *Brachiaria* esteja, ainda, sofrendo intensamente a ação de fatores seletivos que promovem evolução, mais uma razão para envolver estudos de citogenética nas atividades do programa de melhoramento.

RELAÇÕES ENTRE ESPÉCIES

A citogenética tradicional é uma ferramenta muito útil no estudo de espécies passíveis de utilização em hibridações dentro do programa de melhoramento. O estudo do pareamento cromossômico em híbridos interespecíficos permite determinar a relação genômica entre espécies (Alonso & Kimber, 1981; Crane & Sleper, 1989). Além disso, fornece um importante ponto de partida em programas de introgressão de genes exóticos (Gale & Miller, 1987). Muitos programas têm lançado mão desta ferramenta com o objetivo de introduzir caracteres de importância agrônômica a partir de parentais selvagens das grandes culturas. A transferência é facilitada quando há

recombinação de homólogos ou homeólogos na meiose (King *et al.*, 1998). Afinidade de pareamento de cromossomos garante que, uma vez quebradas as barreiras separando as espécies, os “pools” genéticos fazem livre intercâmbio (Zwierzykowski *et al.*, 1999).

Segundo Crane & Sleper (1989), com base no relacionamento entre conjuntos cromossômicos observados em híbridos durante a meiose, pelo menos três hipóteses fundamentais podem ser feitas: a sinapse de cromossomos e a formação de quiasma estão positivamente correlacionadas à similaridade entre seqüências de DNA; os braços de cromossomos fazem sinapse independentemente, de tal forma que multivalentes possam se formar; o padrão de sinapse e freqüência de formação de quiasmas são similares entre homeólogos em um determinado híbrido.

A dificuldade na ampla utilização dessa técnica está no resultado da combinação de dois genomas distintos num híbrido interespecífico, ou seja, divisões mitóticas e meióticas com grandes aberrações. Ciclos celulares assincrônicos em mitoses de híbridos interespecíficos nos estágios iniciais de desenvolvimento do embrião foram relatados (Stutz, 1962; Gupta, 1969). No entanto, assincronia no ritmo meiótico é muito mais rara.

Como exemplo de estudos de relações entre espécies, híbridos entre *Brachiaria brizantha* (B) e *B. ruziziensis* (R) foram estudados e a predominância de pareamento em bivalentes indicou a estreita relação entre essas espécies (Risso-Pascotto *et al.*, 2005). Um pequeno número de associações múltiplas foi encontrada, porém esta informação permite antever a possibilidade de transferir genes da apomítica (B) para a sexual (R) já que uma alta taxa de recombinação pode ser esperada nos híbridos. No entanto, anormalidades observadas como segregação cromossômica irregular e aderência afetaram a viabilidade do pólen: mais de 65% dos grãos eram estéreis. O mais relevante foi a citocinese anormal indicando que os genomas parentais foram incapazes de coordenar este fenômeno citológico. O uso desses híbridos no processo de desenvolvimento de variedades ficou comprometido. Outro híbrido entre (R) e *B. decumbens* estudado teve a meiose suspensa após metáfase I (Risso-Pascotto *et al.*, 2004).

Sincícios envolvendo grande número de células foram observados em mais de 15% dos meiócitos. Citocinese anormal fracionou sincícios em produtos meióticos anômalos cobertos pela parede de pólen, apesar de conterem apenas núcleos leptotênicos. Os meiócitos portanto receberam o sinal para entrar em meiose mas faltou o sinal para seguir além de leptoteno. Neste caso, apesar dessa anormalidade atingir 15% dos meiócitos no híbrido, a esterilidade do pólen foi completa, pois ocorreram ainda outras anormalidades ligadas a poliploidia.

Um outro estudo citogenético interessante envolvendo estudos de genomas e assincronia na meiose foi realizado em dois acessos pentaplóides naturais de *B. brizantha* (Mendes *et al.*, 2005). O nível pentaplóide provavelmente se deve a um evento de hibridação entre duas espécies não muito relacionadas: um apomítico tetraplóide e uma planta sexual diplóide. A falta de afinidade entre genomas foi evidenciada pela assincronia na divisão dos dois genomas. O genoma haplóide permaneceu como univalente durante a prófase I, separou-se em cromátides após a metáfase e retardou-se na anáfase I. Nem sempre alcançou o pólo em tempo de ser incluído no núcleo telofásico. Mesmo quando alcançou, permaneceu isolado e alterou o formato do núcleo. Esses acessos podem ser considerados alo-autotetraplóides com o genoma de *B. brizantha* tetraplóide e um genoma diplóide exótico com pouca afinidade. Pela similaridade em assincronia observada anteriormente em um híbrido triplóide entre *B. brizantha* e *B. ruziziensis* (R), sugeriu-se como parental diplóide uma planta de (R).

Em *Paspalum subciliatum* (Adamowski *et al.*, 1998), provavelmente um anfidiplóide natural ($2n=4x-40$), também foi observado assincronia entre os dois genomas na meiose e o genoma retardatário terminou eliminado. Uma correlação positiva entre eliminação de cromossomos e distância genética entre espécies foi relatada em Brassicaceae (Sundberg & Glimelius, 1991).

Híbridos F_1 interespecíficos e intergenéricos são normalmente estéreis devido a genomas divergentes e cromossomos sem afinidade que podem formar um pequeno número de sinapses nos bivalentes. Pareamento normal de

cromossomos e fertilidade são recuperadas pela duplicação de cromossomos. Daí a maioria de alopoliplóides serem tetra- ou hexaplóides (Singh, 1993). Alopoliplóides são ocasionalmente encontrados na natureza como ocorrências espontâneas e transientes e muito raramente como apomíticos estabelecidos (Sybenga, 1992).

A importância de alopoliplóides para o melhoramento de plantas é principalmente como material experimental para a análise de relações genômicas e para a introdução de genes de interesse. No entanto, devido a composição desbalanceada do genoma estes tendem a ser estéreis devido à meiose e desenvolvimento anormais. A progênie, se houver, também apresentará constituição cromossômica anormal caso não seja de origem partenogênica. Daí a limitação do uso em programas de melhoramento como intermediários na transferência de genes ou na construção de sistemas genéticos especiais. Por outro lado, a segregação de tipos inéditos é a grande oportunidade para selecionar progênies com combinações cromossômicas desejáveis (Sybenga, 1992).

BIOTÉCNICAS

Muito tem sido alardeado quanto ao valor da biotecnologia na solução de problemas no melhoramento tradicional e desenvolvimento de novas variedades. No entanto, o grande ganho em produtividade e adaptação das novas variedade de culturas resultou de esforços das equipes de melhoristas. Um programa de melhoramento em andamento pode sim usufruir das tecnologias disponíveis e tornar mais eficiente e eficaz a seleção de genótipos, seja pela identificação de modo de ação de determinados genes ou pela introgressão de genes de interesse e sua detecção por mapas genômicos. Como discutido por Ramalho (2004), o ideal é reunir as equipes de melhoristas e biotecnólogos num sólido programa de melhoramento e redistribuir os recursos para uma atuação coordenada e de suporte mútuo. É com preocupação que o autor comenta a redução no número de profissionais treinados em melhoramento clássico em favor de interessados em métodos moleculares e engenharia genética.

Técnicas como a fusão de protoplastos, ou mutagênese ainda não causaram o impacto prometido na produção de alimentos. Portanto é prematuro descartar o melhoramento tradicional e o suporte da citogenética na elucidação dos fenômenos identificados nas progênes. O mapeamento de cromossomos e construção de mapas genéticos de ligação usando ou não a sintenia entre famílias, gêneros e espécies, podem se tornar muito interessantes para o melhoramento de características qualitativas ou oligogênicas. Para algumas características quantitativas de grande expressão como valor nutritivo e produtividade, porém, o melhoramento tradicional e a persistente acumulação de alelos, desde que factível, poderá resultar em cultivar melhorada de forma mais garantida e eficiente.

Da mesma forma que melhoristas tradicionais estão em falta, citogeneticistas são também raros no meio acadêmico e profissional. Há, atualmente, uma grande procura dos jovens por programas de pós-graduação que abordam técnicas moleculares, em detrimento da citogenética clássica, o que deverá agravar ainda mais o panorama para o futuro próximo.

Finalmente, a grande contribuição da citogenética ao melhoramento de plantas advém da possibilidade de solucionar problemas identificados e não explicáveis no andamento do programa e da produção das progênes. A citogenética é especialmente valiosa no caso de culturas não domesticadas, com ainda poucas informações básicas disponíveis como número cromossômico e afinidade entre espécies, e onde técnicas de hibridação tradicionais não podem ser aplicadas.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, L.C.; KIMBER, G. The analysis of meiosis in hybrids. II. Triploid hybrids. **Can. J. Genet. Cytol.** 23:221-234. 1981.
- ADAMOWSKI E.V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sex. Plant Reprod.** 11: 272-276. 1998.

- BAKER, B. S.; CARPENTER, A. T. C.; ESPOSITO, M. S.; ESPOSITO, R. E.; SANDLER, L. The genetic control of meiosis. **Annu. Rev. Genet.**, 10: 53-134, 1976.
- BERNINI, C. ; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios** 104: 157-171. 2001.
- CHAUDHURY, A. M.; CRAIG, S.; BLOEMER, K. C.; FARRELL, L.; DENNIS, E. S. Genetic control of male fertility in higher plants. **Aust. J. Plant Physiol.**, 19: 419-426, 1992.
- CRANE, C.F.; SLEPER, D.A. A model of meiotic chromosome association in triploids. **Genome** 32:82-89. 1989.
- GALE, M.D.; MILLER, T.E. The introduction of alien genetic variation into wheat. In: Lupton FGH (ed.) **Wheat Breeding**. Its Scientific Basis. Chapman & Hall, London, pp 173-210. 1987.
- GOLUBOVSKAYA, I. N. Genetic control of meiosis. **Int. Rev. Cytol.**, 5: 247-290, 1979.
- GOLUBOVSKAYA, I. N. Meiosis in maize: *mei* genes and conception of genetic control of meiosis. **Adv. Genet.**, 26:149-192, 1989.
- GOTTSCHALK, W.; KAUL, M. L. H. The genetic control of microsporogenesis in higher plants. **The Nucleus**, Calcutta, v. 17, p. 133-166, 1974.
- GUPTA, S.B. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and a hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. **Can. J. Genet. Cytol.** 11:133-142. 1969.
- Hacker, J.B. 1966. Cytological investigations in the *Setaria sphacelata* complex. **Aust. J. Agric. Res.** 17:297-301.
- Hacker, J.B. 1968. Polyploid structure in the *Setaria sphacelata* complex. **Aust. J. Bot.** 16:539-544.
- HE, C.; TIRLAPUR, U.; CRESTI, M.; PEJA, M.; CRONE, D. G.; MASCARENHAS, J. P. An *Arabidopsis thaliana* mutant showing aberrations in male meiosis. **Sex. Plant Reprod.**, 9: 54-57, 1996.

- HÜLSKAMP, M.; KOPCZAK, S. D.; HOREJSI, T. F.; KILH, B. K.; PRUIT, R. E. Identification of genes required for pollen-stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*. **Sex. Plant Reprod.**, 8: 703-714, 1995.
- HUNZIKER, J.H.; STEBBINS, G.L. Chromosomal evolution in the Gramineae. In: **Grass: Systematics and Evolution**. Soderstrons, T.R. *et al.* (eds). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 179-187. 1986.
- KING, I.P.; MORGAN, W.G.; ARMSTEAD, I.P.; HARPER, J.A.; HAYWARD, M.D.; BOLLARD, A. Introgression mapping in the grasses. I. Introgression of *Festuca pratensis* chromosomes and chromosome segments into *Lolium perenne*. **Heredity** 81:462-467. 1998.
- MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science** 264: 421-423. 1994.
- MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; FORLI, F.; VALLE, C. B. do; PENTEADO, M. I. O. Chromosome number and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica** 125: 419-425. 2002.
- MENDES-BONATTO, 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 (2): 619-625. 2001.
- MENDES, D.V.; BOLDRINI, K. R.; MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B.do. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). **Bot. J. Linn. Soc.** (submetido, 2005)
- MILES, J.W.; VALLE, C. B. do; RAO, I. M.; EUCLIDES, V. P. B. **Brachiariagrasses**. In: L.E. Sollenberger, L. Moser, B. Burson (eds). Warm-season (C4) grasses. Agronomy monograph, 45. ASA- CSSA-SSSA, Madison. 2004. pp 745-783.
- PENTEADO, M.I.O.; SANTOS, A.C.M.; RODRIGUES, I.F.; VALLE, C.B. do; SEIXAS, M.A.C.; ESTEVES, A. Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. Boletim de Pesquisa 11, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS. 32 p. 2000.

- RAMALHO, M.A.P. Genetic improvement and agribusiness in Brazil. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, 4: 127-134. 2004.
- RISSE-PASCOTTO, C.; MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Comportamento citológico atípico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 16. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2003a.
- RISSE-PASCOTTO, C., PAGLIARINI, M.S.; VALLE CB, MENDES-BONATO AB. Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breed.**, 122: 136-140. 2003b.
- RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. **Genome**, 46:724-728, 2003c.
- RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Abnormal nucleolar cycle in microsporogenesis of *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Cytologia**, 67(4): 355-360, 2002.
- RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do; JANK, L. Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. **Plant Cell Rep.**, 22: 945-950, 2004.
- RISSE-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Euphytica** (submitted 2005).
- SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. CRC Press, Inc., 111-254.1993.
- SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Science* **97**: 7051-7057. 2000.
- STEBBINS, G.L. Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. **Ann. Miss. Bot. Garden**, 72: 824-832. 1985.
- STUTZ, H.C. Asynchronous meiotic chromosome rhythm as a cause of sterility in *Triticale*. **Genetics** 48:988. 1962.

- SUNDBERG, E.; GLIMELIUS, K. Effects of parental ploidy and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. **Theor. Appl. Genet.** 83:81-88. 1991.
- SYBENGA J. **Cytogenetics in Plant Breeding**. Springer-Verlag, Berlin, 469 p. 1992.
- TAYLOR, P. E.; GLOVER, J. A.; LAVITHIS, M.; CRAIG, S.; SINGH, M. B.; KNOX, R. B.; DENNIS, E. S.; CHAUDHURY, A. M. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analyses of postmeiotic developmental mutants. **Planta**, 205: 492-505, 1998.
- 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***. Colombia: CIAT, 147-163. 1996.
- VALLE, C.B.do; GLIENKE, C. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apom. Newsl.**, 3:11-13. 1991.
- ZWIERZYKOWSKI, Z.; LUKASZEWSKI, A.J.; NAGANOWSKA, B.; LESNIEWSKA, A. The pattern of homoeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. **Genome** 42:720-726.1999.