

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÕES CITOEMBRIOLÓGICAS, COMPORTAMENTO MEIÓTICO E
ESTIMATIVA DE FERTILIDADE DE PLANTAS POLIPLOIDIZADAS DE
*Paspalum notatum***

KARINE CRISTINA KRYCKI
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia
Área de concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Krycki, Karine Cristina
AVALIAÇÕES CITOEMBRIOLÓGICAS, COMPORTAMENTO MEIÓTICO
E ESTIMATIVA DE FERTILIDADE DE PLANTAS
POLIPLOIDIZADAS DE *Paspalum notatum* / Karine
Cristina Krycki. -- 2015.
50 f.

Orientadora: Carine Simioni.
Coorientador: Miguel Dall'Agnol.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. *Paspalum notatum*. 2. Melhoramento de plantas
forrageiras. 3. Avaliações citoembriológicas. 4.
Comportamento meiótico. I. Simioni, Carine , orient.
II. Dall'Agnol, Miguel, coorient. III. Título.

KARINE CRISTINA KRYCKI
Engenheira Agrônoma

DISSERTAÇÃO

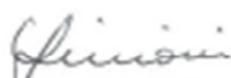
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

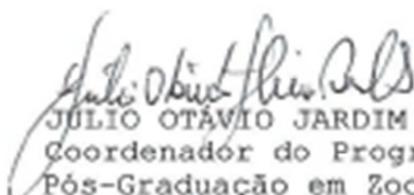
MESTRA EM ZOOTECNIA

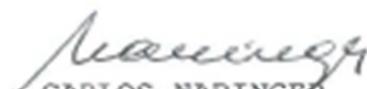
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 05.03.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 22.04.2015
Por


CARINE SIMIONI
EPG Zootecnia/UFRGS
Orientador


JULIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


CARLOS NABINGER
PPG ZOOTECNIA-UFRGS


ROBERTO LUIS WEILER
IRGA - Porto Alegre/RS


ELAINE BIONDO
UERGS - Teotônia/RS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

DEDICATÓRIA

Para Angela, Sthéfany e João
por estarem sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Sou grata à natureza, de onde viemos e para onde retornaremos assim que findar nossa jornada, esta que nos supre enquanto seres vivos em todas as nossas necessidades de alimento, abrigo e espiritualidade.

Agradeço aos meus pais Angela e Mario que me trouxeram à vida, principalmente à minha mãe que me gerou duas vezes, em seu ventre e através do incentivo aos meus estudos, sou eternamente grata por estes dois nascimentos e por toda batalha empreendida por ti contra a ignorância e demais agruras da vida. A minha irmã querida Sthéfany, sempre guerreira batalhando por uma vida melhor e não se conformando com menos do que lhe é de direito, obrigada por ser um exemplo de vontade e luta. À minha avó Maria Magdalena por sempre nos incentivar o prazeroso e educativo hábito da leitura através do seu exemplo. Ao meu esposo João Garibaldi, homem ímpar, companheiro em todos os momentos e comprometido com a causa da educação, candeia a iluminar o meu caminho, meu agradecimento por ser quem és.

À professora Carine Simioni, pela orientação, conversas e ensinamentos valiosos durante esta jornada, por sempre me tranquilizar nos momentos mais difíceis, sou grata por tudo, principalmente pela amizade. Ao professor Miguel Dall’Agnol pela co-orientação neste trabalho e pelos ensinamentos. À professora Maria Teresa pelos valiosos conhecimentos transmitidos e incentivo. À professora Lúcia Franke pela disponibilização do laboratório de sementes e ao pós-doutorando Rodrigo pelo auxílio com a germinação das sementes dos híbridos. A todos professores pelos quais passei desde a graduação na Faculdade de Agronomia UFRGS, que me fizeram ver o mundo com outros olhos e com mais esperança de um futuro melhor para todos.

Aos colegas da pós-graduação, Kátia, Karla, Mariana, Éder, Marlon, Cleber, Larissa e demais colegas do PPG-Zootecnia pelos cafés, mates e conversas nos bons e nem tão bons momentos. Ao Roberto Weiler por ter começado a iniciação científica ajudando-o e tendo a oportunidade de aprender ainda mais. Aos colegas da graduação, Fernanda, Fabiele, Melissa, Janaína, Samanta, Jeferson, Willian e demais amigos pelas aulas compartilhadas e pelos momentos de lazer que tivemos juntos durante tantos anos, nunca esquecerei de vocês, moram sempre no meu coração. Aos bolsistas Marília, Miguel, Amanda e Jonathas pela ajuda em diversas fases deste trabalho, muito obrigada.

Agradeço a CAPES pela bolsa de mestrado durante estes dois anos de curso, possibilitando que eu pudesse ainda realizar outros sonhos.

Espero que as bênçãos da natureza sejam derramadas sobre todos vocês hoje e sempre, trazendo felicidade, paz e prosperidade.

Avaliações citoembriológicas, comportamento meiótico e estimativa de fertilidade de plantas poliploidizadas de *Paspalum notatum*¹

Autor (a): Karine Cristina Krycki

Orientador (a): Carine Simioni

Entre as diversas espécies de plantas forrageiras, destaca-se *Paspalum notatum* Flugge, uma das mais importantes nas pastagens nativas do sul do Brasil. Os ecótipos nativos são autotetraplóides, reproduzindo-se através apomixia. Porém, a variedade *Paspalum notatum* (cultivar Pensacola) é diplóide de reprodução sexual e pode ser usada em cruzamentos com plantas apomíticas após duplicação cromossômica. O objetivo deste trabalho foi avaliar genótipos poliploidizados quanto ao modo de reprodução, comportamento meiótico e estimar a fertilidade masculina e feminina. Três plantas diploides de reprodução sexual da cv. Pensacola tiveram seu número cromossômico duplicado artificialmente. A planta WKS 3 apresentou modificação em seu modo de reprodução após a duplicação, que passou a ser apomítico. Já as plantas WKS 63 e WKS 92 confirmaram o modo de reprodução sexual idêntico ao genótipo de origem. As plantas analisadas WKS 3, WKS 63 e WKS 92 apresentaram anormalidades meióticas relacionadas à poliploidia, entretanto essas anormalidades não comprometeram os produtos meióticos, que foram predominantemente tétrades regulares e satisfatória fertilidade polínica, variando de 88,7 a 95,7%. O pareamento cromossômico na fase da diacinese foi variável entre as plantas: WKS 3 apresentou associações predominantemente bivalentes com esporádicas associações quadrivalentes, WKS 92 mostrou associações bivalentes, trivalentes e tetravalentes e associações quadrivalentes, enquanto que na planta WKS 63, houve predomínio de associações quadrivalentes. As plantas WKS 63 e WKS 92 apresentaram baixa fertilidade feminina, indicando que a duplicação cromossômica pode afetar esta característica. Estas plantas duplicadas, juntamente com outros genótipos da espécie, previamente selecionados e os ecótipos apomíticos elite do Rio Grande do Sul, foram utilizadas em esquemas de cruzamentos intraespecíficos. A obtenção de híbridos segregantes abriu um grande leque de possibilidades para o melhoramento de plantas forrageiras, melhorando a composição do campo nativo, podendo corroborar com a conservação dos campos sulinos, evitando sua degradação, bem como sendo uma nova opção para a pecuária do sul do país, através da utilização de materiais bem adaptados, diversificando a produção forrageira. Além disso, podendo gerar materiais que possam ser utilizados na recuperação de áreas degradadas. Novos genótipos apomíticos, gerados através de hibridações e que tenham potencial agrônomo poderão ser registrados e protegidos no Serviço Nacional de Proteção de Variedades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Palavras chave: análises citogenéticas, cruzamentos intraespecíficos, duplicação cromossômica, melhoramento genético.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.(49p.) Março. 2015

Cytoembriological evaluation, meiotic behavior and estimated of fertility of *Paspalum notatum* poliploidized plants¹

Author: Karine Cristina Krycki

Adviser: Carine Simioni

Among the various species of forage plants, *Paspalum notatum* Flugge is one of the most important native grassland species of southern Brazil. The native ecotypes are tetraploid and have apomictic reproduction. However, the variety *Paspalum notatum* (cultivar Pensacola) is diploid and sexual and they can be used in crosses with apomictic plants after chromosome duplication. The objective of this study was to evaluate polyploidized genotypes as the mode of reproduction, meiotic behavior, pollen viability and to evaluate male and female fertility. Three diploid and sexual plants of cultivar Pensacola had chromosome number artificially duplicate. The WKS 3 plant showed change in mode of reproduction after duplication, which became apomictic. And the plants WKS 63 and WKS 92 confirmed sexual reproduction mode like the original genotype. The analyzed plants WKS 3, WKS 63 and WKS 92 presented abnormalities related to polyploidy, however, the abnormalities observed did not compromise the meiotic products which were characterized by regular tetrads and satisfactory pollen fertility varying from 88.7 to 95.7%. Chromosome paired at diakinesis were variable among plants: WKS 3 presented predominantly quadrivalents associations, WKS 92 presented bivalents, trivalents and tetravalents associations and the plant WKS 63, predominantly presented quadrivalents associations. The plants WKS 63 and WKS 92 had low female fertility, showing that chromosome duplication can affect this trait. These duplicate plants along with other genotypes of species previously selected and the elite apomictic ecotypes of Rio Grande do Sul were used in intraspecific crosses. Obtaining hybrids segregating opened a wide range of possibilities for the improvement of forage plants, improving natural pasture composition, can be corroborate with the conservation of the southern fields, preventing its degradation, as well as being a lever for livestock in the South of the country, with the use of materials well suited, diversifying the forage production. Also, can generate materials that can be used in the recovery of degraded areas. New apomictic genotypes produced, generated across the hybridization, with agronomic potential, will can be registered and licensed by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil (MAPA).

Key words: chromosome duplication, cytogenetic analysis, genetic breeding, intraspecific crosses.

¹ Master of Science dissertation in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (49p.) March, 2015.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Os campos do Rio Grande do Sul	12
2.2. O gênero <i>Paspalum</i>	13
2.3. A espécie <i>Paspalum notatum</i>	14
2.4. Poliploidia e Apomixia em <i>P. notatum</i>	15
2.5. Avaliações citogenéticas e citoembriológicas como ferramenta para o melhoramento genético	17
2.6. A escolha de genitores para programas de hibridação visando o melhoramento genético	18
2.7. Melhoramento em <i>P. notatum</i>	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Análises Citoembriológicas	22
4.2. Análises Citogenéticas.....	22
4.3. Análise de Viabilidade Polínica	23
4.4. Avaliação da Fertilidade Feminina	23
4.5. Cruzamentos intraespecíficos.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Análises do modo de reprodução	25
5.2. Análises do comportamento meiótico	28
5.3. Análises de viabilidade polínica e fertilidade feminina	34
5.4. Hibridações intraespecíficas	36
6. CONCLUSÕES	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9. VITA	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Aspecto citoembriológico de um ovário sexual da planta duplicada WKS 63, Antípodas (1) e núcleos polares (2), observado em microscópio de contraste interferencial.....27
- Figura 2. Aspecto citoembriológico de um ovário apomítico da planta duplicada WKS 3, com sacos múltiplos (setas), observado em microscópio de contraste interferencial.....27
- Figura 3. Aspectos meióticos da planta poliploidizada WKS63.....31
- Figura 4. Aspectos meióticos da planta poliploidizada WKS 92.....31
- Figura 5. Aspectos meióticos da planta poliploidizada WKS 3.....32
- Figura 6. Câmara de hibridação com umidificador ambiental utilizada nos cruzamentos.....38
- Figura 7. Plântulas da progênie F1 obtida dos cruzamentos em casa de vegetação (27/10/2014).....39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Número e porcentagem (%) de sacos meióticos (S), apomíticos (A), indefinidos (I), atrofiados (At), total de ovários analisados (T) e modo de reprodução (MR) das plantas tetraploides induzidas de *Paspalum notatum*.....26
- Tabela 2. Configurações meióticas na fase de diacinese (prófase I) das três plantas tetraploidizadas de *P. notatum*.....29
- Tabela 3. Anormalidades meióticas registradas nas três plantas poliploidizadas de *P. notatum*.....34
- Tabela 4. Avaliação da viabilidade polínica em plantas tetraploides induzidas de *P. notatum* e genitores utilizados nos cruzamentos.....36
- Tabela 5. Família, número (Nº) de flores polinizadas, número (Nº) de sementes viáveis, porcentagem de sementes obtidas e número (Nº) de sementes germinadas obtidas dos cruzamentos.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviatura	Descrição
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
Cv	Cultivar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAA	Formalin – Acetic Acid – Alcohol
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
µm	Micrômetro
ml	Mililitro
Nº	Número
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

O cenário dos sistemas pastoris é de degradação rápida das pastagens de gramíneas e a falta de novas cultivares para repor as antigas (Valle, 2002). Historicamente, a região dos Campos Sulinos não foi tratada como área prioritária para conservação, assim como outras formações não florestais no Brasil (Overbeck et al. 2007). O manejo inadequado pela falta de conhecimentos técnicos por parte dos pecuaristas também têm contribuído para a deterioração das pastagens ao longo do tempo.

Segundo Barreto (1974), as espécies do gênero *Paspalum*, no Rio Grande do Sul, são frequentes e numerosas constituindo componentes obrigatórios de todas as formações campestres. Praticamente não se consegue identificar uma formação vegetal brasileira sem que haja uma espécie de *Paspalum* fazendo parte de seus componentes. A grande variabilidade genética disponível favorece projetos de melhoramento, visando à obtenção de cultivares mais adaptadas a determinados nichos ecológicos (Batista & Neto, 2000).

Uma das espécies mais comuns no sul do Brasil é *Paspalum notatum*, popularmente conhecido como grama-forquilha, e sua importância como forrageira subtropical é amplamente aceita, apresentando boa qualidade de forragem, alta resistência ao pastejo e ao pisoteio dos animais (Pozzobon & Valls, 1997). Essa espécie foi destacada entre as conhecidas “plantas para o futuro” devido às suas características, ou seja, espécies nativas com potencial de inserção na matriz agrícola para fins variados (Valls et al., 2009).

O germoplasma nativo do estado do Rio Grande do Sul de *P. notatum* é predominantemente tetraploide e mostra características de linhagens apomíticas, o que limita sua exploração em programas de melhoramento. Foram identificados genótipos diploides de reprodução sexual na espécie, o que expande o potencial de utilização em programas de melhoramento genético. Trabalhos de duplicação cromossômica artificial em genótipos diploides sexuais foram realizados com a finalidade de utilizá-los em esquemas de hibridações intraespecíficas, desta forma possibilitando a ampliação da base genética da espécie e permitindo explorar genótipos adaptados à Região Sul e que apresentem características agrônômicas superiores para serem conservados pela apomixia.

Quarin et al. (2001) e Weiler et al. (2015), em trabalhos independentes, produziram plantas tetraploides sexuais a partir de plântulas diploides da cultivar Pensacola ($2n=2X=20$) de *P. notatum* através da aplicação de colchicina para duplicação dos cromossomos. Os genótipos daí resultantes constituem a base do programa de melhoramento desta espécie no Programa de Melhoramento de Plantas Forrageiras da Faculdade de Agronomia (UFRGS).

Primeiramente, Weiler et al. (2011a, b) utilizou as plantas duplicadas por Quarín et al. (2001), nominadas Q4188, Q4205 e C44X em esquemas de cruzamentos com os ecótipos nativos “Bagual” e “André da Rocha” da espécie. O trabalho gerou uma progênie híbrida que foi avaliada agronomicamente a campo, sendo selecionados genótipos superiores em termos de produção de matéria seca. Em seguida, Risso-Barbosa (2014) confirmou o valor agrônômico destas plantas selecionadas. No presente trabalho, os genótipos híbridos avaliados, que confirmaram as características agrônômicas superiores foram utilizados em novos esquemas de cruzamentos intraespecíficos.

Paralelamente, as plantas tetraploides obtidas por Weiler et al. (2015), após serem clonadas e mantidas em casa de vegetação, foram avaliadas quanto ao modo de reprodução, estabilidade meiótica e viabilidade polínica e este foi o objetivo principal do presente trabalho. Após, estas foram utilizadas como genitores nos esquemas de hibridações intraespecíficas que foram realizadas dentro do programa.

Em etapas posteriores a esta, a progênie híbrida obtida também será avaliada quanto às condições reprodutivas (determinação do modo de reprodução) e de fertilidade e mais adiante, serão multiplicadas e levadas ao campo, onde serão avaliadas para comprovar o valor agrônômico. Com isto, espera-se aumentar a variabilidade genética disponível para seleção nas populações de *P. notatum*. Esta Instituição de ensino e pesquisa tem como foco o melhoramento de espécies nativas, dentro do qual se insere *P. notatum*. A duplicação cromossômica, hibridação e a produção de híbridos intraespecíficos superiores que possam ser registrados e protegidos junto ao MAPA para o lançamento de cultivares representa um enorme avanço na pesquisa gaúcha com plantas forrageiras nativas.

A adoção de espécies forrageiras adaptadas às características locais permite um manejo mais facilitado e uma maior estabilidade produtiva, conservação dos recursos genéticos naturais e redução dos custos e riscos da atividade, redundando na sustentabilidade do sistema (Townsend, 2008). Desta forma, podemos concluir que as variedades melhoradas contribuirão para o progresso da pecuária e para a conservação dos campos do sul do país, sendo utilizadas como alternativa pelos produtores e também para recuperação de áreas degradadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Os campos do Rio Grande do Sul

A história dos campos no sul do Brasil, incluindo sua origem, desenvolvimento, distribuição, composição e biodiversidade, assim como o papel do fogo e do impacto humano, têm sido estudadas apenas recentemente. Variações espaciais e temporais dos biomas campestres nos trópicos e subtropicais, assim como alterações nos limites entre campo e floresta e mudanças florísticas da vegetação campestre, são eventos importantes que contribuem para o entendimento. Os ecossistemas de campos subtropicais do Brasil apresentam alta biodiversidade e são o tipo de vegetação predominante em algumas áreas da região sul. Uma vegetação em forma de mosaico campo-floresta, que ainda apresenta certo aspecto natural, pode ser encontrada em algumas regiões menos degradadas, apesar das massivas alterações na paisagem que têm ocorrido pela conversão dos habitats para agricultura e silvicultura (Behling et al., 2009).

O Estado do Rio Grande do Sul apresenta, em seu campo nativo, diversas espécies com potencial e qualidade forrageira, destacando-se as do gênero *Paspalum* L., que são componentes obrigatórios em todas as formações campestres, englobando o maior número de espécies nativas e também reunindo a maior porcentagem daquelas com qualidade forrageira (Valls, 1987).

A pastagem nativa é fundamental na conservação do solo e da água através da cobertura vegetal, regulação do clima, reciclagem de nutrientes, biodiversidade aos agroecossistemas e fornecedora de germoplasma nativo, entre outros. Espécies forrageiras nativas do Estado do Rio Grande do Sul desempenham um papel importante na atividade pecuária, representando o maior recurso utilizado para a produção de bovinos de corte.

Quanto à diversidade da pastagem natural no Bioma Pampa, Nabinger (2006) relatou que, além de ser um patrimônio genético fantástico e raramente encontrado em outros ecossistemas pastoris do planeta, esta diversidade promove uma dieta diversificada para o animal, conferindo características particulares ao produto final obtido. Entretanto, o cenário atual do ecossistema pastagem natural é preocupante e atualmente o que se vê é a degradação do campo nativo, através de processos de erosão, avanço da fronteira agrícola, da desertificação, dentre outros. O avanço da implantação de árvores exóticas fornecedoras de celulose também se apresenta como fenômeno que está levando a diminuição da área de campo nativo.

Estimativas da área remanescente coberta pelas pastagens naturais mostram que está ocorrendo uma diminuição em alta velocidade da área pastoril coberta com espécies de relevante valor forrageiro, ocorrendo aumento das lavouras anuais em detrimento das pastagens naturais, com perda de

biodiversidade e de vários serviços prestados pelo ecossistema (Carvalho, 2006). A área de pastagens naturais do Rio Grande do Sul foi reduzida em cerca de 49%, ocupando 23,03% da área total do estado, segundo Hasenack et al.(2007).

De acordo com Carvalho et al. (2006), os cultivos anuais aumentaram em cinco milhões de hectares entre 1985 e 1995-1996, estimando-se que a soja tenha ocupado aproximadamente 250.000 ha de pastagens naturais somente em 2002. A perda de área de pastagens naturais representa um risco para a fauna e flora características deste habitat. Segundo Bilenca & Miñarro (2004), as pastagens naturais do ecossistema Campos tem decrescido a taxas de 3,6; 7,7 e 11,9 % na Argentina, Uruguai e Brasil, respectivamente. Notadamente, no Brasil, a taxa de decréscimo é a mais alta dentre os países que abrangem o Bioma Pampa. Desta forma, iniciativas para a conservação vistas pelos olhos dos mais afetados são sumamente importantes para a conservação e exploração sustentável desse sistema.

Overbeck et al. (2007) afirmam também serem necessários mais dados relativos ao impacto das plantações sobre a flora e fauna no sul do Brasil. Em relação à fauna, é sabido que os campos servem de abrigo para diversas espécies. Bencke (2009) afirma que os campos constituem o habitat principal de uma grande parcela da fauna do sul do Brasil e, em especial, do Rio Grande do Sul, onde 25 das cerca de 96 espécies de mamíferos continentais habitam campos; entre as aves, 120 espécies nativas continentais (21% do total) são primariamente adaptadas a esse habitats campestres. Vinte e uma espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul são usuárias obrigatórias de campos e dependem diretamente desse sistema, mostrando a importância da sua conservação.

Carvalho et al. (2006) comentam que o fenômeno mais preocupante atualmente em curso é a invasão do campo nativo por exóticas indesejáveis como o capim anonni (*Eragrostis plana*-Nees 2), no que diz respeito à degradação das pastagens naturais, sendo que esta espécie é uma gramínea invasora, de origem Sul Africana, que tem baixa palatabilidade, alta produção de sementes e possui alelopatia.

Diante do que foi relatado, surge a necessidade de recuperação do campo nativo. O grande obstáculo encontrado para isso é a falta de sementes de espécies nativas comercializáveis. Sendo assim, o melhoramento de espécies forrageiras nativas é de vital importância para que estas sementes estejam disponíveis para que os produtores possam acessar. Dentro desta linha de pensamento, *Paspalum notatum* se faz notar por seu grande valor nutricional para os animais e por sua persistência devido a seus rizomas supraterrâneos, além de se propagar com facilidade por imensas extensões e cobrir áreas extensas, sendo uma alternativa na recuperação de áreas degradadas.

2.2. O gênero *Paspalum*

O gênero *Paspalum* L. encontra-se entre os mais importantes da tribo Paniceae (subfamília Panicoideae), família Poaceae, sendo que suas espécies se destacam entre as gramíneas brasileiras por englobar o maior número de espécies com bom valor forrageiro (Valls, 1987). No Rio Grande do Sul, as espécies de *Paspalum* estão distribuídas em todas as regiões

fisiográficas e fazem parte de todas as formações campestres (Barreto, 1974). Foram estimadas cerca de 400 espécies para o gênero, as quais ocorrem em regiões tropicais a temperadas, de ambos os hemisférios (Chase, 1929). Referências mais atuais estimam cerca de 220 espécies (Valls & Pozzobon, 1987) e em 315 espécies (Zuloaga et al., 2004) para o gênero. Barreto (1974) relatou a importância deste gênero através de um levantamento florístico no Estado do Rio Grande do Sul. O autor apontou aproximadamente 300 espécies, sendo que 56 destas são nativas do Estado. Segundo o mesmo autor, 75% das espécies de *Paspalum* ocorrem no Brasil, em uma imensa gama de condições ecológicas.

Seus inúmeros ecótipos apresentam adaptações às mais variadas condições de solo e clima e apresentam características morfológicas muito variadas quanto ao tamanho e espessura do rizoma, tamanho das flores e das inflorescências, rendimento e qualidade (Nabinger & Dall'Agnol, 2008). A importância do gênero é evidenciada por sua adaptabilidade a diferentes ecossistemas, representando menor risco de causar desequilíbrio biológico devido à grande diversidade genética existente (Strapasson et al. 2000). As espécies apresentam ampla distribuição em ambientes diversificados, predominam em solos bem drenados e suportam baixa fertilidade natural (Kaminski et al., 1998).

De acordo com Batista (2005), o banco ativo de germoplasma de *Paspalum* (BAG- *Paspalum*), localizado no município de São Carlos no Estado de São Paulo, tem a finalidade de preservar, multiplicar e caracterizar acessos, para que possam ser usados na pesquisa e melhoramento genético. Este tipo de coleção tem uma importante função que é municiar os pesquisadores de materiais para que possam realizar suas pesquisas, tendo acesso a diferentes variedades, cultivares e espécies do gênero.

2.3. A espécie *Paspalum notatum*

Entre as diversas espécies destaca-se, como forrageira, *Paspalum notatum* Flugge (grama forquilha), uma das mais importantes espécies das pastagens nativas do sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sul do Paraguai (Quarín et al., 1984). A maioria dos biótipos de *P. notatum* são autotetraploides ($2n=4x=40$) e se reproduzem através de apomixia do tipo aposporia com pseudogamia (Forbes & Burton, 1961). Na apomixia pseudogâmica, apesar de o pólen do doador não contribuir com material genético, há a necessidade de produção de pólen viável para que ocorra a fecundação do endosperma.

Uma raça diploide sexual ($2n=2x=20$), Capim Pensacola (*Paspalum notatum*), nativa do nordeste e centro-oeste da Argentina foi descrita. A forma diploide é sexual e meioticamente estável, alógama e autoincompatível (Burton, 1946; Forbes e Burton, 1961).

O Capim Pensacola é de estação quente e apresenta a maior produção de forragem em temperaturas médias superiores a 15°C. Sob efeito de fotoperíodo estendido no inverno, esta cultivar apresentou um aumento na produção de forragem de 3,6 vezes em comparação com outros tratamentos que não estabeleceram este mesmo efeito (Sinclair et al., 2001). No Rio Grande do Sul, o capim Pensacola se destacou principalmente na região do

Planalto, daí a importância de ser comparada sob ponto de vista de produção e valor forrageiro com os ecótipos nativos (Dall'Agnol et al., 2006).

P. notatum var. *notatum* (ecótipos tetraploides, apomíticos) tem seu centro de origem no sul do Brasil, norte da Argentina e Paraguai (Parodi, 1937). No Rio Grande do Sul, formas tetraploides (possivelmente todas apomíticas) são predominantes (Pozzobon & Valls, 1997; Dahmer et al., 2008). O melhoramento de linhagens tetraploides tem, ao longo do tempo, estado limitado à identificação e seleção de genótipos superiores. Isso ocorre porque a apomixia dificulta o melhoramento genético e por isso é necessário buscar alternativas para aumentar seu potencial.

A estreita base genética dos acessos de *P. notatum* disponíveis para os produtores acessarem pode representar um problema para as pastagens nativas, onde esta espécie predomina. A adaptação pode ser dificultada em ambientes divergentes (temperaturas extremas) e há riscos onde agentes bióticos, especialmente pragas e doenças, ameacem o desenvolvimento, a produção e a persistência (Adamowski et al., 2005). Na natureza, a espécie apresenta ampla variabilidade genética, com diferentes genótipos e ecótipos, em formas diploides e poliploides. Para que a variabilidade genética seja plenamente explorada, se faz necessário viabilizar cruzamentos entre as plantas apomíticas e sexuais, fixando as características desejáveis através da apomixia. Para isso é imperativo igualar o nível de ploidia das plantas para que desta forma sejam gerados descendentes férteis.

2.4. Poliploidia e Apomixia em *P. notatum*

Na natureza, a duplicação cromossômica somática é um evento raríssimo e seria um evento momentâneo. Pode ocorrer principalmente em plantas perenes, quando essas são expostas a estresses, podendo aumentar as chances de uma duplicação somática, como é caso das borbulheiras de citros, onde cortes mais frequentes das regiões apicais das plantas induzem alterações gênicas (De Wet, 1980). A poliploidia é um importante processo na evolução cromossômica dos eucariotos, onde três ou mais conjuntos cromossômicos compartilham o mesmo núcleo. Nas plantas, a poliploidia representa o maior mecanismo de adaptação e especiação (Ramsey & Schemske, 1998). Os poliploides são classificados em autopoliploides, originados pela duplicação de um mesmo genoma e alopoliploides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação. Nos autotetraploides, espera-se pareamento cromossômico em multivalentes nas primeiras gerações e herança polissômica. Nos alo tetraploides, a existência de genomas diferentes faz com que haja formação de bivalentes e herança dissômica (Sybenga, 1992). Os poliploides também podem ser classificados quanto ao tempo em que ocorreu o evento de duplicação cromossômica, sendo classificados como neopoliploides, quando o evento é recente e paleopoliploides quando o evento de duplicação cromossômica ocorreu há muito tempo. Em geral, os paleopoliploides já tiveram tempo de organizar seu pareamento cromossômico, ao contrário dos neopoliploides que apresentam irregularidades no pareamento. Os poliploides naturais diferem dos artificiais no sentido que os primeiros sofreram diploidização há muito tempo. Ao longo de sua história evolutiva, regularizaram o pareamento cromossômico, adquirindo um comportamento meiótico como de

um diploide com formação de bivalentes, ou seja, são estáveis meioticamente e com segregação dissômica. Provavelmente houve silenciamento de uma das cópias do gene ou aquisição de uma nova função gênica para esta cópia. Os poliploides artificiais são recentes e por isso não tiveram tempo para se estabilizarem, então, geralmente, há muitas irregularidades meióticas nas células mães de grãos de pólen de poliploides recém-formados (Ramsey e Schemske, 1998). Por esta razão, avaliações de análises meióticas e estabilidade reprodutiva são de extrema importância quando se realizam trabalhos de duplicação artificial de cromossomos de plantas.

No gênero *Paspalum* há uma estreita correlação entre nível de ploidia e modo de reprodução, onde diploidia está correlacionada com reprodução sexuada e alogamia e poliploidia está correlacionada com apomixia (Adamowski et al., 2005). Os genótipos tetraploides apomíticos usualmente mostram associações de cromossomos quadrivalentes na meiose. Porém, a maior parte das espécies apomíticas tetraploides tem, em contrapartida, co-específicos sexuais, diploides e autoincompatíveis (Quarín & Norrmann, 1990)

A poliploidia em *Paspalum* é estimada em aproximadamente 80% das espécies, na qual predomina o nível tetraploide (Quarín, 1992). Os ecótipos nativos do Rio Grande do Sul de *P. notatum*, “Bagual” e “André da Rocha” possuem esta característica, fazendo com que se adaptem a diferentes ambientes. No entanto, a cultivar Pensacola, nativa da Argentina, é diploide e reproduz-se sexualmente, gerando uma incompatibilidade ao nível cromossômico para o cruzamento dessas variedades. Por este fato, torna-se fundamental que plantas da cultivar Pensacola passem por um evento de duplicação artificial do número cromossômico para servirem de genitores femininos nos esquemas de cruzamentos em que os ecótipos nativos apomíticos sejam doadores de pólen, produzindo híbridos passíveis de registro e proteção varietal, após ciclos de avaliações e seleção.

A apomixia no seu sentido mais amplo significa “longe do ato de mistura”, e é sinônimo de formação assexual de sementes ou agamosperma (Asker & Jerling, 1992). O processo apomítico mimetiza muitos dos eventos da reprodução sexual e dá origem a sementes férteis. Há uma importante diferença entre o embrião apomítico e o zigótico que é o fato de que o primeiro é derivado somente das células do tecido materno enquanto o segundo é derivado da fusão de um gameta masculino com um feminino (Koltunow, 1993).

Espécies apomíticas são na sua quase totalidade perenes e muitas vezes possuem propagação vegetativa através de estolões ou rizomas. Assim, no campo, através da combinação de apomixia e divisão vegetativa, plantas apomíticas podem formar grandes populações clonais e estas podem persistir por longos períodos de tempo. A apomixia pode levar à formação e manutenção de variedades ou biótipos morfológicamente distintos, mas ainda férteis entre eles, onde a taxonomia de tais complexos agâmicos pode ser uma tarefa difícil e controversa (Dickinson, 1998; Horandl, 1998).

Uma das principais vantagens da apomixia é possibilitar a imediata fixação de qualquer genótipo superior selecionado no processo de melhoramento, permitindo que o mesmo origine plantas idênticas à original, independente do seu grau de heterose e vigor híbrido (Koltunow, 1993).

2.5. Avaliações citogenéticas e citoembriológicas como ferramenta para o melhoramento genético

Os estudos citogenéticos tais como análise meiótica, análise fertilidade polínica, análise do modo de reprodução, fornecem informações sobre a variabilidade genética, problemas de esterilidade e possibilidade de cruzamentos, sendo de fundamental importância para o melhoramento de plantas. Da mesma forma, os estudos citoembriológicos, que avaliam o modo de reprodução, são vitais dentro de um programa de melhoramento vegetal, possibilitando que os indivíduos sejam direcionados nos esquemas de hibridação.

O papel da citogenética dentro deste contexto, de acordo com Sybenga (1997), apresenta dois aspectos fundamentais, sendo num primeiro momento o de fornecer informações e em seguida viabilizar métodos para a manipulação do material genético. As informações obtidas com a citogenética são, basicamente, relacionadas a conhecimentos gerais, existência da informação para estabelecer estratégias, métodos a serem utilizados nos projetos e novas informações para serem extraídas do material durante o projeto para monitorar o seu progresso. O autor sintetizou então que a contribuição do citogeneticista no melhoramento de plantas é primeiramente, gerar transferência de genes e monitorar este processo, explicando resultados obtidos em termos não esperados de proporções na segregação, esterilidade nos cruzamentos, incompatibilidade entre genomas.

Segundo Stebbins (1971), a formação de quadrivalentes, trivalentes e univalentes ao invés de bivalentes durante a meiose, causa irregularidade na segregação cromossômica, tendo como consequência a formação de gametas com números cromossômicos não balanceados. Uma alta porcentagem de grãos de pólen inviáveis encontrados nas análises de viabilidade polínica reflete a ocorrência de irregularidades durante a divisão celular masculina, na fase meiótica em botões florais. Por isso, analisar a viabilidade polínica é uma maneira de estimar as condições reprodutivas em que a progênie se apresenta no decorrer de gerações e pode auxiliar na escolha de genitores macho-férteis para serem utilizados em cruzamentos.

Em um trabalho conduzido com *Brachiaria*, os dados indicam haver um controle genético do pareamento nos poliploides recém-formados. *Brachiaria decumbens* diploide foi induzida artificialmente com o uso de colchicina e as três plantas poliploides formadas apresentaram comportamento meiótico regular, evidenciado pelo predomínio de associações bivalentes dos cromossomos durante a prófase I meiótica (diacinese) e satisfatória viabilidade polínica. Isto evidencia a possibilidade de escolher genitores nos programas de melhoramento em poliploides recém-induzidos (Simioni & Valle, 2011).

No trabalho conduzido por Quarín et al. (2001), de duplicação cromossômica artificial com o uso de colchicina em plantas de *Paspalum notatum* diploides sexuais, os estudos citoembriológicos realizados demonstraram que um dos tetraploides induzidos reproduziu-se sexualmente. Os outros dois tetraploides foram apomíticos facultativos. Os dados sugeriram que os genes para apomixia existem nas populações, mas a sua expressão é reprimida no nível diploide. Plantas diploides que carregam o gene da apomixia expressam a característica após a duplicação cromossômica, mas a sua

expressão completa depende da ação de fatores complementares que são ativados pela ploidia (Quarín et al., 2001).

Podio et al. (2012) observaram, em análises citogenéticas de acessos apomíticos naturais e acessos sexuais tetraploides induzidos de *Paspalum notatum*, configurações normais e anormais na anáfase I nos genótipos sexuais e apomíticos, sendo que os genótipos apomíticos apresentaram significativamente mais anormalidades meióticas na anáfase I em relação aos sexuais. Quanto à viabilidade polínica, o mesmo trabalho indicou que os indivíduos apomíticos tiveram significativamente mais grãos de pólen não viáveis que os sexuais tetraploides induzidos.

Em vista de tudo que foi exposto, a partir dos dados experimentais obtidos pelos autores citados, pode-se concluir da necessidade de avaliações do comportamento meiótico, viabilidade polínica e modo de reprodução de poliploides induzidos artificialmente, como aqueles obtidos por Weiler et al. (2015). Somente após tais análises, os genótipos recém-duplicados poderão ser validados como genitores nos cruzamentos intraespecíficos propostos. A partir daí, e após análise do modo de reprodução da progênie híbrida, será possível direcionar os híbridos apomíticos para análises a campo, sendo selecionados os genótipos passíveis de registro e proteção varietal; híbridos sexuais continuam no programa de melhoramento, com a finalidade de ampliar a base genética da espécie.

2.6. A escolha de genitores para programas de hibridação visando o melhoramento genético

A escolha do material genético é uma etapa fundamental para um programa de melhoramento. *A priori*, devem-se avaliar os genitores considerando o problema a ser solucionado. Os dois genitores devem contribuir com um bom material genético. Em algumas circunstâncias, a resolução dos problemas pode se dar através de cruzamentos interespecíficos e mais raramente intergênero (Hadley & Openshaw, 1980). Em hibridações dentro da mesma espécie, barreiras de níveis de ploidia podem impedir ou dificultar a transferência de genes, gerando inclusive híbridos estéreis.

Híbridos com combinações genéticas favoráveis podem ser obtidos através de seleção e cruzamento de genitores. Esta etapa requer um conhecimento prévio do modo de reprodução, nível de ploidia e comportamento meiótico das plantas a serem utilizadas (Mendes-Bonato, 2002). Indivíduos que apresentam comportamento meiótico regular e pólen viável devem ser escolhidos como doadores de pólen, pois contribuirão para uma progênie fértil e, por consequência, boa produção de sementes. Estes estudos são importantes ferramentas para escolha dos acessos apomíticos que possuem potencial de serem progenitores dentro dos programas de melhoramento.

A vantagem da duplicação cromossômica para igualar o nível de ploidia dentro de hibridações intraespecíficas é fornecer indivíduos sexuais que sirvam de genitores femininos dentro dos programas de melhoramento genético. Porém, a baixa fertilidade e a pouca produção de sementes advindas do pareamento cromossômico irregular de poliploides recém-induzidos pode comprometer a viabilidade dos novos indivíduos e de futuros cruzamentos. Levando-se este problema em conta, a avaliação da fertilidade feminina se faz

necessária dentro de um programa de melhoramento para selecionar indivíduos que sejam capazes de gerar sementes viáveis.

2.7. Melhoramento em *P. notatum*

Espécies de reprodução apomítica apresentam populações homogêneas, o que, segundo Adamowski et al. (2005), possuem, como ponto negativo, os riscos onde agentes bióticos, especialmente pragas e doenças, ameacem o desenvolvimento, a produção e a persistência. A reprodução por apomixia implica em populações que são geneticamente homogêneas, assim dificultando, pela legislação vigente, o lançamento de cultivares quando o genótipo não passa por um processo de melhoramento genético. Por outro lado, formas apomíticas podem ser usadas como uma fonte de variabilidade para propagar genótipos heterozigotos, como doadoras de pólen em cruzamentos com tetraploides sexuais relacionados.

A hibridação de plantas apomíticas com plantas de reprodução sexuada cria a oportunidade de produzir novas combinações gênicas e fixar, permanentemente, a progênie heterozigota para avaliação imediata como novas variedades F1, tendo a conveniência da propagação por sementes (Dall'Agnol & Schifino-Wittmann, 2005). Para que uma espécie seja registrada como cultivar, existe a exigência de que, se esta for apomítica, passe por um programa de melhoramento com no mínimo um ciclo de cruzamento e seleção, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento. (BRASIL, 1997).

Através da identificação de genótipos sexuais, é possível viabilizar esquemas de hibridações intraespecíficas. A cultivar Pensacola (*Paspalum notatum* var. *saurae*), nativa do nordeste e centro-oeste da Argentina foi descrita. A forma diploide é sexual e meióticamente estável, alógama e autoincompatível (Burton, 1946; Forbes & Burton, 1961). No Brasil, plantas diploides nativas têm sido encontradas (Pozzobon & Valls, 1997; Dahmer et al., 2008) e no Rio Grande do Sul sua presença está associada a ambientes modificados, provavelmente como um escape da Pensacola (Canto-Dorow, 1993). No Rio Grande do Sul, o capim Pensacola se destacou principalmente na região do Planalto, daí a importância de ser comparada sob o ponto de vista de produção e valor forrageiro com os ecótipos nativos (Dall'Agnol et al., 2006).

Weiler et al. (2015) conseguiu duplicação cromossômica em três plantas nominadas “k3”, “alfa 63” e “delta 92” de *Paspalum notatum* var. *saurae* (Capim Pensacola) através da utilização de uma droga denominada colchicina {(S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo [a]heptalen-7-yl)}. Para a duplicação das plântulas diploides, sementes de ‘Pensacola’ foram deglumadas e colocadas para germinar em placas de petri. Após a abertura do cotilédone e exposição do botão apical, foram tratadas por imersão com solução de 0,01; 0,05; 0,08; 0,1 e 0,2% de colchicina por tempos entre duas e 24 horas. Para indução em sementes, 1000 sementes foram escarificadas, 500 foram submetidas a uma solução de 0,1% de colchicina e 500 foram submetidas a uma solução de 0,15% de colchicina, ambas por um tempo de 24 horas. Para verificar se houve duplicação cromossômica após a indução de poliploidia, foram utilizadas técnicas de medida de DNA através de analisador de ploidia, contagem cromossômica em células somáticas de ponta de raiz (mitose) e através de análises meióticas em células mãe de grãos de pólen.

Um total de 1761 plântulas e/ou sementes foram submetidas aos diversos tratamentos com colchicina. Do total, somente 370 indivíduos atingiram a fase adulta e foram analisados. Três plantas, doravante nominadas “WKS 3”, “WKS 63” e “WKS 92”, respectivamente, confirmaram número cromossômico tetraploide. A planta WKS 3, recebeu uma concentração de colchicina de 0,08% durante seis horas na plântula, WKS 63, 0,10% durante 24 horas e WKS 92, 0,15%, durante 24 horas ambas tratadas na semente. O reduzido número de plantas efetivamente duplicadas comprova a dificuldade da duplicação cromossômica artificial. Estes três indivíduos são a chave para o melhoramento desta espécie neste programa.

Em um trabalho paralelo, Weiler (2013) realizou cruzamentos com outros genótipos poliploidizados artificialmente (Quarin et al., 2001). As plantas, nominadas Q4188, Q4205 e C44X, foram os genitores femininos e os ecótipos nativos apomíticos ‘Bagual’ e ‘André da Rocha’ foram os genitores masculinos. Da progênie resultante destes cruzamentos, as plantas nominadas D3 (Q4205 x “Bagual”), C17 (Q4205 x “André da Rocha”) e C2 (Q4205 x “André da Rocha”), apomíticas e os indivíduos D16 (Q4205 x “Bagual”), D25 (Q4205 x “Bagual”) e B2 (Q4188 x “Bagual”), de reprodução sexual, foram selecionados após avaliações agrônomicas conduzidas à campo. A comprovação do valor agrônomico nestes genótipos híbridos foi conduzida por Risso-Barbosa (2014), estabelecendo os materiais selecionados em ensaios em parcelas no campo em duas regiões fisiográficas do estado (Campanha e Depressão Central). Estas plantas selecionadas, que tiveram o seu modo de reprodução determinado por Weiler (2013), também foram utilizadas nos esquemas de cruzamentos intraespecíficos realizados no presente experimento. Os indivíduos com modo de reprodução sexual foram utilizados como fêmeas nos cruzamentos e os de reprodução apomítica foram os doadores de pólen.

Em um trabalho semelhante, Simioni & Valle (2009) conseguiram duplicação cromossômica de cinco plantas que mantiveram seu modo de reprodução sexual em *Brachiaria decumbens* e um híbrido de *B. decumbens* e *B. brizantha*. Estas plantas foram cruzadas com cultivares apomíticas e geraram 14 sementes.

Este trabalho representa um avanço no melhoramento das plantas forrageiras no Rio Grande do Sul, abrindo maior variabilidade genética na espécie e fixando as características desejáveis na progênie através da apomixia, sendo passíveis de registro e proteção varietal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar plantas tetraploides duplicadas artificialmente quanto ao modo de reprodução, comportamento meiótico e viabilidade polínica e viabilizá-las como genitores em esquemas de hibridações intraespecíficas.

3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar citoembriologicamente as plantas duplicadas para confirmar seu modo de reprodução;
- Avaliar citogeneticamente as plantas duplicadas para verificar o comportamento meiótico através de análise das células mãe dos grãos de pólen;
- Avaliar a viabilidade polínica das plantas duplicadas; e das plantas C2, C17, D3 (apomíticas) e B2, D16, D25 (sexuais) que foram genitores nestes esquemas de cruzamentos;
- Obter sementes híbridas dos cruzamentos intraespecíficos realizados e estabelecer a nova geração de genótipos para futuras avaliações e seleção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As três plantas, nominadas WKS 3, WKS 63 e WKS 92 utilizadas para a realização das análises meióticas, viabilidade polínica e modo de reprodução foram obtidas pela duplicação cromossômica de um acesso diploide de reprodução sexual de *P. notatum* (cv. Pensacola) através de tratamento com colchicina em sementes recém-germinadas e plântulas. O nível de ploidia e a completa euploidia foi confirmada através de análises de ponta de raiz e em células meióticas em diacinese (botões florais) (Weiler et al., 2015).

4.1. Análises Citoembriológicas

As análises para confirmação do modo de reprodução das plantas duplicadas foram feitas nas inflorescências em antese (quando o saco embrionário normalmente está completamente desenvolvido). Na época do florescimento, estas foram coletadas e as flores dissecadas em laboratório e fixadas em FAA (etanol 95%(40 ml), água destilada (14ml), formalina 40% (3ml) e ácido acético glacial (3ml)) por 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, as flores foram armazenadas em álcool 70% e mantidas sob refrigeração até a extração dos ovários, que foram dissecados das flores. Após a dissecação, os ovários passaram por um processo de clareamento através de uma série de desidratação alcoólica com salicilato de metila, seguindo o protocolo proposto por Young et al. (1979) e modificado por Acuña et al. (2007). Os ovários clareados foram armazenados em solução de salicilato de metila (100%) até as análises em microscópio óptico de contraste interferencial. Cada planta teve no mínimo 30 ovários analisados em duas lâminas para determinação do modo de reprodução. Sacos embrionários contendo antípodas e dois núcleos polares centrais foram classificados como sexuais, enquanto sacos embrionários que apresentam sacos múltiplos ou únicos com uma célula central, ausência de antípodas e uma morfologia alterada por grumos de células embrionárias (originadas por mitose) foram considerados apomíticos.

4.2. Análises Citogenéticas

As plantas duplicadas foram analisadas conquanto seu comportamento meiótico. Para isso, foram efetuadas análises citogenéticas em células mães dos grãos de pólen. Inflorescências em vários estágios de desenvolvimento foram coletadas pouco antes da antese e mantidas no fixador 3:1 (álcool etílico absoluto: ácido acético glacial) na temperatura ambiente por 24 horas. Após, estocadas em álcool 70% em geladeira até o momento das análises. Para o preparo das lâminas, as inflorescências foram dissecadas sob lupa para a extração dos meiócitos das anteras e coradas com carmim propiônico 1%. Após estes processos, as lâminas foram analisadas em

microscópico óptico, observando as fases da meiose e o arranjo dos cromossomos em todas as fases. O comportamento meiótico foi analisado em cerca de 1000 células por planta, representando as diferentes fases da divisão. Todas as anormalidades meióticas foram consideradas. Avaliou-se no mínimo 1200 microsporócitos em cada planta poliploide. Para verificação do pareamento cromossômico, análises foram feitas em, no mínimo, 20 células por planta em fase de diacinese e metáfase I, que são os melhores estágios para a visualização das configurações cromossômicas (Simioni & Valle, 2011; Dahmer et al., 2008). Em outro trabalho no qual foram feitas estas mesmas análises com esta espécie, Podio et al. (2012) analisaram no mínimo 30 células por planta.

4.3. Análise de Viabilidade Polínica

Inflorescências em estágio maduro foram coletadas após a antese, fixadas em uma solução 3:1 (álcool etílico absoluto: ácido acético glacial) na temperatura ambiente por 24 horas e estocadas em álcool 70% até o momento das análises. Para a preparação das lâminas, as inflorescências foram transferidas para uma placa de petri contendo álcool 70% e retirado um botão floral. As anteras foram cortadas ao meio para que os grãos de pólen fossem expostos e corados com carmim propiônico 1%.

Após, as lâminas foram observadas no microscópio. Os grãos de pólen que estavam bem corados foram considerados potencialmente grãos de pólen viáveis e os grãos de pólen enrugados ou incolores foram considerados grãos inviáveis. No trabalho de Podio et al. (2012), foi utilizado Reagente de Alexander para as análises e foram contados no mínimo 900 grãos de pólen maduros nas análises em no mínimo cinco flores por planta. No presente trabalho, foram contados 1000 grãos de pólen maduros em quatro flores por planta, seguindo protocolo já estabelecido (Simioni et al., 2006) e também utilizado por Dahmer et al. (2008).

4.4. Avaliação da Fertilidade Feminina

Na época da antese, as plantas WKS 63, WKS 92, B2, D16 e D25 (tetraploides sexuais), genitores femininos nos cruzamentos, foram mantidas em casa de vegetação, próximas com outros genótipos da espécie para que ocorresse polinização natural. Permaneceram por dois a três dias para assegurar que seriam polinizadas. As flores que não abriram foram retiradas da inflorescência e o afilho que a continha era retirado e colocado em garrafa pet com cerca de 500 ml de água, sendo mantidos sob luminosidade natural em ambiente protegido para estimular a fotossíntese. A inflorescência era ensacada e identificada. Após 30 dias, o conjunto de sementes foi avaliado para providenciar a avaliação da fertilidade feminina. Em outro trabalho, Araújo et al. (2005) realizaram avaliação da fertilidade feminina de plantas de *Brachiaria brizantha*, tetraploides induzidas, isolando os racemos de 1000 inflorescências em antese por planta que foram protegidas em sacos de papel por 12 dias.

4.5. Cruzamentos intraespecíficos

As plantas WKS 63 e WKS 92, conjuntamente com os híbridos selecionados por Risso-Barbosa (2014), nominados D16, D25 e B2, todos tetraploides de reprodução sexual, foram viabilizadas como genitores femininos

nos esquemas de cruzamento. Os genótipos apomíticos que foram os genitores masculinos são: o ecótipo nativo “Bagual”, os híbridos selecionados por Risso-Barbosa (2014) D3, C17, C2 e a planta duplicada WKS 3. Durante o verão 2013-2014 foram realizados cruzamentos de acordo com metodologia descrita por Burton (1948): destacando-se os afilhos com rizomas que tinham inflorescências que exporiam as anteras e estigmas na manhã do dia seguinte. Estas plantas ficaram acomodadas em uma câmara com umidificador de ambiente, saturando o ar dentro dela, evitando assim a liberação de pólen pelas anteras, imitando um dia de chuva na natureza. Em sequência, foi realizada a emasculação das plantas-mães com auxílio de uma pinça.

A coleta do pólen foi realizada no amanhecer, na hora da exposição dos estigmas e anteras. As plantas doadoras de pólen ficaram acondicionadas em casa de vegetação. Após isso, o racemo feminino recém-emasculado foi friccionado com os grãos de pólen presentes dentro de um saco de papel encerado, ensacando-se a inflorescência feminina na sequência. Cerca de 30 dias depois do ensacamento, as inflorescências foram coletadas e debulhadas e as flores contendo cariopses foram separadas para a coleta das sementes. A porcentagem de sementes obtidas foi calculada pela divisão do número de flores contendo cariopses pelo número total de flores polinizadas, multiplicada por 100 (Acuña et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises do modo de reprodução

Das três plantas duplicadas que foram analisadas, duas confirmaram modo de reprodução sexual e uma se mostrou apomítica. Os ovários foram analisados em duas lâminas, contendo pelo menos 15 ovários em cada lâmina, tendo sido analisados no mínimo 30 ovários por planta (Tabela 1).

Tabela 1. Número e porcentagem (%) de sacos meióticos (S), apomíticos (A), indefinidos (I), atrofiados (At), total de ovários analisados (T) e modo de reprodução (MR) das plantas tetraploides induzidas de *Paspalum notatum*.

Planta	S (%)	A (%)	I	At	T	MR
WKS 63	30 (75)	0	8	2	40	sexual
WKS 92	24 (80)	0	5	1	30	sexual
WKS 3	0	26 (87)	4	0	30	apomítico

A estrutura, forma, orientação e o número de sacos embrionários por óvulo facilitam a separação dos indivíduos apomíticos e sexuais. A planta sexual possui um único saco embrionário meiótico por óvulo, o qual é originado na redução funcional do megásporo e é caracterizado pela célula ovo e duas sinérgides próxima á micrópila, uma grande célula central binucleada e um aglomerado de células antípodas em direção á chalaza (Figura 1). Já uma planta apomítica, usualmente tem múltiplos sacos embrionários apospóricos que são caracterizados pela célula ovo, uma ou duas sinérgidas, uma célula central binucleada e ausência de antípodas (Figura 2). Também podem ocorrer em algumas plantas apomíticas e mesmo na mesma inflorescência, sacos embrionários apospóricos ocorrendo junto com óvulos contendo um único saco meiótico (plantas apomíticas facultativas) (Quarin et al., 2001).



Figura 1. Aspecto citoembriológico de um ovário sexual da planta duplicada WKS 63, observado em microscópio de contraste interferencial. Antípodas (1) e núcleos polares (2). Escala 10 μm .



Figura 2. Aspecto citoembriológico de um ovário apomítico da planta duplicada WKS 3, com sacos múltiplos (setas), observado em microscópio de contraste interferencial. Escala 10 μm .

A planta WKS 3 apresentou modificação em seu modo de reprodução após a duplicação cromossômica e passou a ser apomítico. Este fenômeno reafirma que o modo de reprodução está relacionado ao nível de ploidia, onde os materiais tetraploides são apomíticos e os diploides são sexuais dentro desta espécie. Um problema na meiose pode ter provocado a mudança, onde a planta com meiose errática devido à duplicação cromossômica artificial encontrou, como alternativa para sua reprodução, a apomixia. As outras duas plantas, WKS 63 e WKS 92, mantiveram seu modo de reprodução sexual mesmo com o evento da duplicação cromossômica.

Também Quarin et al. (2001), procedendo à análise do modo de reprodução de três plantas de *P. notatum* que sofreram duplicação cromossômica através de colchicina verificaram que duas delas demonstraram se reproduzir como apomíticos facultativos. Estes resultados mostram que o gene da apomixia está presente no nível diploide, porém sem se expressar. Alternativamente, o aborto e desenvolvimento incompleto dos sacos embrionários meióticos talvez seja também uma expressão de um aspecto que caracteriza a apomixia apospórica: a ausência de função da redução meiótica.

Uma baixa expressão da aposporia tem sido encontrada em diploides naturais de *Brachiaria decumbens* (Naumova et al., 1999) e em várias espécies de *Paspalum* (Quarin et al., 1982; Quarin & Norrmann, 1987; Norrmann et al., 1989). *Brachiaria* e *Paspalum* pertencem às gramíneas da tribo Paniceae (Quarin et al., 2001), sugerindo que esta semelhança seja devido a este grau de similaridade.

A ploidia-dependência talvez ocorra em um *locus* controlando a apomixia através de algum fator secundário que requeira uma maior dosagem de alelos para afetar a expressão do *locus* principal, de acordo com Quarin et al. (2001). Provavelmente a expressão da apomixia nesta planta duplicada seja um efeito da dosagem gênica.

A dosagem do alelo talvez modifique a ação de algum fator de transcrição que de outra maneira poderia não ser ativado no nível diploide. Se o processo apomítico requer um alelo dominante, a constituição genotípica do diploide sexual deve ser homocigoto recessivo para o gene que resulta no tetraploide que continua a ser sexual após a duplicação cromossômica. A planta que antes era sexual e quando foi poliploidizada se tornou apomítica, deve ser heterocigota para o traço, mas no nível diploide a baixa dosagem do fator complementar deve reprimir a expressão do gene da apomixia. A duplicação cromossômica mantém a condição heterocigota (tornando-a dupla) do gene da apomixia e aumenta a dosagem do fator complementar para formar plantas apomíticas tetraploides. A dosagem, e provavelmente a variação na constituição alélica do fator complementar, talvez seja o responsável pela variação no grau de expressão do gene da apomixia que usualmente é observado entre as plantas apomíticas de uma população F1 tetraploide segregante para o traço (Quarin et al., 2001).

A apomixia em *P. notatum* inclui a formação de embriões não reduzidos das células nucleares (aposporia), desenvolvimento de embriões partenogênicos e desenvolvimento de endosperma seguido da fertilização dos núcleos polares (pseudogamia). A aposporia nesta espécie é herdada como um fator mendeliano dominante simples com segregação distorcida (Martinez et al., 2001). Este fator está localizado numa região genômica caracterizada

pela supressão da recombinação e pareamento cromossômico preferencial (Martinez et al., 2003; Stein et al., 2004 e 2007).

Burton (1948), em cruzamentos experimentais e testes de progênie indicou que as raças tetraploides são obrigatoriamente apomíticas. Entretanto, estudos embriológicos detalhados realizados em uma ampla coleção de *P. notatum* indicaram que a maioria dos genótipos tetraploides de diferentes origens mostra uma sexualidade residual (Martinez et al., 2001; Espinoza et al., 2006).

Num estudo semelhante em *Brachiaria decumbens*, as três plantas obtidas por duplicação cromossômica somática confirmaram modo de reprodução sexual (Simioni & Valle, 2011).

5.2. Análises do comportamento meiótico

As associações cromossômicas na fase de diacinese confirmaram a condição poliploide nas plantas avaliadas ($2n=4x=40$). O comportamento meiótico, principalmente na meiose I foi típica de poliploides, com associações cromossômicas em univalentes, bivalentes, trivalentes e quadrivalentes (Tabela 2). Esta tabela mostra a média das associações encontradas nas células analisadas por planta e o alcance, que é o número mínimo e máximo em que estas associações aparecem nas células.

Tabela 2. Configurações meióticas na fase de diacinese (prófase I) das três plantas tetraploidizadas de *P. notatum*.

Planta	Nº cromossômico	Nº células analisadas	Média Nº de associações observadas (por célula) (alcance)			
			I	II	III	IV
WKS 63	40	58	0	0,48	0	9,59
			0	(0-6)	0	(8-10)
WKS 92	40	31	2,23	15,26	0,16	1,71
			(0-34)	(3-20)	(0-2)	(0-4)
WKS 3	40	21	0	9,86	0,29	4,86
			0	(2-17)	(0-2)	(0-9)

A planta mais irregular para esta avaliação foi a WKS 63 (Figura 3) que apresentou a maioria das associações quadrivalentes, o que já era esperado pelo evento da duplicação cromossômica artificial. A planta WKS 92 (Figura 4) foi a que apresentou menos anormalidades meióticas nas análises, com maioria dos cromossomos associando-se em bivalentes e esporádicas associações quadrivalentes, mostrando um rearranjo do pareamento cromossômico neste genótipo, com tendência à regularização do pareamento (em bivalentes) neste poliploide recém-formado.

Já a planta WKS 3 (Figura 5), que mostrou reprodução apomítica na avaliação do saco embrionário, mostrou associações predominantemente bivalentes com esporádicas associações quadrivalentes. De acordo com Quarin et al. (2001), tetraploides apomíticos usualmente mostram associações cromossômicas quadrivalentes na meiose e possuem homólogos co-específicos que são diploides sexuais. Valle & Savidan (1996) reportaram que diploides de *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* exibiram meiose regular, com cromossomos pareando em bivalentes, enquanto seus

homólogos tetraploides mostraram meiose irregular com associações univalentes e tetravalentes sendo formadas.

Dahmer et al. (2008), examinando 36 acessos tetraploides de *P. notatum*, encontrou várias configurações cromossômicas, com a ocorrência de univalentes (I), bivalentes (II), trivalentes (III) e quadrivalentes (IV). Os autores também analisaram *P. notatum* “Bagual” e observaram diferentes associações cromossômicas, apresentando combinações do tipo: 20II; 18II + 1IV; 12II + 4IV; 10 II + 5IV; 8II + 6IV; 6II + 7IV. Somente a cultivar Pensacola (ecótipo diploide) apresentou associações cromossômicas exclusivamente em 10II em todas as células. Apesar de não haver variabilidade quanto ao número cromossômico em suas análises, há uma grande variabilidade em relação à frequência de diferentes associações cromossômicas, sendo isto explicado pelo modo de reprodução da espécie. Sendo *P. notatum* tetraploide apomítico e também se reproduzindo por propagação vegetativa, os quadrivalentes residuais do processo de poliploidização podem ser mantidos, sem necessidade de ‘diploidização’ cromossômica, fato comum em diploides sexuais. Além das eventuais mutações e aberrações cromossômicas, como translocação, inversão, etc, que ocorram, podem ser mantidas pelos acessos sem prejuízos de sua fertilidade. Ao mesmo tempo, como *P. notatum* é pseudogâmica, explica o mesmo autor, há a necessidade de um mínimo de regularidade meiótica para assegurar sua fertilidade de pólen suficiente para formar o endosperma.

Vários estudos citogenéticos com diferentes espécies e ecótipos de *Paspalum* coletados em vários sítios do Rio Grande do Sul foram conduzidos por Moraes-Fernandes et al. (1968). Os autores analisaram vários acessos de *P. dilatatum*. Cinco destes mostraram $2n=4x=40$ e comportamento meiótico essencialmente regular. Já as análises de *P. dilatatum* forma *pauciliatum* ($2n=40$) (coletados nos municípios de Bagé, Guaíba e Vacaria) e *P. dilatatum* forma “Uruguaiana” ($2n=6x=60$) (coletada em Uruguaiana), mostraram grande variação de configurações cromossômicas, univalentes, trivalentes e quadrivalentes. A forma “Torres”, um hexaploide, (coletada em Torres) apresentou 60 univalentes em todas células analisadas.

Nos trabalhos conduzidos em 1971, analisando várias espécies do gênero, estes mesmos autores constataram pareamento anormal em 60% das células das espécies tetraploides analisadas. Nas análises de cinco acessos de *P. notatum*, foi constatado número cromossômico $2n=40$ e configurações cromossômicas meióticas de 2-3 IV, 14-16 II, 1IV e 18II no tipo Capivari (coletado nos municípios de Capivari e Osório) (Moraes-Fernandes et al., 1973). Pagliarini et al. (2001) também observaram associações bivalentes, trivalentes e quadrivalentes em várias espécies tetraploides do gênero *Paspalum*, pertencentes a vários grupos, incluindo o grupo Notata a qual pertence *P. notatum*. Reis et al. (2008), analisando *P. nicorae* também encontraram associações univalentes, trivalentes e quadrivalentes em todos os 53 acessos estudados da espécie. Apesar da ausência de variação no número cromossômico, sendo todos tetraploides ($2n=4x=40$), houve frequência de diferentes associações cromossômicas entre os acessos.

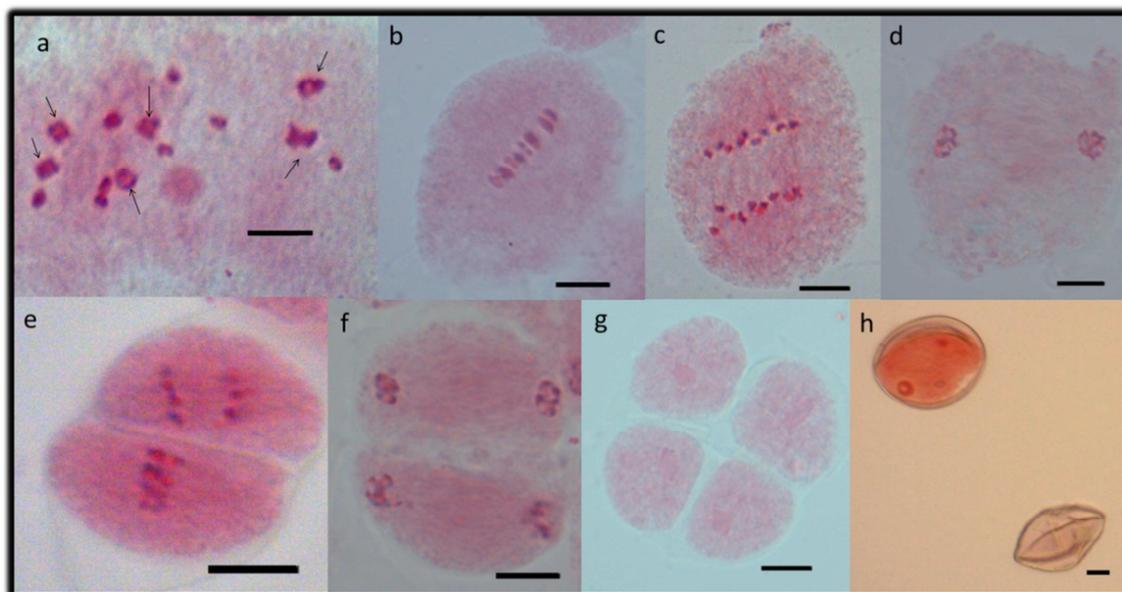


Figura 3. Aspectos meióticos da planta poliploidizada WKS 63. a) Diacinese. Nota-se a presença de associações quadrivalentes (setas). b) Metáfase I normal. c) Anáfase I normal. d) Telófase I normal. e) Anáfase II com assincronia. f) Telófase II normal. g) Microsporócito (Tétrade). h) Grão de pólen viável (corado) e inviável (não-corado). Escala: 10 μ m.

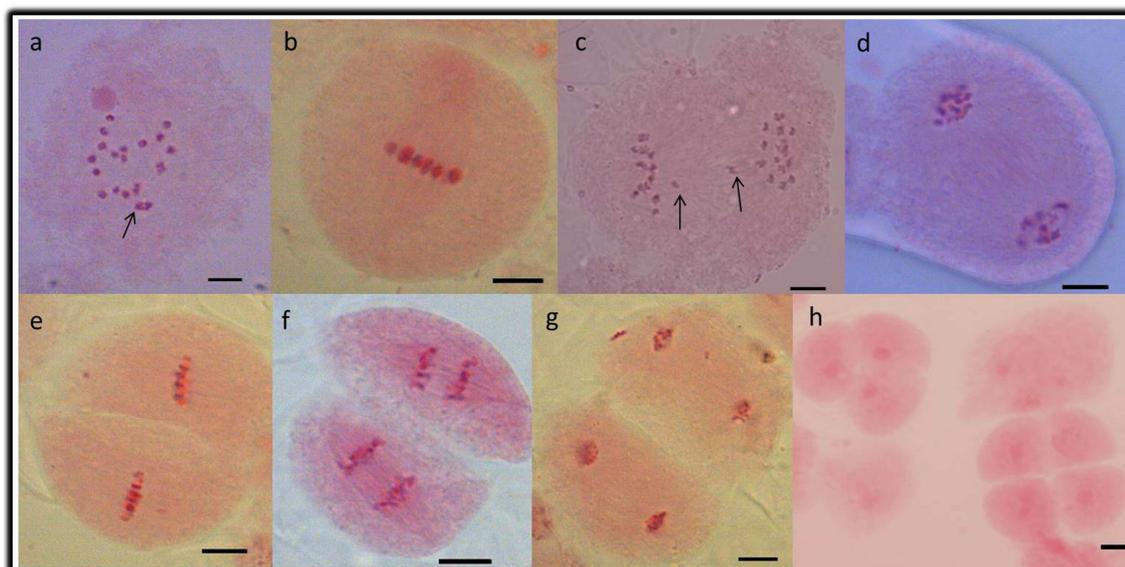


Figura 4. Aspectos meióticos da planta poliploidizada WKS 92. a) Diacinese. Nota-se a presença de uma associação quadrivalente (seta). b) Metáfase normal. c) Anáfase I com presença de cromossomos retardatários (seta). d) Telófase I normal. e) Metáfase II normal. f) Anáfase II normal. g) Telófase II normal. h) Microsporócitos (Tríade e Tétrade). Escala: 10 μ m.

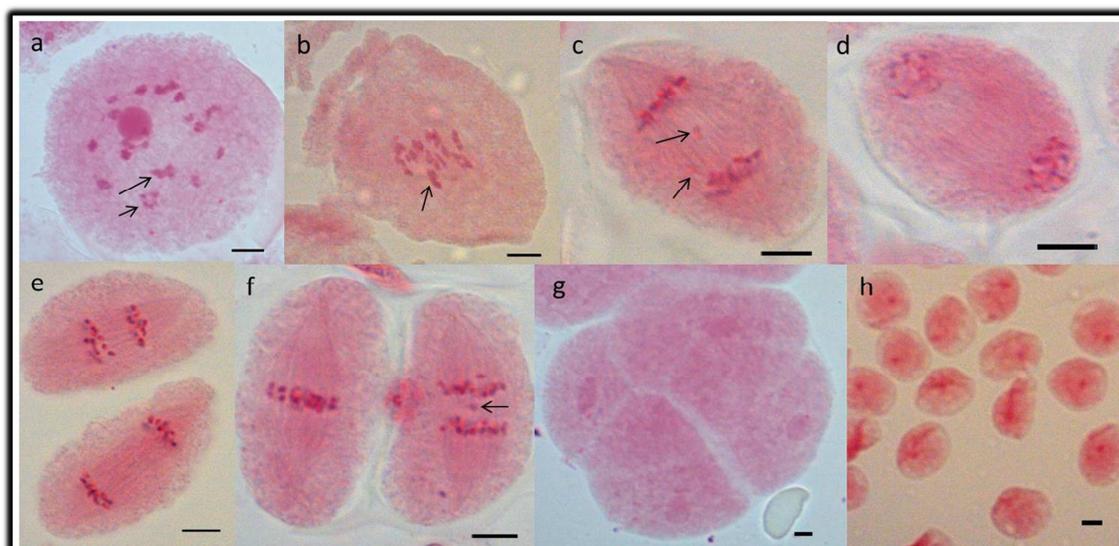


Figura 5. Aspectos meióticos da planta poliploidizada WKS 3. a) Diacinese. Nota-se a presença de duas associações quadrivalentes (setas), enquanto a maioria das associações é bivalente. b) Metáfase I. Presença de cromossomos em ascensão precoce (seta). c) Anáfase I com presença de cromossomos retardatários (setas). d) Telófase I normal. e) Anáfase II normal. f) Anáfase II com assincronia. Nota-se a presença também de cromossomo retardatário (seta). g) Microsporócito (políade com micronúcleos). h) Grãos de pólen viáveis (corados). Escala: 10 μ m.

Simioni & Valle (2011), analisando a meiose de tetraploides induzidos de *Brachiaria decumbens* encontraram comportamento meiótico típico de poliploides, com associações cromossômicas em univalentes, bivalentes e quadrivalentes, com a prevalência de configurações bivalentes. Associações bivalentes, sugerindo o controle genético do pareamento cromossômico, em autotetraploides induzidos, também foram reportados em *Trifolium riograndense* (Schifino & Moraes-Fernandes 1986, 1987), em *Brachiaria brizantha* (Araújo et al., 2005), *B. ruziziensis* (Risso-Pascotto et al., 2005). Quarin (1994), estudando *Paspalum durifolium*, encontrou um acesso coletado em Corrientes (Argentina), Q3947, tetraploide, de reprodução sexual, apresentando meiose regular e pareamento cromossômico predominantemente em bivalentes, sugerindo uma origem aloploiploide deste citótipo tetraploide. Em *Panicum maximum* cv. Tanzânia, Caetano et al. (2006) encontraram associações multivalentes em diacinese, com predominância de tetravalentes. Segundo a Tabela 3, do total de 4082 microsporócitos analisados nas três plantas duplicadas neste experimento, 442 apresentaram irregularidades desde a prófase I até os produtos meióticos, representando uma média de anormalidades das três células de 10,83%. Plantas poliploides geralmente apresentam anormalidades meióticas relacionadas à segregação irregular dos cromossomos as quais acabam gerando micrósporos geneticamente desbalanceados, comprometendo a fertilidade dos grãos de pólen. Tais anormalidades são causadas por erros meióticos inerentes à condição poliploide, tais como distúrbios inesperados nas taxas de segregação, anormalidades causadas incidentalmente e alterações nas frequências de recombinação. Estes eventos aleatórios levam a taxas variáveis de células

portando cromossomos retardatários, pontes cromossômicas, ascensão precoce de cromossomos para os polos, assincronia na segregação, micronúcleos, que são produtos de cromossomos que não migraram para os polos, múltiplas associações na fase da diacinese, entre outras anomalias mais raras (Sybenga, 1992). As anormalidades que apareceram com maior frequência em ambas divisões nas três plantas foram múltiplas associações em diacinese e àquelas relacionadas à segregação cromossômica irregular (ascensão precoce). Também foi possível notar cromossomos retardatários e assincronia nas três plantas analisadas, não havendo muitas pontes e micronúcleos. Os produtos meióticos foram em sua grande maioria normais, apresentando poucas díades, tríades e políades, o que refletiu na excelente viabilidade polínica destas plantas.

Podio et al. (2012), analisando cinco acessos tetraploides apomíticos naturais e três tetraploides sexuais induzidos artificialmente de *P. notatum*, encontraram configurações normais e anormais na anáfase I, principalmente cromossomos retardatários, pontes de cromatina e presença de micronúcleo. Em média, 55,6 e 70,3% das células mães de grãos de pólen de plantas apomíticas e sexuais, respectivamente, mostraram anáfase I normal. Na telófase I, ambos os acessos apomíticos e sexuais mostraram cromossomos agrupados nos pólos das células e presença de micronúcleos de tamanho reduzido, sugerindo que fossem compostos de fragmentos de cromossomos. Na média, 44,36% de meiócitos de plantas apomíticas e 29,66% de plantas sexuais mostraram configurações anormais na anáfase. A proporção de meiócitos anormais em plantas apomíticas e sexuais sugeriram naquele trabalho que o comportamento meiótico é característico de cada genótipo, assim como reportado anteriormente por Stein et al. (2004) para a espécie.

Pessim et al. (2010), em um programa de melhoramento de *Panicum maximum* do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá, tiveram seus híbridos e genitores avaliados citogeneticamente. Os genótipos apresentaram alta estabilidade meiótica, com anormalidades na faixa de 6,7 a 14,2%. Os autores encontraram anormalidades tais como segregação irregular de cromossomos, aderência e ausência de citocinese, sendo que esta última não comprometeu a viabilidade polínica. As configurações cromossômicas foram multivalentes, variando de um a quatro quadrivalentes, sugerindo que a recombinação e introgressão de alguns genes pode ser esperada em híbridos.

Análises citológicas são ferramentas de extrema importância nos programas de melhoramento para selecionar genitores compatíveis e férteis e com ausência de anormalidades meióticas que poderiam comprometer a viabilidade dos gametas (Simioni & Valle, 2011). Deste modo, a análise do comportamento meiótico das plantas duplicadas WKS 3, WKS 63 e WKS 92 são de suma importância para que estas plantas, que sofreram duplicação cromossômica artificial, possam ser viabilizadas como genitores dentro do programa de melhoramento. As três plantas duplicadas possuem genomas geneticamente similares, sendo homólogos, visto que o genoma sofreu duplicação cromossômica. Estas plantas são desta forma organismos autotetraploides. O comportamento meiótico é típico de poliploides, com associações em univalentes, bivalentes e quadrivalentes.

Tabela 3. Anormalidades meióticas registradas nas três plantas poliploidizadas de *P. notatum*.

Indivíduo	Fases	Nº de células analisadas	Nº células anormais (%)	Principais anormalidades (Nº de células e %)
WKS 63	Diacinese	58	58 (100)	Múltiplas associações: 58 (100)
	Metáfase I	502	69 (13,75)	Ascensão precoce: 38 (7,57) Retardatários: 31 (6,18)
	Anáfase I	89	19 (21,35)	Retardatários: 13 (14,61) Pontes: 3 (3,37) Assincronia: 3 (3,37)
	Telófase I	170	1 (0,59)	Retardatários: 1 (0,59)
	Metáfase II	162	18 (11,11)	Ascensão precoce: 4 (2,47) Retardatários: 2 (1,23) Assincronia: 12 (7,41)
	Anáfase II	34	14 (41,18)	Retardatários: 1 (2,94) Pontes: 1 (2,94) Assincronia: 12 (35,29)
	Telófase II	156	6 (3,85)	Assincronia: 6 (3,85)
	Produtos meióticos	279	10 (3,58)	Políades: 1 (0,36) Tríades: 9 (3,22)
Nr. total de células		1450	195 (13,45)	
WKS 92	Diacinese	31	30 (96,78)	Múltiplas associações: 30 (96,78)
	Metáfase I	585	38 (6,5)	Ascensão precoce: 34 (5,81) Retardatários: 4 (0,69)
	Anáfase I	136	11 (8,09)	Retardatários: 10 (7,35) Pontes: 1 (0,74)
	Telófase I	70	4 (5,71)	Retardatários: 2 (2,86) Micronúcleo: 1 (1,43) Assincronia: 1 (1,43)
	Metáfase II	115	9 (7,83)	Ascensão precoce: 2 (1,74) Assincronia: 7 (6,09)
	Anáfase II	33	7 (21,21)	Retardatários: 3 (9,09) Assincronia: 4 (12,12)
	Telófase II	48	1 (2,08)	Assincronia: 1 (2,08)
	Produtos meióticos	812	9 (1,11)	Díades: 2 (0,25) Tríades: 7 (0,86)
Nr. total de células		1799	79 (4,39)	

Continuação...

Tabela 3. Anormalidades meióticas registradas nas três plantas poliploidizadas de *P. notatum*.

Indivíduo	Fases	Nº de células analisadas	Nº de células anormais (%)	Principais anormalidades (Nº de células e %)
WKS 3	Diacinese	21	21 (100)	Múltiplas associações: 21 (100) Retardatários: 1 (0,44) Micronúcleo: 1 (0,44)
	Anáfase I	72	7 (9,72)	Retardatários: 5 (6,94) Pontes: 2 (2,78)
	Telófase I	91	2 (2,2)	Pontes: 2 (2,2)
	Metáfase II	28	1 (3,57)	Assincronia: 1 (3,57)
	Anáfase II	88		
	Telófase II	56	4 (7,14)	Assincronia: 4 (7,14)
	Produtos meióticos	251	15 (5,98)	Políades: 11 (4,38) Triades: 4 (1,59)
	Nr. total de células	833	168 (20,17)	

5.3. Análises de viabilidade polínica e fertilidade feminina

A análise da viabilidade polínica mostrou que as três plantas que foram duplicadas possuem boa fertilidade polínica. Tanto as plantas apomíticas WKS 3, ecótipo 'Bagual', C2, C17, D3, usadas nos cruzamentos quanto as plantas sexuais WKS 63, WKS 92, B2, D16, D25, também apresentaram boa fertilidade polínica. Por terem uma boa fertilidade de pólen, as plantas apomíticas foram utilizadas como genitores masculinos nos cruzamentos realizados (Tabela 4, 5).

A planta WKS 3 apresentou excelente viabilidade polínica (92,3%) e, por ter se tornado de reprodução apomítica, foi direcionada para cruzamentos como doadora de pólen, visando abrir a variabilidade genética e manter características desejáveis na progênie. As outras duas plantas, WKS 63 e WKS 92, que se mantiveram com reprodução sexual e tiveram boa viabilidade polínica (88,7% e 95,7% respectivamente) foram direcionadas para cruzamentos como genitores femininos. Também as plantas sexuais selecionadas por Weiler (2013) e Risso-Barbosa (2014), tiveram alta viabilidade polínica. Porém, se fez necessário a avaliação da fertilidade feminina destas plantas, e não apenas polínica, uma vez que estas são os genitores femininos dos cruzamentos. Uma boa fertilidade do pólen não representa uma fertilidade feminina satisfatória, visto que as células mãe dos grãos de pólen são produzidas por meiose no microsporângio e os ovários são formados pela mitose do epitélio germinativo formando megaesporogônias. Também as plantas apomíticas avaliadas apresentaram excelente viabilidade polínica, variando entre 75,9% de grãos de pólen viáveis (ecótipo "Bagual") até 93,2% (genótipo D3).

Tabela 4. Avaliação da viabilidade polínica em plantas tetraploides induzidas de *P. notatum* e genitores utilizados nos cruzamentos.

Planta	Grãos de pólen viáveis (%)
WKS 63*	88,7
WKS 92*	95,7
WKS 3**	92,3
Bagual**	75,9
C2**	85,9
C17**	89,1
D3**	93,2
B2*	89,0
D16*	95,3
D25*	74,7

*Plantas sexuais

**Plantas apomíticas

Dahmer et al (2008) encontraram viabilidade polínica de 81,0 a 91,47% em *P. notatum* “Bagual” e de 86,0 a 98,0% em *P. notatum* “André da Rocha”. Em algumas espécies de *Paspalum* apomíticas e em *Brachiaria*, a formação de sementes só ocorre se houver fecundação dos núcleos polares do saco embrionário por um dos núcleos gaméticos do grão de pólen, devido à pseudogamia (Pagliarini & Pozzobon, 2004). Moraes-Fernandes et al. (1973) reportaram fertilidade de pólen variando de 0 a 84,3% em tetraploides de *P. notatum*. Reis et al. (2008) encontrou alta viabilidade polínica variando de 88,99 a 95,06% em *P. nicorae*, apesar das irregularidades meióticas encontradas nos acessos estudados.

Dahmer et al. (2008) relataram que há um possível “conflito” genético e evolutivo entre a possibilidade de *P. notatum* acumular anormalidades meióticas, mas, ao mesmo tempo ter necessidade de certa fertilidade de pólen, sendo um ponto que merece análises mais aprofundadas de cunho evolutivo e genético.

De acordo com Chevre et al. (1998), acessar o gametófito feminino para observações citológicas é mais difícil e consome tempo. Isto mostra que o conjunto de sementes na planta-mãe do híbrido por autofecundação ou depois de fecundações com algum outro doador de pólen, providencia a única avaliação razoável da fertilidade feminina. Desta forma, as plantas WKS 63 e WKS 92 tiveram sua fertilidade feminina avaliada juntamente com as demais plantas de reprodução sexual que serviram como genitores femininos nos cruzamentos: B2, D16 e D25.

A planta WKS 63 teve um total de 42 inflorescências analisadas, somando um total de 7643 sementes das quais apenas 371 eram sementes cheias, possivelmente viáveis, representando uma fertilidade de 4,85%. A planta WKS 92 teve 40 inflorescências analisadas, somando 5191 sementes das quais apenas 359 eram sementes cheias, representando uma fertilidade de 6,92%. As plantas B2, D16 e D25 apresentaram taxas de 6,51; 36,23 e 35% de fertilidade feminina, respectivamente. Em um trabalho de Rebozzio et al. (2011), avaliando o conjunto de sementes de *P. notatum*, que serviu para

avaliar a fertilidade feminina, dois acessos coletados no Brasil, Q4008 e Q4012, ambos apomíticos obrigatórios, apresentaram 26,8% e 41,5% de sementes viáveis. Os acessos Q3778 e Q4023, apomíticos facultativos, coletados no Brasil e na Argentina, respectivamente, apresentaram 37,7% e 38,6% de cariopses.

Araújo et al (2005), analisando a fertilidade feminina no conjunto de sementes de tetraploides induzidos (sexuais) de *Brachiaria brizantha*, encontrou uma ampla gama de porcentagens de fertilidade, indo desde 2% até 32% nos testes de polinização aberta. Em plantas após autopolinização não foram obtidas sementes, e em duas plantas avaliadas com polinização controlada utilizando a cultivar Marandu, obtiveram conjunto de sementes de 5% e 18%.

Em contrapartida, no presente trabalho, a poliploidização induzida parece não ter alterado a meiose masculina, comprovada pelas altas porcentagens de grãos de pólen viáveis (Tabela 4). Para uma melhor avaliação da fertilidade feminina destas plantas, estas devem ser levadas para ensaios de fertilidade a campo na presença de polinizadores e agentes abióticos, como vento.

Espera-se que as próximas gerações obtenham um aumento da fertilidade feminina pela organização do pareamento cromossômico através das gerações. Já as plantas D16 e D25, que são progênie F1 de cruzamentos realizados por Weiler (2013), apresentaram boa fertilidade feminina, superando as avaliações com *B. brizantha* efetuadas por Araújo et al. (2005) em plantas sexuais duplicadas. A planta B2 apresentou baixa fertilidade feminina (6,51%). Especula-se que a mais baixa fertilidade feminina nesta planta tenha relação com a sua origem: o progenitor feminino deste híbrido (Q4188) é diferente do progenitor dos híbridos D16 e D25 (Q4205). Os resultados variáveis de fertilidade feminina estão de acordo com os dados obtidos por outros autores em *Bracharia brizantha* (Araújo et al., 2005) e *Paspalum notatum* (Rebozzio et al., 2011).

5.4. Híbridações intraespecíficas

Dos 25 cruzamentos realizados em câmara de hibridação com umidificador ambiental (Figura 6) utilizando as plantas apomíticas (doadoras de pólen) WKS 3, D3, C17, C2 e “Bagual” e os genótipos sexuais WKS 63, WKS 92, D16, D25, B2, obteve-se um total de 176 sementes cheias, possivelmente viáveis (Tabela 5).

Estes resultados refletem a dificuldade de produzir sementes viáveis sob condições de polinização artificial após um evento de duplicação cromossômica. Resultado semelhante foi obtido por Simioni & Valle (2009) que, após duplicar os cromossomos de três plantas de *Brachiaria decumbens*, realizaram polinizações artificiais e obtiveram apenas 0,55% de sementes viáveis a partir das flores polinizadas destas plantas poliploides. Luts et al (1991,1994) produziram híbridos viáveis em cruzamentos artificiais entre tetraploides artificiais de *B. ruziziensis* e tetraploides naturais de *B. decumbens*, conseguindo 31,4% de plantas híbridas resultante deste cruzamento e 8,7% no cruzamento de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*.



Figura 6. Câmara de hibridação com umidificador ambiental utilizada nos cruzamentos.

Tabela 5. Número (N^o) de flores polinizadas, número (N^o) de sementes viáveis, porcentagem de sementes obtidas e número (N^o) de sementes germinadas obtidas dos cruzamentos.

Cruzamento ♀ x ♂	N ^o Flores polinizadas	N ^o Sementes formadas	% Sementes obtidas	N ^o Sementes germinadas
B2 x Bag	185	7	3,78	2
B2 x C2	72	10	13,89	6
B2 x D3	9	0	0	0
D16 x Bag	10	0	0	0
D16 x C2	19	7	36,84	2
D16 x C17	51	3	5,88	2
D16 x D3	74	29	39,19	22
D16 x WKS 3	28	1	3,57	1
D25 x Bag	7	1	14,29	1
D25 x D3	7	0	0	0
D25 x WKS 3	8	0	0	0
WKS 63 x Bag	291	7	2,41	1
WKS 63 x C2	94	4	4,26	0
WKS 63 x C17	190	2	1,05	0
WKS 63 x D3	299	13	4,35	0
WKS 63 x WKS 3	164	8	4,88	0
WKS 63 x WKS 92	48	40	83,33	1
WKS 92 x Bag	143	18	12,59	10
WKS 92 x C2	65	0	0	0
WKS 92 x C17	67	5	7,46	1
WKS 92 x D3	101	0	0	0
WKS 92 x WKS 3	78	1	1,28	0
WKS 92 x WKS 63	38	20	52,63	16
Totais	2048	176		65

De um total de 176 sementes que formaram cariopses, 65 germinaram e duas definharam após a germinação. Atualmente existem 63 plantas híbridas sendo mantidas em casa de vegetação do Departamento de Plantas Forrageiras da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Figura 7). Estas plantas serão levadas futuramente para testes a campo para comprovação do valor agrônômico.



Figura 7. Plântulas da progênie F1 obtida dos cruzamentos em casa de vegetação (27/10/2014).

6. CONCLUSÕES

1. A existência de associações multivalentes e as irregularidades observadas nas análises meióticas não comprometerem a viabilidade polínica dos genótipos avaliados.

2. A fertilidade feminina das plantas duplicadas foi baixa, ainda assim estas plantas foram utilizadas nos cruzamentos e produziram sementes, sendo validadas como uma fonte de sexualidade utilizada para abrir variabilidade genética na espécie através dos cruzamentos com os genótipos apomíticos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção satisfatória de sementes obtidas nos cruzamentos, com a geração de híbridos intraespecíficos que serão oportunamente avaliados em ensaios no campo, abre um grande leque de possibilidades para o melhoramento de plantas forrageiras, corroborando com a preservação dos campos sulinos, evitando sua degradação, bem como sendo uma alavanca para a pecuária do sul do país, com a utilização de materiais bem adaptados, diversificando a produção forrageira.

Pela dificuldade encontrada em obter pólen viável no mesmo dia da abertura das flores que serviram como genitores femininos dos cruzamentos que se desejava realizar, e pelas poucas referências encontradas, uma etapa imprescindível neste programa de melhoramento seria a realização de estudos avaliando a conservação de pólen de *P. notatum* sob refrigeração e sua viabilidade após este procedimento.

Para efeitos de comparação com a fertilidade feminina das plantas duplicadas, análises da fertilidade feminina dos híbridos obtidos com as plantas duplicadas devem ser feitas. Desta forma pode ser avaliado o aumento da fertilidade feminina de uma geração para outra.

Também é importante que as análises futuras da fertilidade feminina sejam feitas de forma controlada, polinizando as inflorescências com um genitor de excelente viabilidade polínica e ensacando-as em seguida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, C. A. et al. Reproductive characterization of bahiagrass germplasm. **Crop Science**, Madison, v. 47, p.1711-1717, 2007.

ADAMOWSKI, E. V. et al. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.

ARAÚJO, A. C. G. et al. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 144, p. 39-40, 2005.

ASKER, S. E.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 298 p.

BARRETO, I. L. **O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul**. 1974. 258 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1974.

BATISTA, L. A. R.; NETO, A. R. Melhoramento genético de Gramíneas Forrageiras. In: SEMANA DO ESTUDANTE, 13., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000.

BATISTA, L. A. R. Representatividade taxonômica e caracterização morfológica e agrônômica dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*. (Palestra e workshop sobre plantas forrageiras). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2005.

BRASIL. Lei nº 9456, de 25 de abril de 1997. Institui a Lei de Proteção de Cultivares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 abr. 1997. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1997/lei-9456-25-abril-1997-349440-publicacaooriginal-1-pl.html>> Acesso em: 9 mar. 2015.

BEHLING, H. et al. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. In: PILLAR, V. de P. et al. (Org.) **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2009. P. 13-25.

BENCKE, G. A. Diversidade e conservação da fauna dos Campos do Sul do Brasil. In: PILLAR, V. P. et al. (Org.). **Campos Sulinos: conservação e uso**

sustentável da biodiversidade. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2009. p.101-121.

BILENCA, D.; MIÑARRO, F. **Identificación de áreas valiosas de pastizal en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil**. Buenos Aires: Fundación vida silvestre, 2004. 323 p.

BURTON, G.W. Bahiagrass types. **Agronomy Journal**, Madison, v. 38, p. 273-281, 1946.

BURTON, G.W. Artificial fog chambre facilitates *Paspalum* emasculation. **Journal American Society Agronomy**, Madison, v. 40, p. 281-282, 1948.

CAETANO, C. M.; BONFÁ, B. R. C. N. ; CANTO, M. W. Autotetraploidia e número cromossômico em uma cultivar de *Panicum maximum* Jacq (Gramineae/Poaceae). **Acta Agronômica**, Palmira, v. 55, p. 62-66, 2006.

CANTO-DOROW, T. S. **Revisão taxonômica das espécies sul-riograndenses de *Paspalum* I. (Grupo Notata) Poaceae- Panieae, com ênfase na análise da variação intra-específica de *Paspalum notatum* Flugge**. 1993. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

CARVALHO, P. C .F. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos biome: the natural grasslands dilemma. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON AGRARIAN REFORM AND RURAL DEVELOPMENT, 2006, Porto Alegre. **Proceedings...** Porto Alegre: FAO, 2006.

CARVALHO, P. C. F. et al. Produção Animal no Bioma Campos Sulinos. **Brazilian Journal of Animal Science**, João Pessoa, v. 35, n. Supl. Esp., p. 156-202, 2006.

CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contribution from the United States National Herbarium**, Washington, v. 28, p. 1-310, 1929.

CHEVRE, A. M. et al. Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oil seed rape wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 97, p. 90–98, 1998.

DAHMER, N. et al. Cytogenetic data for *Paspalum notatum* Flugge accessions. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.4, p. 381-388, 2008.

DALL'AGNOL, M; SCHIFINO-WITTMANN, M. T., Apomixia, Genética e Melhoramento de Plantas. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 2, p. 127-133, 2005.

DALL'AGNOL, M. et al. Perspectivas de lançamento de cultivares de espécies forrageiras nativas: o Gênero *Paspalum*. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL., 1., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia UFRGS, 2006. p. 147-160.

DE WET, J. M. J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W.H. (Ed.). **Polyploidy, biological relevance**. New York: Plenum Press, 1980. p. 3-16.

DICKINSON, T. A. Taxonomy of agamic complexes in plants: a role for metapopulation thinking. **Folia Geobotanica**, Praga, v. 33, p. 327-332, 1998.

ESPINOZA, F. et al. Genetic characterization of *Paspalum notatum* accessions by AFLP markers. **Plant Systematics and Evolution**, Austria. v. 258, p. 147-159, 2006.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Induction of tetraploid and rapid field method of detecting induced tetraploidy in Pensacola Bahiagrass. **Crop Science**, Madison, v.1, p.383-384. 1961.

HADLEY, H. H.; OPENSHAW, S. J. Interspecific and intergeneric hybridization. In: FEHER, W.R.; HADLEY, H.H. (Ed.). **Interspecific of crops plants**. Madison: ASA, CSSA, 1980. p.133-159.

HASENACK, H. et al. Cobertura vegetal atual do Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL, 2. 2007, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2007. p.15-21.

HORANDL, E. Species concepts in agamic complexes: Applications in the *Ranunculus auricomus* complex and general perspectives. **Folia Geobotanica**, Praga, v.33, p. 335-348, 1998.

KAMINSKI, J. et al. Resposta de biótipos da grama forquilha à calagem e à frequência de corte. **Ciência Animal**, Santa Maria, v. 28, p. 581-586, 1998.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1425-1437, 1993.

LUTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic behavior, pollen viability and seed set. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, p. 267-274, 1991.

LUTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Male and female sporogenesis and gametogenesis in apomitic *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and F1 hybrids with sexual colchicine induced tetraploid *Brachiaria ruziziensis*. **Euphytica**, Wageningen, v.78, 1-2, p. 19-25, 1994.

MARTÍNEZ, E. J. et al. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, Lund, v.135, p.19-25. 2001.

MENDES-BONATO, A. B. et al. **Caracterização citogenética de acessos de *Brachiaria brizantha* (Gramineae)**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 31 p. (Boletim de Pesquisa e desenvolvimento, 15).

MORAES-FERNANDES, M. I. B. **Genética e evolução do gênero *Paspalum* (Gramineae)**: contribuição ao estudo das espécies naturais do Rio Grande do Sul. 1971. 193f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1971.

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; BARRETO, I. L.; SALZANO, F. M.; Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum dilatatum*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Otawwa, v.10, n.131-138, 1968.

MORAES-FERNANDES, M. I. B.; BARRETO, I. L.; SALZANO, F. M.; Cytogenetic, ecologic and morphologic studies in Brazilian forms of *Paspalum notatum*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Otawwa, v.15, p. 523-531, 1973.

NABINGER, C. Manejo e Produtividade das Pastagens Nativas do Subtrópico Brasileiro. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL, 1., **Anais...** Canoas: ULBRA, 2006, p. 25-75.

NABINGER, C.; DALL'AGNOL, M. Principais gramíneas nativas do RS: características gerais, distribuição e potencial forrageiro. In: SIMPÓSIO DE FORRAGEIRAS E PRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2008, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2008, p.7-54.

NAUMOVA, T. N.; HAYWARD, M. D.; WAGENVOORT, M. Apomixis and sexuality in diploid and tetraploid accessions of *Brachiaria decumbens*. **Sexual Plant Reproduction**, Norman, v. 12, p. 43-52, 1999.

NORRMANN, G. A.; QUARÍN, C. L.; BURSON, B. L. Cytogenetics and reproductive behavior of different chromosome races in six *Paspalum* species. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 80, p. 24-28, 1989.

OVERBECK, G. E. et al. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v. 9, p.101–116, 2007.

PAGLIARINI, M. S. et al. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, Lund, v. 135, p.27-34, 2001.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose vegetal: um enfoque para a Caracterização de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA

A RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 2., 2004, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004, p. 24-41.

PARODI, L. R. Gramineas del genero *Paspalum*. **Revista del museo de la Plata**, Buenos Aires, v.1, n.14, p. 211-244, 1937.

PESSIM, C. et al. Meiotic Behavior in *Panicum maximum* Jacq. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae): hybrids and their genitors. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 417-422, 2010.

PODIO, M. et al. Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v. 298, p. 1625-1633, 2012.

POZZOBON, M. T.; VALLS, J. M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.1, p. 29-34, 1997.

QUARÍN, C. L.; HANNA, W. W.; FERNANDEZ, A. Genetic studies in diploid and tetraploid *Paspalum* species. **The Journal of Heredity**, Bazel, v. 73, p.254-256, 1982.

QUARÍN, C. L.; BURSON, B. L.; BURTON, G. W. Cytology of intra- and interespecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 145, n. 3, p. 420-426, 1984.

QUARIN, C.L.; NORRMANN, G. A. Cytology and reproductive behavior of *Paspalum equitans*, *P. lonanthum*, and their hybrids with diploid and tetraploid cytotypes of *P. Cromyorrhizon*. **Botanical gazette**, Chicago, n. 148, p. 386-391. 1987.

QUARÍN, C. L.; NORRMANN, G. A. Interspecific hybrids between five *Paspalum* species. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 151, n. 3, p. 366-369, 1990.

QUARÍN, C. L. et al. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, Norman, v. 13, p. 243-249, 2001.

QUARÍN, C. L. The nature of apomixes and its origin in Panicoideae grasses. **Apomixis Newsletter**, México, v. 5, p. 8-15, 1992.

QUARÍN, C.L. A Tetraploid cytotype of *Paspalum durifolium*: cytology, reproductive behavior and this relationship to diploid *P. intermedium*. **Hereditas**, Lund, v. 121, p. 115-118, 1994.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501, 1998.

REBOZZIO, R. N. et al. Residual sexuality and its seasonal variation in natural apomictic *Paspalum notatum* accessions. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 55, p. 391-395, 2011.

REIS, C. A. O.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen fertility in a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 8, p. 212-218, 2008.

RISSO-BARBOSA, M. **Caracterização e avaliação da produção de forragem de híbridos intraespecíficos selecionados de *Paspalum notatum* Flugge**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

RISSO-PASQUOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Multiple spindle sand cellularization during microsporogenesis in an artificial induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 522-527, 2005.

SCHIFINO, M. T.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Cytological comparison of diploid and autotetraploid *Trifolium riograndense* Burkart. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 637-643, 1986.

SCHIFINO, M. T.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Induction of polyploidy and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Burkart (Leguminosae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 36, p. 863-872, 1987.

SIMIONI, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Sexual polyploidization in red clover. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, n.1, p 26-31. 2006.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. Rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 9, p. 328-334, 2009.

SIMIONI, C.; VALLE, C. B. Meiotic analysis in induced tetraploids of *Brachiaria decumbens* Stapf. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 11, p. 43-49, 2011.

SINCLAIR, T. R., MISLEVY, P.; RAY, J. D. Short photoperiod inhibits winter growth of subtropical grasses. **Planta**, Heidelberg, v. 213, p. 488-491, 2001.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal Evolution in higher plants**. London: Edward Arnold LTD., 1971. 216 p.

STEIN, J. et al. Tetraploid races of *Paspalum notatum* show polysomic inheritance and preferential chromosome pairing around the apospory-controlling locus. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 109, p. 186-191. 2004.

STEIN, J. et al. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. **Molecular breeding**. Tabarestan, v. 20, p. 153-166, 2007.

STRAPASSON, E. et al. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum sp.* por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, p. 373-381, 2000.

SYBENGA, J. Manipulation of genome composition. B. Gene Dose: duplication, polyploid and gametic chromosome number. In: CYTOGENETICS in plant breeding. Berlin: Springer, 1992. p. 327-368.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM HELD IN TULLN, 1997, Viena. **Proceedings...** Viena: Universitäts Verlag, 1997. p. 22-32.

TOWNSEND, C. **Características produtivas de gramíneas nativas do gênero *Paspalum*, em resposta a disponibilidade de nitrogênio**. 2008. 255 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2008.

VALLE, C.B.; PAGLIARINI, M.S. Biology, Cytogenetics, and Breeding of *Brachiaria*. In: Singh, R.J. (Ed.). **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement**. Boca Raton: New York: 2009. v.5, p.103-151.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*, In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163.

VALLE, C. B. Recursos genéticos de forrageiras para áreas tropicais. In: CONFERÊNCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE PRODUÇÃO ORGÂNICA DE BOVINOS DE CORTE, 2002, Via Internet. **Anais...** Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br>. Acesso em: 13 de julho de 2014.

VALLS, J. F. M.; POZZOBON, M. T. Variação apresentada pelos principais grupos taxonômicos de *Paspalum* com interesse forrageiro no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*. 1987, São Paulo. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987. p. 15-21.

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de espécies de *Paspalum* no Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*. 1987, São Paulo. **Anais...** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1987. p.3-13.

VALLS, J. F. M. et al. Patrimônio florístico dos campos: potencialidades de uso e a conservação de seus recursos genéticos. In: PILLAR, V. de P. et al. (Org.). **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**, Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009. p. 139-154.

WEILER, R. L. et al. Viabilidade de pólen e indução de poliploidia em *Paspalum notatum* Flugge para viabilização de cruzamentos intraespecíficos. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE BREEDING, 2., 2009, Campo Grande. **Proceedings...** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2009.

WEILER, R. L. et al. Produção de forragem de híbridos intraespecíficos de *Paspalum notatum*. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE BREEDING, 3., 2011, Bonito. **Proceedings...** Bonito: Embrapa Gado de Corte, 2011a. p. 222-224.

WEILER, R. L. et al. Determinação do modo de reprodução de híbridos de *Paspalum notatum* utilizando marcadores moleculares In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM OF FORAGE BREEDING, 3., 2011, Bonito. **Proceedings...** Bonito: Embrapa Gado de Corte, 2011b. p. 225-227.

WEILER, R. L. **Hibridação intraespecífica, determinação do modo de reprodução e duplicação cromossômica de *Paspalum notatum* Flüggé**. 2013. 122f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

WEILER, R. L. et al. Chromosome doubling in *Paspalum notatum* var. *saure* (cultivar Pensacola). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 15, p. 106-111, 2015.

YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW, E. C. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporus apomixis in grasses. **Canadian Journal of Botany**, Otawwa, v. 57, p.1668-1672, 1979.

ZULOAGA, F. O.; PENSIERO, J; MORRONE, O. Systematics of *Paspalum* Groups *Notata* (Poaceae – Panicoideae – Paniaceae). **Systematic Botany Monographs**, Lamarie, v. 71, p. 1-75, 2004.

9. VITA

Karine Cristina Krycki nasceu em Porto Alegre em 15 de setembro de 1983. Filha de Angela Cristina Kravczyk e Mario Krycki. Coursou o ensino fundamental na Escola Espírito Santo e na Escola Estadual no Bairro Jardim Lindóia. Frequentou o ensino médio na Escola Estadual Dom João Becker. Em 2006 ingressou na Faculdade de Agronomia/UFRGS, onde desenvolveu atividades de extensão no projeto Conexões de Saberes pelo período de dois anos e posteriormente iniciação científica no Departamento de Plantas Forrageiras por três anos. Gradou-se Engenheira Agrônoma em 2012. Em Abril de 2013 ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, área de concentração Plantas Forrageiras como bolsista da CAPES.