

## Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico

**Vânia Helena Techio<sup>1\*</sup>**  
**Lisete Chamma Davide<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Contestado – UnC

Rua Vitor Sopelsa, 3000, CEP 89.700-000, Concórdia-SC, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras – UFLA, Depto de Biologia, Lavras-MG, Brasil

\*Autor para correspondência  
vht@uncnet.br

Submetido em 24/04/2007

Aceito para publicação em 31/07/2007

### Resumo

A presente revisão tem como propósito apresentar os princípios e aplicações da análise genômica clássica, com ênfase no melhoramento de plantas. São apresentados e discutidos os principais modelos matemáticos utilizados para estimar o pareamento cromossômico preferencial em híbridos diplóides ou poliplóides, interespecíficos ou intergenéricos, com especial referência às aplicações e estudos para definição de relacionamentos genômicos entre espécies da família Poaceae.

**Unitermos:** afinidade genômica, meiose, híbridos interespecíficos, Poaceae

### Abstract

**Genomic analysis of plant chromosomes based on meiotic pairing.** This review presents the principles and applications of classical genomic analysis, with emphasis on plant breeding. The main mathematical models used to estimate the preferential chromosome pairing in diploid or polyploid, interspecific or intergeneric hybrids are presented and discussed, with special reference to the applications and studies for the definition of genome relationships among species of the Poaceae family.

**Key words:** genomic affinity, meiosis, interspecific hybrids, Poaceae

### Introdução

A análise genômica clássica envolve a avaliação do comportamento cromossômico na metáfase I em híbridos interespecíficos, com o propósito de estabelecer relacionamentos filogenéticos em grupos de diferentes espécies (Dewey, 1982; Seberg e Petersen, 1998). Além de ser empregada na definição de posicionamentos taxonômicos e evolutivos, a análise genômica tem sua

maior aplicabilidade no melhoramento genético, pois a estimativa da afinidade genética fornece um indicativo da melhor combinação para troca de alelos entre as espécies.

Com o objetivo de estimar o pareamento cromossômico e o grau de relacionamento genético entre parentais de híbridos poliplóides, vários modelos matemáticos foram propostos, principalmente, a partir de

1980 (Driscoll et al., 1980; Alonso e Kimber, 1981; Jackson e Casey, 1982; Jackson e Hauber, 1982; Sybenga, 1988 e 1994; Crane e Sleper, 1989; Chapman e Kimber, 1992a e 1992b). Esses modelos são importantes porque expressam numericamente a afinidade genética entre as espécies e auxiliam no planejamento e na definição de cruzamentos interespécíficos e intergenéricos.

Com avanço das pesquisas na área molecular, houve uma redução nos estudos envolvendo análise genômica clássica. Entretanto, é importante ressaltar que a utilização de dados de pareamento cromossômico apresenta algumas vantagens sobre outros procedimentos, tais como o baixo custo das técnicas empregadas e a possibilidade de observar características dos cromossomos individuais e das configurações e estágios de condensação da cromatina, os quais fornecem informações sobre as propriedades dos cromossomos envolvidos. Além disso, a homologia/homeologia em relação à estrutura e ao conteúdo gênico observada nas diferentes configurações cromossômicas assumidas durante a meiose fornece a evidência direta de fluxo gênico entre as espécies parentais utilizadas em um cruzamento, demonstrando o grau de proximidade filogenética entre elas.

A análise genômica utilizando dados do pareamento cromossômico é, portanto, ferramenta de suporte indispensável nas etapas de planejamento e seleção de genótipos, manipulação e monitoramento de um programa de melhoramento genético. Assim, a presente revisão tem como propósito apresentar os princípios e aplicações da análise genômica clássica, com ênfase no melhoramento de plantas.

### As contribuições dos estudos meióticos para análise genômica

A expressão análise genômica foi empregada pela primeira vez por Kihara, em 1930 no artigo *Genome analysis of Triticum and Aegilops*. O autor propôs a definição dos genomas e uma ilustração esquemática do método geral de análise (Figura 1).

Quando a espécie autotetraplóide AAAA (I) representada no círculo central do triângulo é o objeto da análise, todos os cruzamentos com as linhagens diplóides (AA, BB e CC) formam univalentes ( $x_1$ ) e

bivalentes ( $x_{II}$ ) nas figuras meióticas da geração F1. Considerando um cruzamento com AA, é possível o aparecimento ocasional de trivalentes ( $x_{III}$ ). Nesse caso, as características morfológicas de ambos os parentais são semelhantes. No caso de um dos três cruzamentos testes apresentar  $3x_1$ , como mostrado no modelo II, a amostra testada é AABB (Kihara, 1930 e 1982).

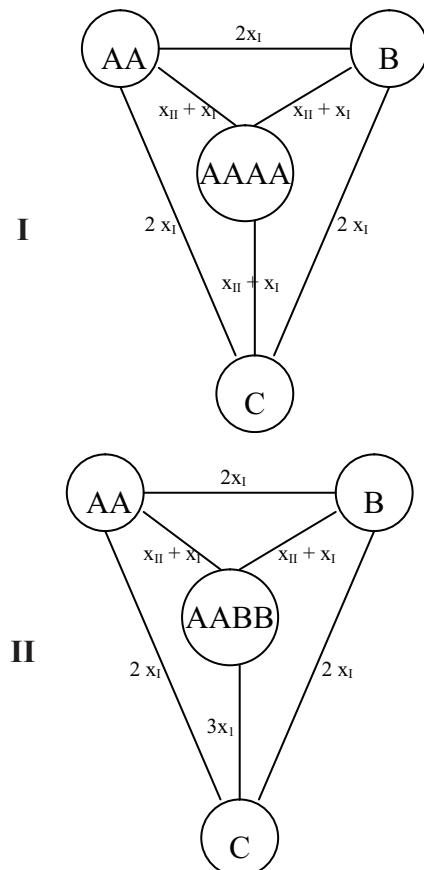


FIGURA 1: Modelo esquemático para análise genômica. I. Para autotetraplóides e II. Para allotetraplóides. A determinação do tipo de genoma constituinte, A, B ou C é dada pela comparação morfológica dos analisadores AA, BB e CC.  $x_1$  e  $x_{II}$  se referem às configurações meióticas univalentes e bivalentes (Kihara, 1930).

Quando se dispõe das espécies diplóides para efetuar os cruzamentos, utiliza-se o método dado nos modelos esquemáticos funcionais. Essas espécies diplóides são denominadas analisadores. Nos estudos com *Triticum*, em que as espécies AA estavam disponíveis e as BB eram desconhecidas, o centeio (*Secale cereale* L.) foi usado para auxiliar na determinação do nível de

ploidia do trigo. O híbrido F1 trigo-centeio apresentou 28 univalentes, indicando ausência de homologia genômica (Kihara, 1982). O autor alerta que nem sempre é possível aplicar o método esquemático, sendo necessário promover algumas modificações. Quando não se dispõe das espécies com genoma CC, por exemplo, AABB pode ser determinada pelo método mostrado na figura 2.

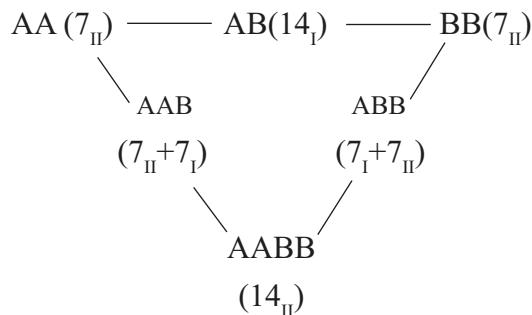


FIGURA 2: Modelo esquemático para análise genômica, considerando um alótetraploíde AABB e analisadores AA e BB e entre dois analisadores, onde I e II se referem às configurações univalentes e bivalentes (Kihara, 1982).

Atualmente, considera-se que a análise genômica, em seu sentido amplo, refere-se à descrição de características do genoma das espécies empregando diversas técnicas. Aplicam-se aqui as análises cariotípicas e de pareamento cromossômico meiótico, medições da quantidade de DNA, hibridação *in situ*, análises com enzimas de restrição, mapeamento genômico, entre outros (Seberg e Petersen, 1998). A utilidade relativa de cada técnica depende, segundo Jauhar e Crane (1989), do grau com a qual ela mede direta ou indiretamente a similaridade do DNA das espécies relacionadas.

Restritamente, a análise genômica refere-se ao estudo do pareamento cromossômico na metáfase I da meiose em híbridos e, por esse motivo, é também denominada *análise genômica clássica*. Esse tipo de análise tem o propósito de estabelecer relacionamentos filogenéticos entre um grupo de organismos. Nesse caso, a metodologia baseia-se no pressuposto de que somente cromossomos similares (homólogos) pareiam na meiose e que o grau de pareamento nos híbridos reflete o grau de relacionamento entre as espécies parentais (Dewey, 1982). Afirmações semelhantes são apresentadas por Riley (1966) ao considerar que duas

espécies têm genomas distintos quando seus cromossomos são diferentes em estrutura e conteúdo gênico, de forma que não pareiam na meiose quando reunidos em um híbrido. Esse comportamento leva à esterilidade e, consequentemente, ao isolamento genético entre as espécies.

A contribuição mais efetiva da análise genômica clássica, em termos de conhecimento da história evolutiva, foi para a tribo Triticeae, com especial referência aos gêneros *Triticum* e *Aegilops* (Kihara, 1930 e 1982; Gupta, 1991; Singh, 1993), *Hordeum* (Bothmer et al., 1989) e *Elymus* (Aung e Walton, 1990; Salomon, 1993). As informações citogenéticas obtidas permitiram uma melhor manipulação do germoplasma disponível, possibilitando explorar a variabilidade genética e contribuir com o aumento da produção e melhor adaptação das espécies às diferentes condições ambientais.

A análise meiótica aplicada ao estabelecimento das relações genômicas apresenta vantagens teóricas e práticas sobre outros métodos que compararam, direta ou indiretamente, o DNA de diferentes espécies (Chapman e Kimber, 1992a). Para Kimber et al. (1981) e Kimber e Yen (1990) nos estudos meióticos utilizando coloração convencional, a demanda de equipamentos e reagentes químicos é menor do que a necessária para estudos moleculares e, ainda, o estudo do comportamento meiótico permite acessar uma porção maior do DNA, melhor representada entre e dentro dos cromossomos. Os resultados obtidos podem ser empregados em genética de populações, na preservação de recursos genéticos e em programas de melhoramento, pois quando dois genomas são suficientemente similares de modo a exibir pareamento na meiose tem-se a evidência direta de que pode haver fluxo gênico entre eles, por meio de recombinação.

Na visão de Sybenga (1995), o pareamento meiótico tem um significado evolutivo além da seqüência de DNA e da ordem gênica, ou seja, o “sistema de pareamento cromossômico”, o qual sofre sua própria divergência evolutiva durante a especiação.

Ao considerar o pareamento cromossômico como principal fonte de informação para análise genômica, Singh (1993) discriminou-o da seguinte maneira: (1)

pareamento intragenômico, que ocorre quando as espécies parentais apresentam genomas semelhantes, de tal forma que os híbridos exibem pareamento completo ou quase completo em 75 a 100% dos meiócitos. Algumas vezes, os genomas das espécies podem diferir devido a translocações ou inversões paracêntricas, as quais também são reconhecíveis na análise meiótica; (2) pareamento intergenômico, no qual as configurações cromossômicas dependem do grau de afinidade genômica das espécies parentais. Se estas são distamente relacionadas é comum a formação de univalentes, como resultado de diferenças estruturais entre os cromossomos. Os híbridos gerados de parentais com genomas dissimilares geralmente são estéreis, frágeis e com pouco crescimento vegetativo e reprodutivo, e (3) pareamento mínimo e variável (homeólogo – semi-homólogo), que é comum em híbridos intergenômicos, mas pode ocorrer também nos intragenômicos. Nesses casos, podem ser também formados bivalentes normais, mas parcialmente pareados, sugerindo que existe pouca afinidade cromossônica, o que resulta na ocorrência de poucos quiasmas. É preciso considerar que quanto maior o número de univalentes, menor a afinidade genômica.

A acurácia no uso da meiose para análise genômica pode ser aumentada utilizando-se técnicas de bandeamento cromossômico, hibridação *in situ* genômica (GISH) e imunocoloração, as quais possibilitam melhor resolução e definição dos cromossomos envolvidos nas configurações de pareamento. A hibridação *in situ* genômica (GISH) do DNA dos parentais com os cromossomos do híbrido tem sido aplicada com sucesso em diversos gêneros de plantas (Han et al., 2004; Brasileiro-Vidal et al., 2005; Leflon et al., 2006; Zhang et al., 2006), possibilitando identificar a origem dos cromossomos e separá-los por genomas.

Em relação às técnicas de coloração diferencial, Gill e Sears (1988) compararam metáfases I de *Triticum turgidum* L. (2n=28, AABB) e *T. timopheevii* Zhukov (2n=28, A<sup>t</sup>A<sup>t</sup>GG) por meio de coloração convencional e bandeamento N. A coloração convencional identificou cinco tipos de configurações: univalentes, bivalentes em anel e bastão, trivalentes e tetravalentes. A coloração obtida com o bandeamento N mostrou 17

tipos de configurações baseadas na identificação individual dos cromossomos. Esse procedimento permitiu verificar que muitos univalentes e bivalentes em bastão envolviam os genomas B/G e a maioria dos bivalentes pareados pertencia aos genomas A/A<sup>t</sup>. Também foram identificadas translocações envolvendo vários cromossomos.

Fernández-Calvin et al. (1995) analisaram o pareamento meiótico em híbridos de *Aegilops variabilis* Eig. x *Secale cereale* L. por meio de bandeamento C e coloração convencional. A afinidade genômica entre os genomas U, S e R foi estimada com base nos dados da metáfase I e utilizando o modelo matemático de Alonso e Kimber (1981). Os resultados obtidos foram contraditórios, pois se observou pareamento preferencial entre os genomas U e S com o bandeamento C, enquanto que o modelo apontou pareamento aleatório. Essa discordância, segundo os autores, pode ser explicada pela ocorrência de translocações, as quais não foram detectadas por meio da técnica de coloração convencional.

Um ponto questionável nos estudos realizados por Fernández-Calvin et al. (1995) é o fato de terem sido analisadas somente células em metáfase I, o que pode fornecer uma visão limitada do pareamento, especialmente quando se utiliza coloração convencional. As configurações observadas nas metáfases I não são, necessariamente, as que melhor caracterizam a constituição cromossônica, pois podem resultar de quebras em configurações maiores de pareamento como consequência da limitada formação de quiasmas (considerando os possíveis efeitos das translocações). Ainda, de acordo com Sybenga (1992), a configuração observada em uma célula específica é apenas uma das diferentes alternativas de pareamento. Assim, a avaliação de diferentes fases da meiose e a observação de anormalidades controladas geneticamente (assinapses e dessinapses) podem fornecer informações mais seguras sobre as propriedades dos cromossomos envolvidos, mostrando-se úteis no diagnóstico de irregularidades (Sybenga, 1992).

Os possíveis erros na definição de pares cromossômicos por técnicas citogenéticas convencionais também podem ser minimizados com a avaliação de um número adequado de células. A. Kimber em comunicação pessoal a Crane (1996) sugeriu avaliar de 20 a 30

células para calcular a afinidade genômica usando modelos matemáticos. Techio et al., (2005) avaliaram 50 células em diacinese para determinar a afinidade entre os genomas A, A' e B dos híbridos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.).

Embora a utilização de dados de pareamento cromossômico seja importante e forneça um bom indicador do grau de relacionamento genético, alguns autores têm questionado a sua aplicação direta em filogenia. Jackson (1991) referiu-se especialmente à questão do controle genético do pareamento e citou como exemplo os resultados com mutantes PC (controle do pareamento) e as análises clássicas no trigo com o gene Ph e seus alelos que mostram a possibilidade de conversão de um bivalente de um alopóplóide em univalente e multivalente.

Para Jauhar e Crane (1989), as limitações da utilização do pareamento meiótico referem-se a três aspectos: (1) o pareamento cromossômico da forma como se apresenta na metáfase I da meiose pode não representar a identidade da seqüência de nucleotídeos em cada loco; (2) a freqüência de pareamento nos híbridos pode ser influenciada pelos genótipos dos parentais, e (3) a análise genômica é possível somente se a hibridização de dois taxa resultar na formação de híbridos viáveis. Do contrário, a análise genômica é útil para comparações em nível de espécie, mas tem a sua aplicabilidade reduzida para híbridos.

Seberg e Petersen (1998) apresentaram em quatro pontos principais as críticas à utilização da análise genômica em filogenia: (1) a falta de relação entre o conceito de homologia na análise genômica e o conceito clássico em morfologia e sistemática molecular; (2) a possível influência do ambiente, de genes específicos e dos cromossomos B sobre o pareamento; (3) a magnitude e padrão de variação do pareamento cromossômico em híbridos, e (4) o problema de identificação dos pareamentos durante a meiose.

Além da observação exclusiva do pareamento meiótico, outras metodologias têm sido atualmente utilizadas na análise genômica. As técnicas GISH e GISH multicolor, por exemplo, foram utilizadas por Hang et

al. (2004) na determinação da constituição citogenética de cinco linhagens anfiplóides obtidas a partir de cruzamentos entre trigo x *Thinopyrum intermedium* (Host.) Barkworth & D. R. Dewey. Os dados obtidos permitiram verificar que ocorre transferência intergenômica de segmentos de cromossomos e/ou introgressão de seqüências nos anfiplóides sintetizados independente do seu comportamento diplóide e herança dissômica.

A constituição genética de três taxa de *Hystrix* também pode ser analisada por meio de GISH. Os resultados foram comparados com as configurações de pareamento na meiose, permitindo sugerir que *H. patula* Moench. (genoma StH) pode ser incluída no gênero *Elymus* e que *H. duthiei* (Stapf) Bor. ssp. *duthiei* e *H. duthiei* (Stapf) Bor. ssp. *longearistata* (Hack.) (genoma NsXm) podem ser transferidas para *Leymus* (Zhang et al., 2006).

Outro estudo envolvendo o uso de GISH associado à imunolocalização foi conduzido por Leflon et al. (2006) com híbridos de *Brassica napus* L. (genoma AACC) x *Brassica rapa* L. (genoma AA). A extensão do pareamento cromossômico foi investigada na prófase I por anticorpos que reconhecem as proteínas ASY1, associadas aos eixos cromossômicos, e ZYP1 envolvidas na formação do complexo sinaptonêmico, o qual indica a ocorrência de pareamento cromossômico. Na maioria dos meiócitos, os cromossomos homólogos do genoma A parearam regularmente, enquanto que os cromossomos do genoma C permaneceram como univalentes, mas estavam envolvidos em pareamentos homeólogos em 21,5% das células e 13% recombinaram ou sofreram quebras. A taxa de transmissão dos cromossomos C dependeu de um cromossomo particular e da forma como o híbrido foi cruzado, como parental masculino ou feminino, para *B. napus* ou *B. rapa*. Os autores constataram que as transferências de genes nos híbridos triplóides foram favorecidas entre os genomas A e B das duas espécies, mas também ocorreram entre A e C em taxas menores.

Com base no exposto, parece razoável que a avaliação exclusiva das configurações de pareamento não seja empregada como prova contundente para o estabelecimento das relações filogenéticas, mas sim como um indicativo da similaridade genética a ser associada

com outras informações sobre as espécies. Essa recomendação também é dada por Jauhar e Crane (1989) ao considerarem que a análise genômica é um dos mais importantes critérios para a definição de relacionamentos filogenéticos e para a delimitação biossistêmática de um taxa. Os autores enfatizam ainda a necessidade de estudos multidisciplinares quando se deseja extrapolar os resultados para definições taxonômicas e inferências evolutivas.

### Modelos matemáticos aplicados à análise genômica

A fim de estimar o pareamento cromossômico preferencial, vários autores propuseram modelos matemáticos, os quais podem ser aplicados em híbridos diplóides ou poliplóides, interespecíficos ou intergenéricos (Menzel e Martin, 1970; Driscoll et al., 1979 e 1980; Alonso e Kimber, 1981; Jackson e Casey, 1982; Jackson e Hauber, 1982; Sybenga, 1988; Crane e Sleper, 1989; Chapman e Kimber, 1992a e 1992b; Sybenga, 1994). Os principais termos e definições empregados na análise genômica são apresentados por Driscoll et al. (1979), Kimber et al. (1981) e Chapman e Kimber (1992a).

A base pragmática desses modelos aceita várias simplificações a respeito do processo meiótico e que são empregadas pela maioria dos autores. A primeira delas considera que cada braço cromossômico representa um elemento pareado independente, não influenciado pelo pareamento do outro braço. A segunda é que o pareamento de um braço cromossômico exclui qualquer envolvimento de um terceiro. Essa pressuposição deriva de observações em que, na maioria dos híbridos, predominam figuras meióticas simples, em bastão (abertos) ou anel. A observação de figuras mais complexas indica a ocorrência de translocações e por serem eventos raros, são negligenciadas pelos modelos. A última consideração é a de que a tendência de pareamento entre braços homeólogos de dois genomas é a mesma, independente dos grupos homeólogos ou braços cromossômicos que representam (Chapman e Kimber, 1992a). Alguns modelos empregam diferentes variáveis que refletem nas estimativas obtidas.

No modelo proposto por Menzel e Martin (1970), obtém-se um Índice de Afinidade Genômica (IAG) a partir da freqüência média de bivalentes (e multivalentes) dividida pelo número básico de cromossomos. Na meiose de híbridos F1 com pareamento completo ou quase completo, o IAG varia de 0,9 a 1,0, sugerindo que os genomas das espécies parentais são similares. Híbridos intergenéticos apresentam valores de IAG com variação de 0,0 a 0,89, dependendo do grau de homologia cromossômica.

Considerando que a associação pré-sinápтика de cromossomos homólogos é um pré-requisito para seqüência de eventos que levam à formação de quiasmas, Driscoll et al. (1979) propuseram em seu modelo que essa associação entre homólogos, ocorre com probabilidade  $a$  e a formação de quiasmas ocorre independentemente em braços cromossômicos, com probabilidade  $c$ . Os valores  $a$  e  $c$  foram estimados a partir das freqüências das diferentes configurações cromossômicas na metáfase I do trigo hexaplóide e algumas linhagens derivadas.

O modelo proposto por Alonso e Kimber (1981) é um dos mais frequentemente utilizados para estabelecer relações de afinidade genética em híbridos triplóides. Esse modelo preconiza que há uma relação simétrica entre os genomas, em que os genomas 1 e 2 são mais relacionados (não necessariamente homólogos) com uma afinidade relativa de  $x$  e ambos são distamente relacionados ao genoma 3, com uma afinidade relativa  $y$ , de forma que  $x > y$ . A proporção entre os genomas 1:2, 1:3 e 2:3 é  $x:y:y$ . Para relacionar as duas variáveis, considera-se  $x + 1 = y$ , em que  $x$  varia de 0,5 a 1,0. Esse modelo requer o registro do número de univalentes, bivalentes em anel e em bastão e trivalentes. Essas informações são importantes, pois a formação de bivalentes em anel e de trivalentes é inversamente relacionada, ou seja, a ocorrência de trivalentes reduz o número de bivalentes em anel e de univalentes e deve ser esperada, exceto quando  $x=1$ .

Se o número de trivalentes observado é maior do que o número de bivalentes em anel ( $x < 0,8$ ), o híbrido é classificado como 3:0 e todos os seus genomas são idênticos (autopoliplóides) ou são diferentes (alopoliplóides). Se o número de trivalentes é menor do que o

de bivalentes em anel, o grau de homologia é duvidoso e os valores da afinidade relativa ( $x$ ) e a freqüência média com que dois braços cromossômicos relacionados pareiam ( $c$ ) devem ser considerados. Já os híbridos do tipo 2:1 apresentam dois genomas mais relacionados e ambos apresentam menor afinidade com o terceiro genoma (Alonso e Kimber, 1981).

Esse modelo adota uma simplificação em que o valor de  $x$  é estimado com a proporção de bivalentes em anel, univalentes e trivalentes, pois as freqüências das configurações meióticas de três univalentes ou um univalente mais um bivalente em bastão dependem somente da freqüência com que dois braços cromossômicos pareiam, estimada pelo valor de  $c$ . As freqüências de bivalentes em bastão e univalentes não contêm informações sobre o pareamento preferencial, que está presente somente na relação entre trivalentes e bivalentes em anel, ou seja, a relação da afinidade entre  $x$  e  $y$  ocorre somente na formação dessas duas configurações.

De acordo com Jackson (1991), em alguns exemplos citados por Alonso e Kimber (1981) é evidente que dois genomas ( $x=7$ ) não pareiam completamente, pois quando ocorre pareamento intergenômico, a presença de univalentes leva à obtenção de um número cromossômico que excede o número básico (sete), ou seja, ultrapassa o número de bivalentes. Isso indica ausência de pareamento dos bivalentes no paquíteno e/ou trivalentes e requer o uso das equações para pareamento homeólogo e afinidade relativa. Para Alonso e Kimber (1981), o modelo dispõe de um bom ajuste para o pareamento homeólogo. Teoricamente, quando dois genomas são homólogos, espera-se que sejam formados sete bivalentes e sete univalentes. A ausência de pareamento não ocorre em todos os aloploplóides. Se isto ocorrer, é provável que seja resultado de mutações PC nos genitores diplóides transmitida via gametas não reduzidos ou devido a mutações que se processam após o estabelecimento do poliplóide.

Sybenga (1994) considerou que o modelo de Alonso e Kimber (1981) apresenta uma limitação quando se trata de estudos com híbridos poliplóides complexos, pois não permite a obtenção de mais do que dois parâmetros de afinidade, o que deve ser esperado nessas circunstâncias. O autor recomendou que os modelos

considerem as diferentes possibilidades de combinações genômicas. Em tetraplóides, por exemplo, seriam AAAA, AABB, AAAB ou AABC. A partir disso, os resultados estimados devem então ser comparados com as observações originais e o modelo precisa fornecer um bom ajuste para representar melhor a situação real.

Jackson e Casey (1982) apresentaram um método para determinar as freqüências de várias configurações meióticas em autopoliploides. O modelo considera a freqüência média de dois, três e quatro quiasmas por bivalente para triplóides e tetraplóides e dois quiasmas por bivalente para pentaplóides, hexaplóides, heptaplóides e octaplóides. Os autores testaram dados da literatura para autotriplóides, autotetraplóides, allotetraplóides e alopentaplóides conhecidos, compararam os resultados com aqueles obtidos a partir de outros modelos e obtiveram uma boa concordância entre o número de configurações meióticas observadas e esperadas.

Em 1982, Jackson e Hauber descreveram a obtenção de coeficientes de correção para modelos com dois quiasmas em autotriplóides e autotetraplóides. Foi proposta a correção das freqüências das configurações meióticas obtidas do método binomial quando o valor de  $P$  é  $\geq 0,5$  e equações para o cálculo direto das freqüências das configurações meióticas.

Para Sybenga (1994), os modelos propostos pelo grupo de Jackson (Jackson e Hauber, 1982; Jackson e Casey, 1982) consideram corretamente a possibilidade de mais do que um ponto de permuta genética nas fases iniciais da prófase, mas não são realistas com relação ao papel dos quiasmas, pois não há distinção entre os braços cromossômicos. No modelo de Sybenga (1988) para híbridos triplóides, as afinidades entre os três genomas reunidos em um híbrido triplóide são representadas separadamente, considerando as três combinações possíveis entre três cromossomos. Essa condição produz uma série de possibilidades para cada fator de afinidade, estimado como fatores de pareamento preferencial ( $p$ ). Assim, existem três valores de  $p$ , um para cada uma das três possíveis combinações:  $p_1$ ,  $p_2$  e  $p_3$ . Quando um valor de  $p$  é positivo (a freqüência de pareamento é maior em relação a um terceiro), isso deve ser compensado pelo valor negativo para uma ou ambas das outras combinações.

Crane e Slep (1989) estimaram todas as possíveis relações de afinidade entre três (em triplóides) e quatro (em tetraplóides) genomas diferentes, além dos parâmetros para formação de quiasmas nos dois braços cromossômicos para as diferentes combinações de pareamento. Nos triplóides, significa o uso de nove variáveis envolvendo todas as possibilidades de pareamento entre os três genomas. É possível através desse modelo, diferenciar os braços longos e curtos dos cromossomos, mas como os cromossomos estão relacionados por uma proporção efetiva de braços, o padrão de afinidade genômica é o mesmo para ambos os braços. Estatisticamente, o modelo é superparametrizado e, portanto, fornece múltiplas soluções que produzem as mesmas análises meióticas esperadas. As variações dessas soluções podem ser obtidas por repetidas otimizações a partir dos valores iniciais escolhidos aleatoriamente dentro das variações permitidas das variáveis. Nesse caso, os autores expressaram o padrão otimizado da afinidade genômica em termos das proporções das associações na metáfase I devido a cada combinação de pareamento dos genomas.

A principal consequência do emprego do modelo de Crane e Slep (1989) é que se obtêm vários parâmetros de afinidade, em vez de um único resultado, pois existem mais variáveis do que graus de liberdade nos dados dos quais eles são estimados. Para alguns autores (Chapman e Kimber, 1992a; Seberg e Petersen, 1998), a complexidade do modelo de Crane e Slep (1989) não se justifica, pois eles utilizam as mesmas simplificações classicamente aceitas pela análise genômica e, na comparação feita com outros modelos, as relações genômicas obtidas não foram significativamente diferentes.

Chapman e Kimber (1992a) revisaram a teoria do modelo de Alonso e Kimber (1981) e eliminaram a tendência que existia na estimativa da afinidade relativa ( $x$ ), usando a média ponderada das freqüências das figuras meióticas observadas e calculadas pelo número de cromossomos em cada tipo de figura.

Em relação aos modelos descritos, há uma boa concordância entre os valores calculados e observados, mas isso também depende dos ajustes adotados. Por exemplo, Chapman e Kimber (1992a) atribuem um

peso diferente para cada figura meiótica (univalente, bivalente e trivalente), enquanto Alonso e Kimber (1981) atribuem o mesmo valor para um univalente e para um trivalente e isso tende a favorecer a freqüência dos univalentes e refletir na afinidade genômica. No modelo de Chapman e Kimber (1992a) tem-se um valor mais real da freqüência das figuras meióticas. As diferenças podem ser também explicadas porque o valor calculado exprime as possibilidades de pareamento, que não necessariamente são mostradas nas células, pois determinado genótipo pode não apresentar, por exemplo, o pareamento preferencial exibido por outros.

Para superar a limitação no cálculo dos parâmetros de afinidade, Chapman e Kimber (1992b) também desenvolveram um segundo modelo para atender as condições de pareamento cromossômico de híbridos tetraplóides e pentaplóides. Os autores incorporaram um terceiro parâmetro de afinidade relativa ( $z$ ), que é intermediário de  $x$  e  $y$  (as afinidades relativas dos genomas mais e menos relacionados, respectivamente). Esse novo modelo é descrito para os híbridos tetraplóides 2:(1:1) e (2:1):1; e pentaplóides: 2:(1:1):1 e (2:1):1:1. Nesse caso, quando  $z$  é aproximadamente igual a  $x$ , ou aproximadamente igual a  $y$ , a interpretação é semelhante ao primeiro modelo proposto (Chapman e Kimber, 1992a). Em outros casos, a aplicação do segundo modelo pode revelar relações mais sutis entre os genomas em um híbrido. Nesse modelo, os dois braços cromossômicos não são distinguíveis. Além dessa desvantagem, segundo Sybenga (1994), esta proposta assemelha-se ao modelo de Driscoll et al. (1979), que contém pressuposições estatísticas controvertidas.

No modelo de Sybenga proposto em 1994, foram utilizados dados das freqüências de pareamento na diacinese e metáfase I de híbridos tetraplóides entre *Solanum esculentum* L. (sinônima *Lycopersicon esculentum* Mill.) e *Solanum peruvianum* L. (sinônima *L. peruvianum* (L.) Mill.). O modelo considera que existe um máximo de um sítio de recombinação nos pares de cromossomos, não necessariamente coincidindo com o centrômero e que em qualquer lado os quiasmas podem ou não ser formados. Existem  $n$  grupos de quatro cromossomos e cada grupo consiste de dois pares. Os pares de cromossomos são homólogos e entre os pares,

a afinidade de pareamento deve ser menor do que entre os homólogos, equivalente ao modelo 2:2 de Alonso e Kimber (1981). Os pares não podem ser diferenciados morfologicamente, mas para o propósito do modelo, os cromossomos são distinguidos como 1 e 2 para um par e 3 e 4 para outro, em que os braços cromossômicos são denominados A e B. Assim, os quatro cromossomos são denominados: A1-B1, A2-B2, A3-B3 e A4-B4, sendo A1-B1 e A2-B2 homólogos, assim como A3-B3 e A4-B4. As combinações cromossômicas A1-B1 com A3-B3 ou A4-B4 e as combinações A2-B2 com A3-B3 ou A4-B4 são bivalentes homeólogos. Considerando que os dois braços selecionam os pares independentemente, cada braço pode parear com um cromossomo diferente, resultando em um quadrivalente. Pela maior afinidade, as combinações homólogas ocorrem em maior freqüência do que as homeólogas e essa diferença é expressa como fator de pareamento preferencial ( $p$ ), como no modelo de Sybenga (1988) para os híbridos triplopoides.

Com quatro cromossomos, existem, de acordo com Sybenga (1994), três possíveis combinações para cada braço: se 1 pareia com 2, então o terceiro (se parear) deverá ser com 4; se 1 pareia com 3, então 2 deve parear com 4; se 1 pareia com 4, então 2 deve parear com 3, ou seja, das três possibilidades, uma é homóloga e duas, homeólogas. As combinações homólogas têm uma probabilidade de  $(1/3+p)$  para cada braço e as duas combinações homeólogas têm, cada uma, probabilidades de  $(1/3-p/2)$ . Para ambos os braços, portanto, a freqüência total de pareamento homólogo é  $(1/3+p)(1/3+p)$ . As nove combinações resultantes foram apresentadas por Sybenga (1994). A freqüência de pareamento em quadrivalentes ( $f$ ) é igual a  $(2/3-3p^2/2)$  e a freqüência de pareamento em bivalentes ( $1-f$ ) é igual a  $(1/3-3p^2/2)$ . Assim,  $p$  e  $f$  têm uma relação constante:  $p=1/3(4-6f)$ .

Sybenga (1994) também propôs a estimativa da probabilidade média para formação de quiasmas pela análise de diacineses e metáfases I, considerando  $a$  para o braço A e  $b$  para o braço B e a probabilidade média de não associação como  $(1-a)$  para o braço A e  $(1-b)$  para o braço B. Estas definições são importantes para distinguir a formação de quiasmas após o pareamento em quadrivalentes e em bivalentes.

## Considerações sobre o uso de modelos matemáticos na análise genômica

Na revisão feita por Seberg e Petersen (1998), várias críticas foram feitas à aplicação dos modelos matemáticos, principalmente quando os resultados são extrapolados para definições de relações evolutivas. Ao assumir as pressuposições clássicas da análise genômica, os modelos tendem a dar uma idéia simplificada do processo meiótico. Os autores citaram, por exemplo, o fato dos modelos assumirem que todos os grupos homeólogos apresentam comportamentos idênticos, negligenciarem as translocações e assumirem a relação direta de ocorrência entre pareamento e quiasmas.

Fernández-Calvin et al. (1995) corroboraram com essa idéia ao afirmar que não existem evidências diretas demonstrando que a afinidade genômica estimada pelos modelos matemáticos é equivalente às similaridades genômicas reais. Os autores ainda enfatizam que os modelos não devem ser usados indiscriminadamente, pois apresentam premissas muito restritivas que podem levar a conclusões errôneas. Por exemplo, a presença de translocação entre cromossomos de um ou alguns grupos homeólogos produz uma considerável distorção na predição do modelo e, obviamente, os valores da afinidade relativa não serão corretos.

Em contraposição, Sybenga (1995) menciona a existência de modelos que possibilitam a detecção de multivalentes oriundos de translocações, tal como aquele proposto por ele em 1988 para híbridos triplopoides. A recomendação nesse sentido é analisar a distribuição da freqüência de multivalentes por célula (Sybenga, 1975, 1988 e 1992). Se um conjunto específico de três cromossomos por célula ocorrer permanentemente, suspeita-se da presença de translocação. Com uma distribuição binomial e uma baixa tendência de formar um trivalente, existe uma probabilidade que não ocorra nenhuma célula com mais de um trivalente, mesmo no caso onde cada conjunto de três cromossomos potencialmente poderia ser capaz de formar trivalentes.

Ainda em relação às translocações, os autores dos modelos para cálculo da afinidade genômica argumentam que elas não têm importância intrínseca no comportamento total do pareamento e, por serem eventos

raros, podem ser negligenciadas, mas ressaltam que se existir mais de uma translocação, o cálculo do relacionamento entre os genomas é menos confiável.

Outro aspecto criticado por Seberg e Petersen (1998) foi a aceitação integral do axioma proposto por Dewey (1982) de que “durante a meiose cromossomos homólogos pareiam e não-homólogos não pareiam”. Essa crítica é sustentada observando-se o comportamento de espécies de *Hordeum*, em que genomas reconhecidamente homólogos, quando reunidos em híbridos podem não exibir pareamento, devido a interações de produtos gênicos e supressões. Assim, recomenda-se que é preciso ter cautela ao inferir similaridades em nível molecular a partir exclusivamente de observações do comportamento cromossômico.

### Análise genômica em *Pennisetum* sp.

Considerando a família Poaceae, o gênero *Triticum* constitui o exemplo clássico da importância da análise genômica na reconstrução da história evolutiva das espécies e é amplamente discutido na literatura. Entretanto, os estudos para definição de relacionamentos genômicos a partir de avaliações da meiose estenderam-se para outros gêneros de gramíneas, tais como: *Lolium* (King et al., 1999), *Dasypyrum* (Ohta e Morishita, 2001) e *Pennisetum* (Jauhar, 1968 e 1981; Techio et al., 2005).

A relação entre genomas de *Pennisetum* foi estudada em híbridos entre o milheto (*P. glaucum* –  $2n=2x=14$ , genoma AA) e o capim-elefante (*P. purpureum* –  $2n=4x=28$ , genomas A'A'BB). Krishnaswamy e Raman (1954), Pantulu (1967) e Jauhar (1968 e 1981) relataram que os genomas A e A' são homólogos/homeólogos, resultando na formação de 7 bivalentes e os cromossomos do genoma B permaneceram como 7 univalentes nas diacineses e metáfases I dos híbridos triplóides ( $2n=3x=21$ , genoma AA'B). Jauhar (1968) identificou os bivalentes distintamente heteromórficos A e A' como pareamento alossindético e aqueles envolvendo os três genomas (A, A' e B), com maior predominância entre os cromossomos do genoma A, como pareamento autossindético. Para este último autor, a formação de bivalentes intragenômicos indica

que ocorreu duplicação dos cromossomos do milheto. A outra evidência em favor da afinidade intragenômica surge da tendência de 4 bivalentes no milheto exibirem associação secundária na diacinese e metáfase I. A partir dessas observações, Jauhar (1968) argumentou que o milheto não parece ser um “diplóide verdadeiro”, mas sim um “diplóide secundário”, cujo número básico de cromossomos igual a 7 derivou do número básico original ou primário igual a 5.

A tendência de pareamentos inter e intragenomas parece ter um ponto de apoio no número básico de cromossomos. É provável que o genoma A do milheto e A' do capim-elefante tenham se originado de um genitor comum ou de espécies relacionadas com  $x=5$ . O fato das duas espécies cruzarem facilmente confirma que são relacionadas filogeneticamente. O genoma B, contudo, pode ter se originado de uma espécie diferente, mas que também apresentava  $x=5$ . Em *Pennisetum*, a espécie *P. ramosum* (Hochst.) Schweinf. & Asch. apresenta  $x=5$  cromossomos, o que contribui para sustentar essa hipótese (Jauhar, 1968 e 1981).

As observações de Sethi et al. (1970) e Sree Ramulu (1971) não confirmaram a ocorrência de pareamento intragenômico. Pantulu (1967), como já mencionado, conseguiu diferenciar, no paquíteno, os cromossomos com *knobs* oriundos do capim-elefante dos cromossomos sem *knobs* do milheto e concluiu que o pareamento ocorreu entre os cromossomos do milheto e seus homólogos/homeólogos do genoma A' do capim-elefante. A quantificação da afinidade relativa dos genomas A, A' e B do milheto e capim-elefante, reunidos em híbridos interespecíficos, foi realizada por Techio et al. (2005), empregando o modelo proposto por Alonso e Kimber (1981) e revisado por Chapman e Kimber (1992a). Os dados permitiram confirmar a classificação dos híbridos como tipo 2:1, pois a afinidade relativa ( $x$ ) foi superior a 0,8 e o número de trivalentes não excedeu ao de bivalentes em anel.

Ao aplicar o princípio da relação simétrica dos genomas proposto por Alonso e Kimber (1981), Techio et al. (2005) observaram que a diferença estrutural e genética entre os genomas A e A' dos acessos avaliados é pequena, enquanto que entre estes e o genoma B é maior, pois a afinidade relativa média ( $x$ ) foi 0,978 e  $y=$

0,022, confirmando numericamente a maior correspondência dos genomas A e A' mencionada. Essa conclusão baseia-se no pressuposto do modelo que prevê que se a afinidade relativa dos dois genomas mais relacionados é tão alta que não se formam quiasmas entre os genomas A e B, o valor de  $x$  é 1 e  $y$  é zero. Os valores obtidos para  $y$  sugerem, segundo Techio et al. (2005), que existe homeologia, mesmo que em um grau reduzido, entre os genomas A e A' com o B. Essa proposição encontra sustentação na origem híbrida do capim-elefante que reuniu os genomas A' e B. É provável que as espécies parentais doadoras desses dois genomas apresentassem alguma homologia cromossômica para permitir a formação de um híbrido estável e viável como é o capim-elefante.

O emprego desse modelo demonstrou quantitativamente a similaridade genética nas três diferentes combinações híbridas envolvendo acessos de milheto e capim-elefante. Estes dados associados às informações de fertilidade, irregularidades e estabilidade meiótica (Techio et al., 2006) fornecem subsídios úteis quando o objetivo é a transferência de alelos. Para inferências evolutivas, recomenda-se a avaliação de um maior número de espécies e a conciliação destes resultados com estudos de genética, bandeamento cromossômico e citogenética molecular.

## Considerações finais

Os diferentes gêneros botânicos para os quais foram realizadas as análises genômicas com emprego de modelos matemáticos confirmam a viabilidade de se utilizar esse procedimento na determinação do grau de relacionamento genético entre espécies com a finalidade de indicar os melhores cruzamentos. Para conclusões evolutivas a respeito de um grupo de espécies, recomenda-se cautela e abordagens multidisciplinares, as quais fornecerão informações completas e integradas sobre o processo.

## Referências

Alonso, L. C.; Kimber, G. 1981. The analysis of meiosis in hybrids. II. Triploid hybrids. **Canadian Journal of Genetics Cytology**, **23** (2): 221-234.

- Aung, T.; Walton, P. D. 1990. Morphology and cytology of the reciprocal hybrids between *Elymus trachycaulus* and *Elymus canadensis*. **Genome**, **33**: 123-120.
- Bennett, M. B. 1995. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant cytogenetics. In: Brandom, P. E.; Bennett, M. (eds.) **Kew chromosome conference**, IV. Royal Botanic Garden, Kew, UK, p.167-183.
- Bothmer, R. Von; Flink, N.; Landstrom, T. 1989. Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. VI. Hexaploid hybrids. **Evolution Trends Plants**, **3** (1): 53-58.
- Brasileiro-Vidal, A. C.; Cuadrado, A.; Brammer, S.P.; Benko-Issepón, A. M.; Guerra, M. 2005. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*. **Genetics and Molecular Biology**, **28** (2): 308-313.
- Chapman, C. G. D.; Kimber, G. 1992a. Developments in the meiotic analysis of hybrids. I. Review of theory and optimization in triploids. **Heredity**, **68**: 97-103.
- Chapman, C. G. D.; Kimber, G. 1992b. Developments in the meiotic analysis of hybrids. V. Second-order models for tetraploids and pentaploids. **Heredity**, **68**: 205-210.
- Crane, C. F. 1996. Numerical meiotic models for the inference of genomic affinity in polyploids. In: Jauhar, P. P. (ed.). **Methods of genome analysis in plants**. CRC Press, Boca Raton, USA, p.61-79.
- Crane, C. F.; Sleper, D. A. 1989. A model of meiotic chromosome association in triploids. **Genome**, **32** (1): 82-98.
- Dewey, D. R. 1982. Genomic and phylogenetic relationships among North American perennial Triticeae. In: Estes, J. R.; Tyrl, R. J. & Brunken, J. N. (eds.). **Grasses and grasslands**. University of Oklahoma Press, Oklahoma, USA, p.51-81.
- Driscoll, C. J.; Bielig, L. M.; Darvey, N. L. 1979. An analysis of frequencies of chromosome configurations in wheat and wheat hybrids. **Genetics**, **91** (4): 755-767.
- Driscoll, C. J.; Gordon, G. H.; Kimber, G. 1980. Mathematics of chromosome pairing. **Genetics**, **95** (1): 159-169.
- Fernández-Calvín, B.; Orellana, J.; Pignone, D. 1995. Genome analysis of triploids using mathematical models. I. Effects of translocations not detected by conventional staining techniques. **Hereditas**, **122**: 41-45.
- Gill, B.; Sears, R. G. 1988. The current status of chromosome analysis in wheat. In: Gustafson, P. & Appels, R. (eds.). **Chromosome structure and function: impacts of new concepts**. Plenum Press, New York, USA, p.305-308.
- Gupta, P. K. 1991. Cytogenetics of wheat and its close wild relatives – *Triticum* and *Aegilops*. In: Gupta, P. K. & Tsuchiya, T. (eds.). **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding and evolution**. v.2A. Elsevier, Amsterdam, Holanda, p.243-262.
- Han, F.; Liu, B.; Fedak, G.; Liu, Z. 2004. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat- *Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis. **Theoretical Applied Genetics**, **109**: 1070-1076.
- Jackson, R. C. 1991. Cytogenetics of polyploids and their diploid progenitors. In: Gupta, P. K. & Tsuchiya, T. (eds.). **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding and evolution**. v. 2A. Elsevier, Amsterdam, Holanda, p.159-180.

- Jackson, R. C.; Casey, J. 1982. Cytogenetic analyses of autopolyploids: models and methods for triploids to octoploids. *American Journal of Botany*, **69** (4): 487-501.
- Jackson, R. C.; Hauber, D. P. 1982. Autotriploid and autotetraploid analyses: correction coefficients for proposed binomial models. *American Journal of Botany*, **69** (4): 644-646.
- Jauhar, P. P. 1968. Inter- and intra-genominal chromosome pairing in a inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. *Genetica*, **39** (3/4): 360-370.
- Jauhar, P. P. 1981. Cytogenetics of pearl millet. *Advances in Agronomy*, **34**: 407-479.
- Jauhar, P. P.; Crane, C. F. 1989. An evaluation of Baum et al.'s assessment to the genomic system of classification in the Triticeae. *American Journal of Botany*, **76** (4): 571-576.
- Kihara, H. 1930. Genome analysis of *Triticum* and *Aegilops*. *Cytologia*, **1**: 263-284.
- Kihara, H. 1982. Genome analysis I. In: Kihara, H. (ed.). *Wheat studies – retrospect and prospects*. Kodansha/Elsevier, Tokyo/Amsterdam/Oxford/New York, Japão, Holanda, USA, p.69- 87.
- Kimber, G.; Alonso, L. C.; Sallee, P. J. 1981. The analysis of meiosis in hybrids. I. Aneuploid hybrids. *Canadian Journal of Genetics Cytology*, **23** (2): 209-219.
- Kimber, G.; Yen, Y. 1990. The genomic analysis of diploid plants. *Proceedings of the National Academy Science of the United States*, **87** (8): 3205-3209.
- King, I. P.; Morgan, W. G.; Harper, J. A.; Thomas, H. M. 1999. Introgression mapping in the grasses. II. Mitotic analysis of the *Lolium perenne/Festuca pratensis* triploid hybrid. *Heredity*, **82**: 107-112.
- Krishnaswamy, N.; Raman, V. S. 1954. Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. x *P. purpureum* Schumach. III. The cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. *Genetica*, **27** (1/2): 253-272.
- Leflon, M.; Eber, F.; Letanneur, J. C.; Chelysheva, L.; Coriton, O.; Huteau, V.; Ryder, C. D.; Barker, G.; Jenczewski, E.; Chèvre, A. M. 2006. Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) x *Brassica napus* (AACC) hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, **113**: 1467-1480.
- Menzel, M. Y.; Martin, D. W. 1970. Genome affinities of four African diploid species of *Hibiscus* sect. *Furcaria*. *The Journal of Heredity*, **61**: 179- 184.
- Ohta, S.; Morishita, M. 2001. Genome relationship in the genus *Dasypyrum* (Gramineae). *Hereditas*, **15**: 101-110.
- Riley, R. 1966. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. *Nature*, **185** (4715): 751-752.
- Pantulu, J. V. 1967. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. *Cytologia*, **32** (3/4): 532-541.
- Salomon, B. 1993. Interspecific hybridization in the *Elymus semi-costatus* group (Poaceae). *Genome*, **36**: 899-905.
- Seberg, O.; Petersen, G. 1998. A critical review of concepts and methods used in classical genome analysis. *The Botanical Review*, **64** (4): 372-417.
- Sethi, G. S.; Kalia, H. R.; Ghai, B. S. 1970. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. *Cytologia*, **35** (1): 96-101.
- Singh, R. J. 1993. *Plant cytogenetics*. CRC Press, Boca Raton, USA, 391pp.
- Sree Ramulu, K. 1971. Cytomorphology of the progeny of a raw allopolyploid in *Pennisetum*. *Cytologia*, **36** (6): 652-668.
- Sybenga, J. 1975. *Meiotic configurations*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, USA, 251pp.
- Sybenga, J. 1988. Mathematical models for estimating preferential pairing and recombination in triploid hybrids. *Genome*, **30** (5): 745-757.
- Sybenga, J. 1992. *Cytogenetics in plant breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Alemanha/USA, 469pp.
- Sybenga, J. 1994. Preferential pairing estimates from multivalent frequencies in tetraploids. *Genome*, **37** (6): 1045-1055.
- Sybenga, J. 1995. Mathematical meiotic models for genome analysis: detection of translocations. *Hereditas*, **123**: 197-198.
- Techio, V. H.; Davide, L. C.; Pereira, A. V. 2005. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* x *P. glaucum* hybrids. *Caryologia*, **58** (1): 28-33.
- Techio, V. H.; Davide, L. C.; Pereira, A. V. 2006. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology*, **29** (2): 353-362.
- Zhang, H.; Yang, R.; Dou, Q.; Tsujimoto, H.; Zhou, Y. 2006. Genome constitutions of *Hystrix patula*, *H. duthiei* ssp. *duthiei* and *H. duthiei* ssp. *longearistata* (Poaceae: Triticeae) revealed by meiotic pairing behavior and genomic *in-situ* hybridization. *Chromosome research*, **14**: 595-604.