



GABRIELA BARRETO DOS REIS

**MECANISMOS DA ELIMINAÇÃO
CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS DE
Pennisetum purpureum e *P. glaucum* e RELAÇÕES
GENÔMICAS EM *Pennisetum* spp.**

**LAVRAS – MG
2016**

GABRIELA BARRETO DOS REIS

**MECANISMOS DA ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS
DE *Pennisetum purpureum* e *P. glaucum* e RELAÇÕES GENÔMICAS
EM *Pennisetum* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide
Orientadora

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Reis, Gabriela Barreto dos.

Mecanismos da eliminação cromossômica em híbridos de
Pennisetum purpureum e *P. Glaucum* e Relações genômicas em
Pennisetum spp. / Gabriela Barreto dos Reis. – Lavras : UFLA, 2016.
96 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Eliminação cromossômica. 2. Capim-elefante. 3. Milheto. 4.
Híbridos sintéticos. 5. Genoma B. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

GABRIELA BARRETO DOS REIS

**MECANISMOS DA ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS
DE *Pennisetum purpureum* E *P. glaucum* e RELAÇÕES GENÔMICAS EM
Pennisetum spp.**

MECHANISMS OF CHROMOSOME ELIMINATION IN HYBRIDS OF
Pennisetum purpureum AND *P. glaucum* AND GENOMIC RELATIONS IN
Pennisetum spp.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 25 de agosto de 2016.

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres
Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Dra. Ana Luisa Souza Azevedo
Prof. Dr. Lyderson Facio Vicini

UFLA
UFLA
EMBRAPA
UFJF

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide
Orientadora

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2016**

A Deus, que ilumina meus caminhos.
OFEREÇO

*Aos meus pais Adriana e Dehon, meus irmãos Ana Cláudia e Renan pelo amor e
apoio incondicional.*

Ao meu sobrinho Ulisses, que ilumina meus dias.

Ao Junior, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por estar sempre presente em todas as etapas superadas e concretizadas de minha vida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do doutorado e estrutura concedida para realização desse trabalho.

À Professora Dra. Lisete Chamma Davide, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e pela confiança em mim depositada, além dos conhecimentos transmitidos para meu crescimento pessoal e profissional.

À Embrapa Gado de Leite, por ceder os materiais utilizados neste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em especial as professoras Vânia e Giovana, pelos ensinamentos e contribuições.

À Professora Dra. Larissa Fonseca Andrade-Vieira pela amizade, disponibilidade, orientação, carinho e por ser uma grande incentivadora durante todo esse tempo.

À minha querida amiga Cris, pela amizade sincera, por dividir comigo momentos bons e ruins e que esteve sempre presente apesar da distância.

Às amigas Graciele, Gisele, Ludmila e Thaís, pela amizade, companheirismo, risadas e conhecimentos compartilhados.

À Isa, pela amizade, carinho e pela contribuição na execução deste trabalho.

À Laiane, pela ajuda e por ter sido uma grande companhia durante uma etapa muito importante da minha vida.

À todos os amigos do laboratório de citogenética pela amizade e pelos ótimos momentos compartilhados. À Iara e Felipe, técnicos do laboratório, pela amizade e por tornar nosso trabalho possível.

Ao Andreas e Ishii por toda confiança, ajuda e conhecimento transmitidos durante minha passagem pelo IPK, à Katrin e Oda, anjos que cruzaram meu caminho, e a todos os amigos do grupo Chromosome Structure and Function (CSF) que tanto me ajudaram durante o doutorado sanduíche. Serei eternamente grata!

Aos amigos queridos que fiz na Alemanha, Ana, Ricardo, Cecília, Keila, Mariana, pelo carinho, atenção e por tornarem meus dias mais leves e divertidos. Espero um dia revê-los.

Ao Professor Dr. Lyderson e à Pesquisadora Ana Luisa pela disponibilidade em participar da banca e pelas contribuições.

Aos meus pais, Adriana e Dehon pela educação, amor e apoio. Aos meus irmãos mais que queridos, Ana Cláudia e Renan, pela amizade, carinho, força e incentivo. Amo muito vocês e agradeço de todo coração por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu noivo Junior, pelo amor, carinho, companhia e por sempre apoiar meus sonhos e ficar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus avós por todo amor dedicado a mim. Em especial à Vó Lúcia por toda preocupação, carinho e orações.

Aos meus familiares, tios, tias, primos pela torcida e carinho de sempre.

Aos amigos de Natércia pela amizade sincera, apoio e carinho.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) é uma espécie alopoliploide com genomas A'A'BB e $2n=4x=28$ cromossomos, enquanto o milheto (*Pennisetum glaucum* L. (R.) Br.) é uma espécie diploide, com genoma AA e $2n=2x=14$ cromossomos. Em função da proximidade destas espécies a hibridação interespecífica é utilizada como uma das alternativas em programas de melhoramento genético do capim-elefante. O híbrido interespecífico é triploide, estéril, com genomas AA'B e $2n=3x=21$. A fim de restaurar a fertilidade deste híbrido triploide e viabilizar seu uso nos programas de melhoramento, faz-se necessário a duplicação dos cromossomos produzindo plantas hexaploides ($2n=6x=42$ cromossomos, AAA'A'BB). Ganhos com relação ao tamanho e viabilidade das sementes já foram observados nesses híbridos. No entanto, a mixoploidia, decorrente da eliminação cromossômica, tem sido observada com frequência nesses híbridos poliploidizados, sendo que, são encontradas plantas que tendem a eliminar mais e outras que eliminam menos cromossomos. Até o momento, os trabalhos realizados com os híbridos duplicados mostraram que há irregularidades tanto nas células somáticas quanto germinativas e que a eliminação cromossômica está relacionada à indução de poliploidização e é biparental, enquanto os híbridos triploides apresentam número cromossômico somático estável. No entanto, não se sabe, até o momento, quais as prováveis causas que levam à eliminação. Outro aspecto desconhecido no que diz respeito ao capim-elefante é a origem do genoma B. Trabalhos anteriores mostraram que há um alto grau de homologia entre os genomas A de milheto e A' de capim-elefante e, em menor proporção, entre esses e o genoma B. No entanto, o doador do genoma B ainda é desconhecido. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar os mecanismos citogenéticos envolvidos na eliminação cromossômica em híbridos hexaploides parciais sintéticos e identificar espécies que apresentem genoma homólogo ou homeólogo ao B de capim-elefante. Foi observado que a disfunção dos centrômeros é uma das causas da eliminação, além de quebras de DNA não reparadas que resultam em fragmentos cromossômicos nos híbridos sintéticos. Além disso, foi encontrado que *P. glaucum*, *P. violaceum* e *P. schweinfurthii* apresentam genomas com alto nível de homologia/similaridade, possivelmente compartilhando o mesmo genoma A, enquanto *P. purpureum* e *P. flacidum* compartilham o genoma B, e em um nível menor em *P. vilosum* e em *P. orientale* está presente o genoma A' de *P. purpureum*.

Palavras-chave: Eliminação cromossômica. Capim-elefante. Milheto. Híbridos sintéticos. Genoma B.

ABSTRACT

Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) is a specie with allopolyploid A'A'BB genomes and $2n = 4x = 28$ chromosomes, while pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. (R.) Br.) is a diploid specie with genome AA and $2n = 2x = 14$ chromosomes. Interspecific hybridization is used as an alternative in the breeding program of Napier due the proximity between these species. The interspecific hybrid is triploid, sterile, with AA'B genomes and $2n = 3x = 21$ chromosomes. In order to restore the fertility of the triploid hybrid and facilitate the use of genetic combination of Napier grass and pearl millet in breeding programs, duplication of chromosomes is necessary producing hexaploid plants with $2n = 6x = 42$ chromosomes and genomes AAA'A'BB. The population of hexaploid individuals has been subjected to cycles of selection and gains on the size and viability of the seeds have already been observed. However, mixoploidy resulting from chromosomal elimination has been observed frequently in poliploidy hybrids. To date, works with duplicated hybrids have showed that there are irregularities in both somatic and germinative cells and chromosomal elimination is related to the induction of polyploidy and is biparental. While the triploid hybrids have stable somatic chromosome number, hexaploide hybrids exhibited variation in chromosome number, with plants that tend to eliminate more chromosomes than others. However, is still unknown which causes leading to elimination. Another aspect unknown with respect to the Napier grass is the origin of the genome B. Previous studies have shown that there is a high degree of homology between A genome of pearl millet and A' genome of Napier grass and, in a less proportion, between these and the B genome. Nevertheless, the donor of B genome is still unkown. So, the aim of this work was to evaluate the cytogenetic mechanisms involved in chromosome elimination in partial synthetic hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet and to identify species that present homologous/homeologous genomes to B genome of Napier grass. It was observed that the centromeres dysfunction is a cause of disposal and not repaired DNA breakages that result in chromosomal fragments of synthetic hybrids. In addition, it was found that *P. glaucum*, *P. violaceum* and *P. schweinfurthii* must have genomes with high homology/similarity, possibly sharing the same A genome, while *P. purpureum* and *P. flacidum* would share the B genome, and to a lesser extent in *P. vilosum* and *P. orientale* should contain the genome A' of *P. purpureum*.

Keywords: Chromosome elimination. Napier grass. Pearl millet. Synthetic hybrids. B genome.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Aspectos taxonômicos, filogenéticos e citogenéticos do gênero <i>Pennisetum</i> Rich. (Poaceae)	15
2.2	O melhoramento do capim-elefante através da hibridação interespecífica – aspectos citogenéticos	19
2.3	Eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos	23
2.3.1	Eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho	28
2.4	Relações genômicas entre espécies de <i>Pennisetum</i>	33
	REFERÊNCIAS	37
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	47
	ARTIGO1 – Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific hybrids of <i>Pennisetum purpureum</i> (Napier grass) and <i>Pennisetum glaucum</i> (pearl millet) is caused by micronucleation	47
	ARTIGO2 – Investigation of genomic affinity of <i>Pennisetum purpureum</i> and related species	78

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Pennisetum é um importante gênero da família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae e reúne cerca de 80 a 140 espécies sendo um dos mais representativos economicamente (BRUNKEN, 1977; CHEMISQUY et al., 2010; WIPFF; MARTEL et al., 2004; VELDKAMP, 1999; MARTEL et al., 2004). Amplamente distribuído por toda a faixa tropical do planeta, *Pennisetum* tem origem africana e adaptou-se facilmente aos solos brasileiros. As espécies do gênero, de cultivadas a selvagens, apresentam ampla variabilidade genética, heterogeneidade e uma grande diversidade de plantas, graças aos inúmeros arranjos taxonômicos observados (JAUHAR; HANNA, 1998). Suas espécies apresentam ainda uma multiplicidade de usos como cereal, alimentação, forragem, gramíneas para pastagem, ornamentais, biodiesel e energia.

Dentro do gênero destacam-se o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] como forrageiras de elevada importância econômica devido ao seu alto potencial de produção de forragem de boa qualidade associada à aceitabilidade e vigor (SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

O capim-elefante é um alotetraploide com $2n = 4x = 28$ cromossomos e genomas A'A'BB. Apresenta elevada produção de matéria seca, boa aceitabilidade, alto valor nutritivo e perenidade, que podem ser combinadas com a qualidade de forragem, boa resistência à seca e doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e de maior tamanho do milheto, uma espécie diploide, com genoma AA e $2n=2x=14$ cromossomos (PEREIRA et al., 2001). Desse cruzamento origina-se um híbrido

triplóide e estéril, com $2n = 3x = 21$ cromossomos e genomas AA'B (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009).

A proximidade genética existente entre estas espécies permite aos melhoristas explorar o potencial do germoplasma de ambas em combinações híbridas. O fato de o híbrido interespecífico entre o capim-elefante e o milheto reunir as características favoráveis destas espécies torna esse procedimento uma estratégia eficaz na busca por cultivares superiores, visto que a qualidade da forragem do híbrido é superior à dos parentais, além de ter melhor aceitação pelos bovinos (PEREIRA et al., 2000).

A restauração da fertilidade deste híbrido e viabilização do seu uso nos programas de melhoramento é conseguida pela duplicação dos cromossomos, produzindo plantas hexaplóides, que apresentam $2n = 6x = 42$ cromossomos e genomas AAA'A'BB. Como resultado dos protocolos de duplicação cromossômica, plantas mixoploides ($2n = 14$ a 42) são frequentemente obtidas (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009). O processo de hibridação seguido de duplicação cromossômica normalmente leva a rearranjos genômicos e, entre eles, a eliminação de sequências de DNA e de cromossomos, ocorre como consequência da reunião de genomas diferentes em um mesmo núcleo (LIU et al., 1996; GERNAND et al., 2005).

A eliminação cromossômica é um fenômeno comum em híbridos interespecíficos de gramíneas, sendo uma ferramenta muito valiosa em programas de melhoramento genético (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Muitos exemplos na literatura demonstram que a eliminação cromossômica de um genoma parental pode ser parcial ou total (GERNAND et al., 2005; PAGLIARINI; ADAMOWSKI; BATISTA, 1998; SANEI et al., 2011). A partir da eliminação parcial de cromossomos em híbridos interespecíficos podem-se obter linhas de adição (materiais contendo

cromossomos ou partes de cromossomos extras) ou linhas de substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes) (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Se o genoma completo de um dos parentais no híbrido interespecífico for eliminado há a possibilidade de obtenção de haploides, como durante o desenvolvimento inicial dos embriões de *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum*, no qual os cromossomos de *H. bulbosum* são eliminados após a polinização (SANEI et al., 2011). Já no caso dos híbridos poliploidizados de capim-elefante e milho, esse fenômeno é biparental e casual (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013; REIS et al., 2014). Segundo Ridle e Birchler (2003), a combinação de dois diferentes genomas parentais dentro de um núcleo leva a reorganizações genéticas e epigenéticas em consequência da nova constituição genômica produzida após a fertilização interespecífica, podendo levar a alterações no número e distribuição de sequências de DNA, o que pode causar conflitos intergênicos e perda de cromossomos. Dessa forma, o conhecimento dos mecanismos que levam à eliminação é de grande importância.

Além da eliminação cromossômica, a relação genômica entre *Pennisetum glaucum* e *Pennisetum purpureum* também tem despertado interesse. A relação existente entre esses genomas foi estabelecida por trabalhos que utilizaram a morfologia dos cromossomos metafásicos e ocorrência das configurações bivalentes e univalentes na meiose de seus híbridos (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003; JAUHAR, 1981; PANTULU; RAO, 1982; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, 2006) e análises de hibridização *in situ* genômica (REIS et al., 2014), mostrando que os genomas A e A' são homeólogos e entre estes e o genoma B a homologia é reduzida. Em relação ao genoma B, sua origem ainda permanece desconhecida. Como somente o capim-elefante (genomas A'B) e o milho (genoma A) têm suas composições

genômicas definidas, torna-se necessário buscar espécies no gênero que apresentem o genoma B ou algum genoma similar para então entender sua origem. Assim, a análise das relações filogenéticas dentro do gênero *Pennisetum* pode fornecer informações a respeito das espécies mais intimamente relacionadas à *P. purpureum* e *P. glaucum*, o que auxiliaria na identificação da origem do genoma B, além de possibilitar a confirmação de que os genomas A e A' descendem de um mesmo ancestral comum e sofreram modificações ao longo da evolução.

Com base no exposto, os objetivos do trabalho foram investigar o processo que leva a eliminação cromossômica e instabilidade genômica em híbridos interespecíficos hexaploides sintéticos de capim-elefante e milheto e fornecer informações para o conhecimento da origem do genoma B de capim-elefante identificando espécies do gênero *Pennisetum* que apresentem similaridade genômica a *P. purpureum*, por meio da hibridização *in situ* genômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos taxonômicos, filogenéticos e citogenéticos do gênero *Pennisetum* Rich. (Poaceae)

O gênero *Pennisetum* é um dos mais importantes da família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Paniceae, sendo intimamente relacionado aos gêneros *Cenchrus* e *Setaria* (CHEMISQUY et al., 2010; MARTEL et al., 2004). Esse gênero possui aproximadamente de 80 a 140 espécies distribuídas ao redor do mundo, em regiões tropicais e subtropicais (BRUNKEN, 1977; CHEMISQUY et al., 2010; MARTEL et al., 2004; WIPFF; VELDKAMP, 1999). A maioria das espécies do gênero constitui um conjunto heterogêneo com níveis de ploidia variando de diploide a octaploide, comportamento reprodutivo sexual ou apomítico, ciclo de vida anual ou perene e diferentes números básicos ($x = 5, 7, 8, 9$ e 17) (MARTEL et al., 1997). O número básico $x = 17$ é descrito para *P. setaceum* que também pode apresentar $x = 9$. A origem do genoma $x = 17$ pode ser resultado de um cruzamento entre os ancestrais $x = 8$ e $x = 9$ ou duplicação de $x = 9$ seguida da perda de um cromossomo, mas em ambos os casos seguida de diploidização do ancestral poliploide (CHEMISQUY et al., 2010).

O gênero é caracterizado principalmente por sua inflorescência: uma falsa espiga, com espiguetas em eixos contraídos, ou espículas fasciculadas em falsas espiguetas, sempre cercadas por invólucros. Os invólucros são aglomerados, com base livre e delgada, cerdas de glabro a plumosa. As espiguetas são sésseis ou pediceladas, descendo com os invólucros, sendo apenas persistentes nas espécies cultivadas (WATSON; DALLWITZ, 1992).

De acordo com caracteres morfológicos, as espécies do gênero são classificadas em cinco seções, sendo estas *Penicillaria*, *Brevivalvula*, *Gymnothrix*, *Heterostachya* e *Eu-Pennisetum* (STAPF; HUBBARD, 1934). A seção *Penicillaria* compreende sete espécies, sendo cinco delas classificadas como cultivares de *P. glaucum* (L.) R. Br. subsp. *glaucum* (milheto). Entre as demais, destaca-se *P. purpureum* Schumach (capim-elefante). A seção *Brevivalvula* inclui três espécies, *P. pedicellatum* Trin. *P. polystachion* (L.) Schult. e *P. hordeoides* (Lam.) Steud. A seção *Gymnothrix* inclui as espécies *P. macrourum* Trin., *P. ramosum* (Hochst.) Schweinf. e *P. hohenackeri* Steud. A seção *Heterostachya* compreende duas espécies: *P. squamulatum* Fresen. e *P. tetrastachyum* K. Schum (sinônimo de *P. schweinfurthii* Pilg.). Por fim, a seção *Eu-Pennisetum* compreende cinco espécies, das quais *P. villosum* (R. Br.) Fresen., *P. setaceum* (Forssk.) Chiov e *P. clandestinum* Chiov. são as mais comuns. Algumas seções envolvem espécies com diferentes números básicos, sendo também encontrada diversidade quanto ao tamanho dos cromossomos (JAUHAR, 1981). Brunken (1977) revisou a seção *Pennisetum* e concluiu que *Penicillaria* é um sinônimo para esta seção. Por último, Clayton e Renvoize (1986) reconheceram apenas as seções *Brevivalvula*, *Dactylophora* (sinônimo de *Gymnothrix*), *Heterostachya* e *Pennisetum*. As diferenças entre as seções são baseadas principalmente em caracteres morfológicos da inflorescência. As relações filogenéticas entre as espécies de *Pennisetum* têm sido analisadas usando ferramentas moleculares como variações no DNA cloroplastidial (CLEGG; RAWSON; THOMAS, 1984; RENNO et al., 2001), DNA mitocondrial (CHOWDHURY; SMITH, 1988), comparações entre sequências de DNA repetitivo (INGHAM et al., 1993) ou dados morfológicos, nucleares e plastidiais (CHEMISQUY et al., 2010). Relações significativas têm sido observadas entre os genomas de *P. glaucum*, *P. purpureum* e *P. squamulatum*,

sugerindo que estas três espécies possuam uma origem comum. Além disso, relações estreitas também têm sido descritas entre as espécies dentro da seção *Brevivalvula* (SCHMELZER; RENNO, 1999). Análises com isoenzimas mostraram que as relações entre as espécies do gênero *Pennisetum*, provenientes de todas as cinco seções, foram, muitas vezes, consistentes com a informação citogenética disponível (SCHMELZER, 1997).

A evolução no número básico dentro do gênero também foi avaliada por filogenia molecular usando sequências de ITS de locus de RNA ribossomal (MARTEL et al., 2004) e DNA cloroplastidial (DONADIO et al., 2009). A diversidade no tamanho e número dos cromossomos, com tamanhos maiores para números menores (JAUHAR, 1981; MARTEL et al., 1997), reflete a repadronização durante a evolução dentro do gênero (MARTEL et al., 1997). Baseado em observações do pareamento cromossômico em *Pennisetum*, Jauhar (1981) propôs uma hipótese para a evolução do gênero baseado no aumento do número cromossômico a partir de um número básico $x = 5$ cromossomos.

A mudança no tamanho e número dos cromossomos pode estar relacionada com a disploidia, processo observado em muitas plantas e que envolve modificações estruturais no cariótipo por mudanças no número básico de cromossomos durante a divergência filogenética das espécies (STEBINS, 1956). Além disso, mudanças no número básico de cromossomos durante a evolução podem ter sido produzidas por meiose irregular em híbridos com formação de multivalentes, resultando em perda ou ganho de cromossomos (JAUHAR, 1993). Entretanto, a ocorrência frequente de número básico de cromossomos $x = 9$ e o relacionamento com os gêneros *Cenchrus*, *Panicum* e *Setaria* podem contradizer o número básico ancestral $x = 5$ (MARTEL et al., 2004). Além disso, a existência de um ancestral com número básico $x = 9$ reflete a direção de evolução dos cromossomos observada em gramíneas, isto é,

redução no número (disploidia decrescente) e aumento no tamanho dos cromossomos (AVDULOV, 1931; STEBINS, 1956). Dados de Chemisquy et al. (2010) mostram que $x = 9$ é uma característica plesiomórfica e $x = 5, 7, 8, 10$ e 17 são caracteres derivados, corroborando com a hipótese apresentada por Martel et al. (2004).

A história taxonômica do gênero *Pennisetum* é intimamente relacionada com a de sua espécie mais notável, o milheto (BRUNKEN, 1977). Baseado no nível de isolamento reprodutivo do milheto com as espécies selvagens relacionadas, as espécies também foram classificadas quanto ao pool gênico ao qual pertencem (HARLAN; WET, 1971). Esta representação taxonômica é baseada não apenas no cruzamento de espécies selvagens com formas domesticadas, mas também na quantidade de fluxo gênico que ocorre entre todos os membros do pool gênico. Esta classificação inclui três pools gênicos.

O pool gênico primário inclui as espécies com $2n = 2x = 14$ cromossomos sendo composto pela espécie cultivada *P. glaucum* e seus parentes selvagens *P. glaucum* ssp. *monodii*, *P. violaceum* e *P. molissimum*. Estas formas selvagens cruzam facilmente com a forma domesticada produzindo sementes viáveis e híbridos férteis. O pool gênico secundário inclui o capim-elefante (*P. purpureum*) com $2n = 4x = 28$ cromossomos e *P. squamulatum* ($2n = 8x = 56$). Estas duas espécies cruzam-se facilmente com o milheto, no entanto, os híbridos formados são estéreis. O conjunto gênico terciário compreende as demais espécies do gênero. Fortes barreiras reprodutivas impedem o fluxo gênico e a ocorrência de híbridos entre os membros do pool gênico terciário e os componentes dos pools gênicos primário e secundário (MARTEL et al., 1997; MARTEL et al., 2004).

Dentro do pool gênico terciário, *P. ramosum* e *P. mezianum* apresentam número básico $x = 5$ e $x = 8$, respectivamente. O conteúdo de DNA por genoma

monoploide de *P. ramosum* é $C = 2,02$ pg e de *P. megianum* é $C = 0,75$ pg, o que representa o menor genoma haploide encontrado no gênero *Pennisetum* (MARTEL et al., 1997). Estas espécies são intimamente relacionadas e evoluíram de um ancestral com número básico $x = 9$ (MARTEL et al., 2004).

P. schweinfuthii é uma espécie com hábito de crescimento anual, diploide com $x = 7$, também pertencente ao pool gênico terciário. Um pequeno número de híbridos artificiais foi obtido entre *P. schweinfurthii* e *P. glaucum*, mas estes são completamente estéreis (HANNA; DUJARDIN, 1986; MARCHAIS; TOSTAIN, 1997).

P. orientale, outra espécie do pool gênico terciário, é frequentemente encontrada como tetraploide com $2n = 4x = 36$ cromossomos e número básico $x = 9$, mas também é descrita a ocorrência de raças cromossômicas ou citótipos com $2x = 18, 27, 36, 45$ e 54 cromossomos (HANNA et al., 1984). A morfologia dos cromossomos indica que o conjunto tem dois grupos principais que diferem quanto a morfologia e comprimento dos cromossomos, sugerindo uma natureza alopoliploide para a espécie com uma estrutura genômica do tipo AABB (HAROUN, 2010).

P. polystachion é uma espécie hexaploide ($2n = 6x = 54$), com número básico $x = 9$, pool gênico terciário. O cariótipo da espécie encontra-se dividido em dois grupos principais, no qual 18 cromossomos do conjunto mostram grande similaridade em comprimento e morfologia, enquanto o restante do complemento (36 cromossomos) compartilha a mesma morfologia (HAROUN; RICHARDS; MACLEOD, 1992).

2.2 O melhoramento do capim-elefante através da hibridação interespecífica – aspectos citogenéticos

As forrageiras têm um importante papel na agropecuária brasileira, sobretudo para a pecuária leiteira, que representa um forte setor da economia, sendo utilizadas como fonte nutritiva para o gado. Nesse sentido, vários esforços têm sido empreendidos buscando aumentar a produtividade nos diversos sistemas de produção e uma das estratégias usadas para alcançar essa meta é o desenvolvimento de variedades de forrageiras com alta produção de massa e valor nutritivo (PEREIRA et al., 2001, 2003).

O Programa de Melhoramento Genético do Capim-elefante da Embrapa Gado Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, tem explorado a produção de híbridos entre capim-elefante e milho. Tal estratégia visa melhorar a qualidade forrageira do capim-elefante reunindo no híbrido as características desejáveis de ambas as espécies: potencial produtivo, palatabilidade, vigor e perenidade do capim-elefante com resistência à seca e as doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e maiores e elevado rendimento de matéria seca do milho (PEREIRA et al., 2001; SCHANK et al., 1993; SOUZA-SOBRINHO et al., 2005). A proximidade genética destas duas espécies é observada pela ocorrência de hibridação natural (HANNA, 1987).

O capim-elefante é tetraploide, com o número somático de cromossomos $2n = 4x = 28$, conteúdo de DNA $2C = 4,59$ pg e $1,15$ pg/DNA por genoma monoploide (MARTEL et al., 1997) e formação de 14 bivalentes nas diacineses e metáfases I, confirmando que apesar de ser tetraploide, se comporta tipicamente como um diploide (JAUHAR, 1981; JAUHAR; HANNA, 1998; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). Os genomas do capim-elefante são denominados A'A'BB, sendo que o genoma A' apresenta grande homologia com o genoma A do milho e entre estes e o genoma B a homologia é reduzida. A origem do genoma B ainda é desconhecida (JAUHAR, 1981). A espécie é amplamente cultivada por todo o Brasil, no entanto, a expansão da área cultivada

é limitada pelo custo do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixo vigor, minúsculas e deiscentes (PEREIRA et al., 2001, 2003). A obtenção de cultivares que possam ser propagadas por sementes agregando características como maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade nutricional, tolerância a solos de baixa fertilidade, distribuição mais equitativa da produção de matéria seca durante o ano e resistência às cigarrinhas das pastagens tem sido considerado o principal objetivo do melhoramento dessa forrageira (PEREIRA et al., 2003). Para tal, uma das estratégias de melhoramento do capim-elefante tem sido a hibridação interespecífica com o milheto seguido de poliploidização artificial (HANNA, 1999; JAUHAR, 1981; JAUHAR; HANNA, 1998; PEREIRA et al., 2001; SCHANK et al., 1993).

O milheto apresenta 7 bivalentes regularmente distribuídos nas diacineses e metáfases I, confirmando uma condição diplóide de número somático de cromossomos $2n = 2x = 14$ e genoma AA (JAUHAR; HANNA, 1998; POWEL; HANNA; BURTON, 1975; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). Trata-se de uma espécie anual, alógama, que apresenta boa resistência à seca e a doenças, tolerante a baixos níveis de fertilidade do solo, tem boa produção de sementes não deiscentes e proporciona elevado rendimento de matéria seca (PEREIRA et al., 2001). No melhoramento do milheto, tem-se procurado por materiais resistentes a doenças, com macho esterilidade e melhores características forrageiras (JAUHAR; HANNA, 1998). O milheto, além de apresentar sementes grandes e sem aristas, mostrou-se a melhor combinação com o capim-elefante para a utilização como forrageira (JAUHAR; HANNA, 1998).

A obtenção de híbridos interespecíficos visa reunir alguns fenótipos favoráveis do milheto, tais como qualidade da forragem, produção de sementes

não deiscentes e tolerância à seca, com a agressividade, perenidade e elevada produção de matéria seca do capim-elefante (DIZ, 1994). As plantas híbridas apresentam melhor aceitação pelos bovinos (JAUHAR, 1981) e, morfológicamente, se assemelham ao capim-elefante, provavelmente, devido à sua maior contribuição na constituição do genoma ou por uma maior expressão do genoma B do capim-elefante em relação ao genoma A do milheto para caracteres como precocidade, características de folha e inflorescência e tamanho de semente (GONZALEZ; HANNA, 1984).

O híbrido interespecífico triploide resultante do cruzamento apresenta genomas AA'B, com $2n = 3x = 21$ cromossomos, dos quais sete são oriundos do milheto e quatorze do capim-elefante. Devido à condição triploide, esses híbridos são estéreis, o que limita o seu emprego nos programas de melhoramento, visto que, os produtores preferem forrageiras cultivadas por meio de sementes (PEREIRA et al., 2000). Apesar disto, os híbridos de capim-elefante e milheto apresentam grande potencial para o incremento da qualidade da forragem destinada à alimentação animal (SCHANK et al., 1993).

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico pelo uso de agentes antimitóticos (BARBOSA et al., 2007; HANNA; DUJARDIN, 1986; HANNA et al., 1984), podendo resultar na produção de um hexaploide fértil, com $2n = 6x = 42$ cromossomos, genomas AAA'A'BB e que apresenta grande potencial de utilização, uma vez que podem ser propagados por meio de sementes com maior facilidade que o capim-elefante (SCHANK et al., 1993).

Nos híbridos de capim-elefante e milheto submetidos à duplicação cromossômica, a eliminação de cromossomos foi um resultado recorrente, sendo observada grande variação no número cromossômico (CAMPOS et al., 2009). O fenômeno da mixoploidia também foi observado em combinações genômicas ou

raças cromossômicas obtidas por retrocruzamentos entre o híbrido hexaploide com o parental capim-elefante produzindo híbridos pentaploides ($2n = 5x = 35$, genomas AA'A'BB) e entre o híbrido hexaploide e o parental milheto produzindo combinações tetraploides ($2n = 4x = 28$, genomas AAA'B) (LEÃO et al., 2011). Nas combinações pentaploides, o efeito da introgressão de características favoráveis do milheto para o capim-elefante é evidenciado pelo melhor desempenho destes genótipos para características agrônômicas. Isso mostra que estas combinações genômicas apresentam potencial forrageiro para serem usadas em programas de melhoramento (LEÃO et al., 2012).

2.3 Eliminação cromossômica em híbridos inerespecíficos

O fenômeno da poliploidia é reconhecido como a maior força evolutiva em vegetais (ADAMS; WENDEL, 2005) e vários trabalhos têm relatado as consequências de eventos de hibridação e poliploidização (LEITCH; BENNETT, 2004). Ridle e Birchler (2003) relatam que a nova constituição genômica produzida após a fertilização interespecífica leva a reorganizações genéticas e epigenéticas em consequência da combinação de dois diferentes genomas parentais dentro de um núcleo, podendo levar a alterações no número e distribuição de sequências de DNA, o que pode causar conflitos intergênicos e perda de cromossomos.

Entre as alterações observadas após a hibridação estão: a eliminação de sequências de DNA (LEITCH; BENNETT, 2004); a eliminação de cromossomos (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000; GERMAND et al., 2005); a ocorrência de rearranjos cromossômicos (UDALL; QUIJADA; OSBORN, 2005); as alterações epigenéticas como metilação de sequências codantes e não codantes de DNA (LEVY; FELDMAN, 2004);

LUKENS et al., 2006); o silenciamento gênico (GAETA et al., 2007) e a ativação de genes e retrotransposons que alteram a expressão de genes adjacentes (ADAMS; WENDEL, 2005).

Segundo Feldman et al. (1997) e Liu et al. (1996) uma eliminação específica de sequências de DNA ocorre nos primeiros estágios após a hibridação. Neste contexto, várias hipóteses têm sido desenvolvidas para explicar o processo de eliminação cromossômica em híbridos: inativação dos cromossomos por nucleases, assincronia no tempo da divisão celular, assincronia na síntese de nucleoproteínas levando a perda de cromossomos com segregação tardia, formação de fusos multipolares, separação espacial dos genomas durante a intérfase e metáfase, inativação parental específica de centrômeros, degradação de cromossomos por atividade de nucleases hospedeiro-específico (JIN et al., 2004; MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004), além de ligação incompleta dos fusos nos centrômeros, cromossomos não orientados na placa equatorial, eliminação de cromatina nuclear (*buds*), quebras cromossômicas e inativação de centrômeros (GERNAND et al., 2005; ISHII et al., 2010; MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004; SANEI et al., 2011).

A eliminação cromossômica é um fenômeno comum entre outros híbridos interespecíficos de gramíneas, sendo uma ferramenta muito valiosa em programas de melhoramento genético (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Muitos exemplos na literatura demonstram que a eliminação cromossômica de um genoma parental pode ser parcial ou total (PAGLIARINI; ADAMOWSKI; BATISTA, 1998; PAGLIARINI; SUAKI, 2003; PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1999). Em muitos casos, a eliminação cromossômica é dependente do tecido e é influenciada pelas condições fisiológicas das células (SINGH, 2002). A partir da eliminação de

cromossomos em híbridos interespecíficos podem-se obter linhas de adição (materiais contendo cromossomos ou partes de cromossomos extras) ou linhas de substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes) (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Se o genoma completo de um dos parentais no híbrido interespecífico for eliminado há a possibilidade de obtenção de haploides.

Entretanto, para se obter tais linhas de adição e de substituição, é de suma importância estudar as alterações genômicas ocorridas no híbrido interespecífico e estudar o fenômeno de eliminação cromossômica, identificando e caracterizando os cromossomos dos genomas que estão sendo eliminados do híbrido interespecífico.

Na família Poaceae, a eliminação somática parcial ou total de cromossomos de uma das espécies parentais tem sido descrita em vários trabalhos, como em cruzamentos de *Hordeum lechleri* x *H. vulgare* (LINDELAURSEN; VON BOTHMER, 1999), *Avena sativa* x *Zea mays* (RIERALIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996), *Lolium perenne* x *Festuca pratensis* (GUO; MIZUKAMI; YAMADA, 2005), *Triticum aestivum* x *Pennisetum glaucum* (GERMAND et al., 2005; ISHII et al., 2010), *Triticosecale* Wittm x *Triticum aestivum* (PRATAP; SETHI; CHAUDHARY, 2006), *Setaria italica* x *Setaria viridis* (DOUST; KELLOGG, 2006), *Triticum aestivum* x *H. vulgare* (BADAEVA et al., 2008), *T. aestivum* x *Aegilops kotschy* (TIWARI et al., 2010), *H. bulbosum* x *H. vulgare* (SANEI et al., 2011).

Em cevada, Sanei et al. (2011) estudaram o mecanismo de eliminação seletiva dos cromossomos paternos durante o desenvolvimento inicial dos embriões de *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum*. O real mecanismo celular envolvido no processo de eliminação dos cromossomos uniparentais ainda é pouco compreendido. Cromossomos de *H. bulbosum* são eliminados vários dias

após a polinização independente da direção de cruzamento. Neste trabalho, os autores concluíram que a inatividade da proteína centromérica CENH3, no centrômero dos cromossomos *H. bulbosum*, desencadeia o processo de eliminação mitose-dependente dos cromossomos uniparentais em híbridos instáveis de *H. vulgare* × *H. bulbosum*.

As duas espécies de *Hordeum* codificam duas variantes ativas de CENH3. Após a fertilização, todos os genes de CENH3 das duas espécies são transcricionalmente ativos. Ocorre tradução da CENH3 de *H. vulgare*, mas não é conhecido se ocorre tradução desta proteína em *H. bulbosum*. Há então o carregamento de CENH3 para os centrômeros de *H. vulgare*, não ocorrendo o mesmo em *H. bulbosum*. Como resultado da assincronia do ciclo celular dos dois genomas parentais, a incorporação da CENH3, provavelmente, só ocorre nas regiões centroméricas de *H. vulgare* durante a fase G2. Assim, como um resultado da inatividade dos centrômeros em híbridos instáveis, os cromossomos de *H. bulbosum* são eliminados na anáfase e irão formar micronúcleos, cuja cromatina será posteriormente degradada, e um embrião haplóide *H. vulgare* irá desenvolver-se (SANEI et al., 2011).

A identidade e função centroméricas exigem a histona H3 específica do centrômero (CENH3), que substitui a histona H3 convencional nos nucleossomos (RAVI et al., 2010). Alterações na CENH3 podem levar à eliminação do genoma e perturbações na estrutura do centrômero, podendo impedir a segregação de cromossomos durante a mitose. Estudos em *Arabidopsis thaliana* mostraram que a CENH3 endógena pode ser complementada pela variante CENH3 alterada. No entanto, cruzamento entre plantas modificadas e selvagens geram descendência haploide devido à eliminação cromossômica uniparental (MAHESHWARI et al., 2015; RAVI; CHAN, 2010), uma vez que ocorre fragmentação cromossômica após o

cruzamento de plantas que possuem CENH3 modificada e *A. thaliana* tipo selvagem (TAN et al., 2015).

Em híbridos de trigo e milho, todos os cromossomos de milho são eliminados numa fase precoce da embriogênese e o processo de eliminação ocorre devido à não ligação correta das fibras do fuso ao cinetócoro dos cromossomos do milho, causando atraso dos mesmos para os pólos (MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004).

Ishii et al. (2010), trabalhando com híbridos de trigo e aveia com milheto, observaram a dinâmica dos cromossomos de milheto por meio da hibridização *in situ*. Perceberam que, do cruzamento com aveia, os sete cromossomos do milheto foram retidos. No entanto, em híbridos com espécies de Triticeae, a eliminação dos cromossomos de milheto ocorreu durante a embriogênese, através de rearranjos cromossômicos e não-disjunção na anáfase, juntamente com micronúcleos. Estes resultados podem indicar que a razão para a eliminação dos cromossomos não é apenas um mau funcionamento do cinetócoro durante a ligação às fibras do fuso, como no caso de cruzamentos em trigo e milho (MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004).

Na eliminação cromossômica em híbridos de trigo e milheto, a coesina ligada aos cromossomos de milheto não se dissocia normalmente durante a divisão celular, no entanto, os centrômeros estão ligados ao fuso e tendem a migrar para os pólos e, se a tensão para um dos pólos é mais forte que para o outro, os cromossomos passam para o pólo sem separação das cromátides-irmãs, causando não disjunção (ISHII et al., 2010).

Ainda em híbridos provenientes de cruzamento entre trigo e milheto, Gernand et al. (2005) afirmaram que a eliminação cromossômica ocorre via formação de micronúcleos, com os cromossomos de milheto ocupando uma posição periférica nos núcleos interfásicos, acompanhado de

heterocromatinização e fragmentação de DNA, devido à assincronia durante a replicação do DNA. Os autores relatam que a eliminação cromossômica iniciou-se logo após a fertilização e que os cromossomos ou fragmentos eliminados que não se alinham corretamente na metáfase, segregam tardiamente na anáfase e formam micronúcleos (GERNAND et al., 2005).

Em híbridos decaploides de *Triticum aestivum* × *Aegilops kotschy*, foi observado eliminação aleatória de cromossomos dos vários genomas do híbrido (ABDU^KS^K) de forma diferente. Cromossomos dos genomas A e B foram em sua maioria mantidos, enquanto cromossomos do genoma D, U^K e S^K são eliminados aleatoriamente a partir de células somáticas de plantas híbridas (TIWARI et al., 2010). Os autores atribuíram ao alto nível de ploidia dos híbridos decaploides uma das causas da eliminação de cromossomos.

A eliminação cromossômica também é relatada para espécies animais. Em células híbridas de rato-humano, uma progressiva e gradual perda de cromossomos humanos ocorre durante a formação da célula híbrida e a eliminação dos cromossomos humanos tem como causa as alterações cromossômicas estruturais resultantes de danos ao DNA não reparados (WANG et al. 2014). A ocorrência de quebras e danos ao DNA também está relacionada à eliminação cromossômica (CRASTA et al., 2012; THOMPSON; COMPTON, 2011; WANG et al., 2014). Erros na mitose podem levar a ocorrência de cromossomos atrasados que, por sua vez, são particionados em micronúcleos (THOMPSON; COMPTON, 2011).

2.3.1 Eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos de capim-elefante e milheto

Os híbridos triplóides de capim-elefante e milho são estáveis quanto ao número cromossômico, apresentando uma proporção genômica de 2:1 genomas de capim-elefante e de milho, porém quando se altera esta proporção, após a indução de duplicação cromossômica, ocorre eliminação de cromossomos das células induzidas dos híbridos. Apesar da estabilidade quanto ao número cromossômico somático observado para híbridos triploides, há variação no conteúdo de DNA desses híbridos. Nunes et al. (2013) avaliaram a perda de DNA durante o desenvolvimento de embriões em híbridos triploides e tetraploides produzidos por hibridação interespecífica entre capim-elefante e milho por meio de citometria de fluxo. Os resultados mostraram uma instabilidade progressiva, a partir do 10º dia após a polinização até o 30º dia, em ambos os híbridos levando a alterações significativas no conteúdo de DNA. Diminuição na quantidade de DNA em relação ao conteúdo esperado também foi observada em plantas híbridas triploides por Leão et al. (2011).

Abreu et al. (2006) estudaram o fenômeno da mixoploidia que ocorre em híbridos de capim-elefante e milho tratados com agentes antimitóticos e observaram números cromossômicos variando de 14 a 42 cromossomos nas metáfases analisadas, o que indica que houve duplicação seguida de eliminação cromossômica, confirmada por aberrações cromossômicas. A eliminação cromossômica ocorreu, provavelmente, em razão tanto de problemas de proporções de genomas, quanto de controle da expressão gênica. Os autores descartaram a hipótese de divisão assíncronica, porque nos híbridos triplóides os genomas A, A' e B segregam normalmente.

A confirmação da ploidia após as metodologias de indução de duplicação cromossômica foi realizada através de contagem de cromossomos em células meristemáticas das plantas híbridas e através da estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo. O número de plantas hexaploides estáveis com

$2n = 6x = 42$ observado foi pequeno, enquanto a frequência de plantas mixoplóides com número cromossômico variando de 14 a 42 foi alta (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009).

Barbosa et al. (2007) tentaram restaurar a fertilidade dos híbridos de capim-elefante e milho para a produção de um híbrido hexaploide estável a partir da utilização de soluções de colchicina em diversas concentrações aplicadas em seedlings, plântulas e segmentos caulinares. A duplicação cromossômica foi confirmada pela contagem de cromossomos em células meristemáticas de pontas de raízes. Em 38% das plantas sobreviventes os autores observaram células com conjunto cromossômico duplicado e a presença de polens viáveis. Entretanto, essas plantas mostraram-se mixoploides, apresentando instabilidade no número cromossômico somático, que variou de 14 a 42.

Campos et al. (2009) também induziram duplicação cromossômica *in vitro* em híbridos triploides de capim-elefante e milho com colchicina para obtenção de híbridos hexaploides. Para a identificação dos hexaploides, os autores utilizaram citometria de fluxo, contagem cromossômica e análise da morfologia de estômatos. Os autores observaram indícios de perda de DNA e consequente eliminação de sequências genômicas nos híbridos tratados. No trabalho, os autores demonstraram, por meio da citometria de fluxo, reduções de 0,08 a 0,16 pg de DNA nesses híbridos em relação ao esperado para a média dos parentais, sugerindo uma provável eliminação de sequências genômicas após a hibridação. A contagem cromossômica foi utilizada para confirmar a condição hexaploide das plantas duplicadas. Em relação à frequência e comprimento estomatal, os valores para as plantas mixoploides foram intermediários entre os encontrados para os híbridos triploides e hexaploides.

Bustamante (2009) avaliou esses mesmos híbridos hexaploides quanto ao número cromossômico e à frequência de alterações no ciclo celular. A autora verificou que os números cromossômicos somáticos dos genótipos hexaploides variaram de 14 a 42, também indicando que houve duplicação nos genótipos, mas os cromossomos foram sendo perdidos, tornando as plantas mixoploides. Com relação à frequência de alterações no ciclo celular, a autora verificou que a perda de cromossomos deve-se à ocorrência de anormalidades, como cromossomos pegajosos, pontes e cromossomos não orientados na metáfase ou perdidos na anáfase e anáfase com ponte. Além disso, foi constatado que não há variação no conteúdo de DNA entre os tecidos (raízes e folhas) de um mesmo híbrido.

Andrade-Vieira et al. (2013) trabalharam com híbridos hexaploides buscando entender a eliminação cromossômica dos parentais nos híbridos interespecíficos duplicados entre capim-elefante e milho e mostraram que há eliminação de cromossomos de ambos os parentais (biparental) e aleatória. A proporção genômica dos parentais nas plantas mixoploides, através do uso de sonda genômica de milho, revelou que dois dos genótipos avaliados apresentavam frequências altas de células com 28 cromossomos que corresponde ao número cromossômico do parental capim-elefante. Com esses resultados, os autores sugeriram que essas plantas tendem a se estabilizar com 28 cromossomos, dos quais 18 são frequentemente do parental capim-elefante e 10 do parental milho. Ademais, nos outros híbridos avaliados foram observadas células com um número cromossômico de $2n = 38$ cromossomos, próximo do hexaploide esperado ($2n = 42$), demonstrando que há plantas que tendem a se estabilizar perdendo menos cromossomos. Neste caso, a combinação de 12 cromossomos de milho e 26 de capim-elefante foi a mais frequente (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013).

Adicionalmente, Leão et al. (2011) observaram a ocorrência de mixoploidia em consequência da eliminação cromossômica em combinações genômicas resultantes do retrocruzamento dos híbridos hexaploides com os parentais capim-elefante e milheto. Combinações genômicas 4x e 5x são mixoploides e a variação do número de cromossomos dentro raça cromossômica 5x é maior do que em 4x. Além disso, as alterações genômicas que ocorrem na raça cromossômica 4x levam a maior redução na quantidade de DNA quando em comparação com 5x. Reis (2013) observou alterações no ciclo celular relacionados à eliminação cromossômica em híbridos hexaploides poliploidizados e também em híbridos provenientes de retrocruzamento utilizados por Leão et al. (2011).

Recentemente, utilizando técnicas de imunolocalização para a histona H3 fosforilada na serina 10, uma marca epigenética para centrômeros ativos (HOUBEN; DEMIDOV; KARIMI-ASHTIYANI, 2013). Resende et al. (2015) avaliaram os efeitos da hibridação interespecífica e poliploidização em híbridos de capim-elefante e milheto através de análises meiotica e de ciclo celular. Os autores observaram metáfases com cromossomos não-orientados, anáfases com cromossomos perdidos/atrasados e pontes na anáfase com e sem imunossinal, indicando que o material genético sem sinal de H3S10ph corresponderia a fragmentos acêntricos e/ou cromossomos com centrômeros inativos em processo de eliminação. Além disso, cromossomos/fragmentos com centrômeros ativos também poderiam estar sendo eliminados.

Ademais, trabalhando com híbridos triplodes, Reis et al. (2015) mostrou que após a hibridação ocorrem alterações na relação dos genomas parentais no núcleo híbrido. O capim-elefante e o milheto apresentaram tamanhos cromossômicos sobrepostos, entretanto, o híbrido interespecífico apresentou cromossomos com comprimento menor do que o esperado. Além disso, os

autores identificaram perda no conteúdo de DNA e ocorrência de rearranjos genômicos por meio das alterações cariotípicas no híbrido.

2.4 Relações genômicas entre espécies de *Pennisetum*

O conhecimento das relações genômicas entre espécies de plantas é muito útil no planejamento efetivo de estratégias de reprodução destinadas a transferir genes desejáveis ou grupos gênicos de uma espécie para outra (JAUHAR; HANNA, 1998). Para a análise genômica podem ser usadas técnicas como 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; PETERSEN, 1998).

Um dos primeiros métodos usados para avaliar a afinidade genômica entre espécies foi o estudo do pareamento cromossômico em híbridos. A utilização de dados de pareamento cromossômico apresenta algumas vantagens 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, fornecendo informações sobre as propriedades dos cromossomos envolvidos (TECHIO; DAVIDE, 2007). As relações genômicas são inferidas pelo grau de pareamento entre cromossomos parentais. Este pareamento em híbridos pode ser alossindético, quando ocorre pareamento entre cromossomos das espécies parentais, ou autossindético, quando ocorre pareamento dentro de um mesmo complemento parental (JAUHAR; JOPPA, 1996).

No gênero *Pennisetum*, a distinção de tamanho dos cromossomos de milho e capim-elefante torna possível estudar, no híbrido, o grau de pareamento alossindético e autossindético, uma vez que os cromossomos de

milheto são maiores que os de outras espécies do gênero. Baseado no pareamento em híbridos triploides foi inferido que os genomas A e A' são muito similares e entre eles e o genoma B essa similaridade é reduzida. A origem do genoma B ainda permanece desconhecida (JAUHAR; HANNA, 1998; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). A observação das configurações na diacinese e metáfase I mostraram que os bivalentes são formados por pareamento alossindético envolvendo todos os cromossomos dos genomas A e A' (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

O uso de modelos matemáticos também pode ser aplicado a fim de estimar o pareamento cromossômico em híbridos. Techio, Davide e Pereira (2005) determinaram quantitativamente a afinidade relativa entre os genomas A, A' e B de *Pennisetum glaucum* e *Pennisetum purpureum*. Comparando a estimativa obtida para os híbridos avaliados, por meio da frequência de bivalentes em anel, foi observada maior afinidade relativa entre os genomas A e A'. Os resultados indicaram que as diferenças genéticas e estruturais entre esses genomas são pequenas, mas entre estes e o genoma B as diferenças são maiores. Apesar disto, existe homeologia entre os genomas A e A' com o B, embora em um grau menor. Essa proposição é suportada pela origem híbrida do genitor capim-elefante que reuniu os genomas A' e B. Segundo os mesmos autores, é provável que as espécies genitoras doadoras desses dois genomas apresentavam alguma homologia entre os cromossomos para permitir a formação de um híbrido estável como o capim-elefante.

Técnicas de bandeamento cromossômico hibridização *in situ* genômica (GISH) e imunocoloração tem sido aplicadas possibilitando maior resolução e definição dos cromossomos (TECHIO; DAVIDE, 2007). Nesse sentido, Reis et al. (2014) mostraram que há diferenças nas proporções e distribuição do genoma A sobre os genomas A' e B após análises de hibridização *in situ* genômica

(GISH). Segundo os autores, os genomas A e A' divergiram a partir de um ancestral comum, de modo que ocorreram reorganizações no genoma A ancestral durante a evolução gerando o genoma A' presente no núcleo do *P. purpureum*.

Relações significativas entre *P. glaucum* e as espécies selvagens *P. purpureum* e *P. squamulatum* também foram observadas e sugerem que estas três espécies devem ter uma origem comum. Análises meióticas dos híbridos interespecíficos entre *P. squamulatum*, *P. purpureum* e *P. glaucum* revelaram a presença de trivalentes, quadrivalentes, um hexavalente ocasional e uma elevada frequência de bivalentes, indicando alguma homeologia entre os genomas de três espécies (DUJARDIN; HANNA, 1989).

Estudos meióticos realizados em duas espécies diploides, *P. glaucum* ($x = n = 7$), *P. orientale* ($x = n = 9$) e no híbrido F1 resultante do cruzamento entre elas revelaram a relação entre esses dois números básicos. Os autores mostraram que *P. glaucum* e *P. orientale* formam 7 e 9 bivalentes, respectivamente, na meiose. Entretanto, no híbrido foi identificado pareamento secundário entre dois cromossomos das duas espécies, sendo os cromossomos de *P. orientale* cerca de metade do tamanho dos cromossomos de *P. glaucum*. Com base nos resultados, os autores sugeriram homologia entre os genomas destas espécies (PATIL; SING, 1964).

É importante ressaltar que além da proximidade com *P. glaucum* e *P. squamulatum*, *P. purpureum* é considerado intimamente relacionado ao gênero *Cenchrus*, segundo análise combinada de marcadores plastidiais (CHEMISQUY et al., 2010; DONADIO et al., 2009). Chemisquy et al. (2010) propuseram a unificação de três gêneros: *Pennisetum*, *Cenchrus* e *Odontelyrum*, baseados nos seus resultados de análise filogenética utilizando dados morfológicos, plastidiais e nucleares e nas hipóteses filogenéticas obtidas com dados morfológicos, de

desenvolvimento e abordagens multilocus. Essa proposta, no entanto, ainda não está sendo amplamente utilizada por todos os pesquisadores que estudam o gênero *Pennisetum*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 21, n. 10, p. 539-543, Oct. 2005.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* Schum. and *P. glaucum* (L.) R. Br. **Crop Science**, Madison, v. 53, p. 1-8, Sept./Oct. 2013.
- AVDULOV, N. P. Karyo-systematische untersuchungen der familie gramineen. **Bulletin of Applied Botanic, of Genetic and Plant Breeding**, Leningrad, v. 44, p. 119-123, 1931. Supplies.
- BADAEVA, E. D. et al. Analysis of introgression of *Aegilops ventricosa* Tausch. genetic material in a common wheat background using C-banding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 5, p. 803-811, July 2008.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 681-684, set. 2000.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, mar. 2007.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* (Schumack) x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35, fev. 2003.
- BRUNKEN, J. N. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 64, n. 2, p. 161-176, Feb. 1977.
- BUSTAMANTE, F. O. **Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.:** um estudo temporal e tecido

específico. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CAMPOS, J. M. S. et al. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 101-104, Jan. 2009.

CHEMISQUY, M. A. et al. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 107–130, July 2010.

CHOWDHURY, M. K. V.; SMITH, R. L. Mitochondrial DNA variation in pearl millet and related species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, n. 1, p. 25–32, July 1988.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum. Grasses of the world**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986. 389 p.

CLEGG, M. T.; RAWSON, J. R. Y.; THOMAS, K. Chloroplast DNA variation in pearl millet and related species. **Genetics**, Austin, v. 106, n. 3, p. 449–461, Mar. 1984.

CRASTA, K. et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. **Nature**, Baltimore, v. 482, p. 53-58, Feb. 2012.

DIZ, D. A. **Breeding produces and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploids hybrids**. 1994. 118 p. Tese (PhD in Agronomy) – University of Florida, Gainesville, 1994.

DONADIO, S. et al. A preliminary molecular phylogeny of *Pennisetum* and *Cenchrus* (Poaceae-Paniceae) based on the trnL-F, rpl16 chloroplast markers. **Taxon**, Utrecht, v. 58, n. 2, p. 392–404, May 2009.

DOUST, A. N.; KELLOGG, E. A. Effect of genotype and environment on branching in weedy green millet (*Setaria viridis*) and domesticated foxtail millet (*Setaria italica*) (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1335-49, Apr. 2006.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Crossability of pearl millet with *Pennisetum* species. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 1, p. 77-80, Jan. 1989.

FELDMAN, M. et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosome. **Genetics**, Austin, v. 147, n. 3, p. 1381-1387, Nov. 1997.

GAETA, R. T. J. et al. Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3403-3417, Nov. 2007.

GERNAND, D. et al. Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, Sept. 2005.

GONZALEZ, B.; HANNA, W. W. Morphological and fertility responses in isogenic triploid and hexaploid pearl millet x napier-grass hybrids. **Journal of Heredity**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 317-318, July 1984.

GUO, Y.; MIZUKAMI, Y.; YAMADA, T. Genetic characterization of androgenic progeny derived from *Lolium perenne* × *Festuca pratensis* cultivars. **New Phytologist**, Cambridge, v. 166, n. 2, p. 455-464, May 2005.

HANNA, W. W. et al. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, n. 6, p. 969-971, Jan. 1984.

HANNA, W. W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L. P. et al. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.

HANNA, W. W. Utilization of wild relatives of pearl millet. In: INTERNATIONAL PEARL MILLET WORKSHOP, 1987, Patancheru. 1. **Proceedings...** Patancheru: ICRISAT Center, 1987. p. 33-42.

HANNA, W. W.; DUJARDIN, M. Cytogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilger and its hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 3, p. 499-553, May 1986.

HARLAN, J. R.; WET, J. M. J. de. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, n. 4, p. 509–517, Aug. 1971.

HAROUN, S. A. Cytogenetic studies on some species of genus *Pennisetum* L. (Rich) Poaceae. **Journal of American Science**, New York, v. 6, n. 9, p. 193-200, 2010.

HAROUN, S. A.; RICHARDS, A. J.; MACLEOD, R. D. Genetic relationship between some millets. **Linnean Society of London**, London, v. 13, n. 1, p. 270-281, 1992.

HOUBEN, A.; DEMIDOV, D.; KARIMI-ASHTIYANI, R. Epigenetic control of cell division. In: GRAFI, G.; OHAD, N. **Epigenetic memory and control in plants**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 155-175.

INGHAM, L. D. et al. Origin of the main class of repetitive DNA within selected *Pennisetum* species. **Molecular Genetic Genomics**, Berlin, v. 238, n. 3, p. 350-356, Nov. 1993.

ISHII, T. et al. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. **Chromosome Research**, Netherlands, v. 18, n. 7, p. 821-831, Nov. 2010.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species**. New York: A. R. Liss, 1981. 289 p.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex: relevance to breeding**. New York: Springer-Verlag, 1993. 254 p.

JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 64, n. 2, p. 1-26, Aug. 1998.

JAUHAR, P.; JOPPA, L. R. Chromosome pairing as a tool in genome analysis: merits and limitations. In: JAUHAR, P. P. (Ed.). **Methods of genome analysis in plants**. New York: CRC Press, 1996. p. 9-37.

JIN, W. W. et al. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic background of oat. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, p. 571-581, Mar. 2004.

LEÃO, F. F. et al. Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 7, p. 712-719, July 2011.

LEÃO, F. F. et al. Produção forrageira e composição bromatológica de combinações genômicas de capim-elefante e milheto. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 368-375, abr./jun. 2012.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 651-663, Aug. 2004.

LEVY, A. A.; FELDMAN, M. Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 4, p. 607-613, Aug. 2004.

LINDE-LAURSEN, I.; VON BOTHMER, R. Orderly arrangement of the chromosomes within barley genomes of chromosome-elimination *Hordeum lechleri* x barley hybrids. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 225-236, Apr. 1999.

LIU, S. C. et al. Genome wide high-resolution mapping by recurrent intermating using *Arabidopsis thaliana* as a model. **Genetics**, Austin, v. 142, n. 1, p. 247-258, Jan. 1996.

LUKENS, L. N. et al. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 140, n. 1, p. 336-348, Jan. 2006.

MAHESHWARI, S. et al. Naturally occurring differences in CENH3 affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e1004970, Jan. 2015.

MARCHAIS, L.; TOSTAIN, S. Analysis of reproductive isolation between pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. and *P. ramosum*, *P. schweinfurthii*, *P. squamulatum*, *Cenchrus ciliaris*). **Euphytica**, Wageningen, v. 93, n. 1, p. 97-105, 1997.

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar. 1997.

MOCHIDA, K.; TSUJIMOTO, H.; SASAKUMA, T. Confocal analysis of chromosome behaviour in wheat x maize zygotes. **Genome**, Ottawa, v. 47, n. 1, p. 199-205, Jan. 2004.

NUNES, J. D. et al. DNA elimination in embryogenic development of *Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum* (Poaceae) hybrids. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 4817-4826, out. 2013.

PAGLIARINI, M. S.; ADAMOWSKI, E. V.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v. 11, n. 5, p. 272-276, Nov. 1998.

PAGLIARINI, M. S.; SUAKI, R. M. Chromosome transfer and chromosome elimination in *Avena sativa*. **Nucleus**, La Habana, v. 46, n. 3, p. 104-107, Oct. 2003.

PANTULU, J. V.; RAO, K. Cytogenetics of pearl millet. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 1-17, Mar. 1982.

PATIL, B. D.; SING, A. An interspecific cross in the genus *Pennisetum* involving two basic numbers. **Current Science**, Bengaluru, v. 33, n. 8, p. 161-162, 1964.

PEREIRA, A. V. et al. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L. et al. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PEREIRA, A. V. et al. Tendências do melhoramento genético e produção de sementes forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, 7., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: Editora da UFLA, 2003. p. 36-63.

PEREIRA, A. V. et al. Variação da qualidade de folhas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, jun. 2000.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. p. 569-611.

POWELL, J.; HANNA, W.; BURTON, G. W. Origin, cytology and reproductive characteristic of haploids in pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 15, n. 3, p. 389-392, May 1975.

PRATAP, A.; SETHI, G. S.; CHAUDHARY, H. K. Relative efficiency of anther culture and chromosome elimination techniques for haploid induction in triticales× wheat and triticales× triticales hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 150, n. 3, p. 339-345, Aug. 2006.

RAVI, M. et al. The rapidly evolving centromere-specific histone has stringent functional requirements in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Austin, v. 186, n. 2, p. 461–471, Oct. 2010.

RAVI, M.; CHAN, S. W. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. **Nature**, Baltimore, v. 464, n. 7288, p. 615-618, Mar. 2010.

REIS, G. B. **Eliminação cromossômica e homologia genômica em *Pennisetum Spp Rich. (Poaceae)***. 2013. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

REIS, G. B. et al. Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). **Comparative Cytogenetics**, Bulgária, v. 8, n. 3, p. 31–41, Aug. 2014.

REIS, G. B. et al. Karyotype alterations after hybridization between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 39, n. 5, p. 443-454, set./out. 2015.

RENNO, J. F. et al. Haplotype variation of cpDNA in the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). **Heredity**, Baltimore, v. 86, n. 5, p. 537–544, May 2001.

RESENDE, K. F. M. de et al. Effects of hybridization and polyploidy on the histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in *Pennisetum spp.* Rich.

(Poaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 5, p. 453-457, May 2015.

RIDDLE, N. C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 19, n. 11, p. 597-600, Nov. 2003.

RIERA-LIZARAZU, O.; RINES, H. W.; PHILLIPS, R. L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, n. 1/2, p. 123-135, July 1996.

SANEI, M. et al. Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 108, n. 33, p. 498-505, Feb. 2011.

SCHANK, S. C. et al. Genetic improvement of napier grass and hybrids with pearl millet. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 35-40, Aug. 1993.

SCHMELZER, G. H.; RENNO, J. F. Genotypic variation in progeny of the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivalvula* in West Africa. **Plant Systematic and Evolution**, Wien, v. 215, n. 1, p. 71-83, Mar. 1999.

SCHMELZER, G.H. Review of *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 97, n. 1, p. 1-20, Sept. 1997.

SEBERG, O.; PETERSEN, G. A critical review of concepts and methods used in classical genome analysis. **The Botanical Review**, New York, v. 64, n. 4, p. 372-417, Dec. 1998.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002. 463 p.

SOUZA-SOBRINHO, F. et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 873-880, set. 2005.

STAPF, O.; HUBBARD, C. E. *Pennisetum*. In: PRAIN, D. (Ed.). Flora of Tropical Africa: part 6. Ashford: Reeve & Co, 1934. p. 954-1070.

STEBBINS, G. L. Cytogenetics and evolution in the grass family. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 43, n. 10, p. 890-905, Dec. 1956.

TAN, E. H. et al. Catastrophic chromosomal restructuring during genome elimination in plants. **Elife**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. e06516, May 2015.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 7-18, dez. 2007.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. P. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* and *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 8, n. 1, p. 28-33, Jan. 2005.

THOMPSON, S. L.; COMPTON, D. A. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore–microtubule attachment errors. **PNAS**, Washington, v. 108, n. 44, p. 17974–17978, Nov. 2011.

TIWARI, V. K. et al. Random chromosome elimination in synthetic *Triticum-Aegilops* amphiploids leads to development of a stable partial amphiploid with high grain micro- and macronutrient content and powdery mildew resistance. **Genome**, Ottawa, v. 53, n. 12, p. 1053-1065, Dec. 2010.

UDALL, J. A.; QUIJADA, P. A.; OSBORN, T. C. Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. **Genetics**, Austin, v. 169, n. 2, p. 967-979, Feb. 2005.

WANG, Z. et al. Unrepaired DNA damage facilitates elimination of uniparental chromosomes in interspecific hybrid cells. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 13, n. 8, p. 1345-1356, Apr. 2014.

WATSON L.; DALLWITZ, M. J. **The grass genera of the world**. Wallingford: CAB international, 1992. 1038 p.

WIPFF, J. K.; VELDKAMP, J. F. *Pennisetum advena* sp. nov. (Poaceae: Paniceae): A common ornamental grass throughout the southern United States. **Sida, Contributions to Botany**, Dallas, v. 18, n. 4, p. 1031-1036, 1999.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Normas da Revista Científica Chromosome Research (versão publicada)

**Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific
hybrids of *Pennisetum purpureum* (Napier grass)
and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) is caused
by micronucleation**

ABSTRACT

Genome instability is observed in several species hybrids. We studied the mechanisms underlying the genome instability in hexaploid hybrids of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) and pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) using a combination of different methods. Chromosomes of both parental genomes are lost by micronucleation. Our analysis suggests that genome instability occurs preferentially in meristematic root tissue of hexaploid hybrids, and chromosome elimination is not only caused by centromere inactivation. Likely, beside centromere dysfunction, unrepaired DNA double-strand breaks result in fragmented chromosomes in synthetic hybrids.

Keywords: Genome instability. Centromere inactivation. Hybrid. Double-strand breaks. Micronuclei.

Introduction

Napier grass (*Pennisetum purpureum* Scum., $2n=4x=28$, A'A'BB) and pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., $2n=2x=14$, AA) are economically important forage crops (Souza-Sobrinho et al. 2005). The genetic similarity between these species allows to obtain a triploid hybrid ($2n=3x=21$, AA'B) that combines the favorable characteristics of both species as well as higher quality and better acceptance for dairy cattle (Pereira et al. 2000). However, propagation of hybrids is limited by the sterility resulting from a triploid condition. As seed propagation is important for breeding programs, fertility of the triploid hybrid has been restored after colchicine treatment-based chromosome doubling ($2n=6x=42$, AAA'A'BB). However, the resulting hexaploid hybrids show mixoploidy as a consequence of chromosome instabilities in somatic cells (Abreu et al. 2006; Barbosa et al. 2007; Campos et al. 2009; Leao et al. 2011; Andrade-Vieira et al. 2013). On the other hand, triploid hybrids show chromosome number stability in somatic cells (Barbosa et al. 2003). These results suggest that the genomic instabilities happen during the growth of the plants and are not related to meiotic defects. However, the process underlying the somatic chromosome instability is unknown.

Allopolyploids formed by interspecific hybridization and subsequent genome doubling play an important role in plant evolution (Leitch and Leitch 2008). After fertilization, two different parental genomes are combined in one nucleus and this new genomic constitution may result in intergenomic parental conflicts leading to a genomic and epigenetic reorganization of the genomes (Riddle and Birchler 2003). This reorganization of genomes might result in chromosomal rearrangements, changes in number and distribution of DNA sequences, and loss of chromosomal segments or even entire chromosomes

(Levy and Feldman 2004). Some of these changes have been described to occur in F1 hybrids, while other changes occurred during or after genome doubling (Ma and Gustafson 2005).

Chromosome elimination after hybrid formation is the most drastic form of genome instability (reviewed in Ishii et al. 2016). For instance, *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* produces haploid embryos after elimination of *H. bulbosum* chromosomes (Kasha and Kao 1970). Crossing between wheat (*Triticum aestivum*) and pearl millet leads to a complete elimination of the pearl millet chromosomes by fragmentation during embryogenesis of the hybrids (Laurie 1989; Gernand et al. 2005; Ishii et al. 2010). In allopolyploids of wheat x rye (*Secale cereale*) intergenomic translocations and unequal chromosome divisions were observed in somatic cells, leading to chromosome eliminations and consequently to the instability of allopolyploids (Tang et al. 2012). Hybrids of *Brassica rapa* x *Orychophragmus violaceus* showed mixoploidy with variable numbers of chromosomes in somatic cells (Liu and Li 2007). Variability in the number and size of chromosomes in pollen mother cells and mitotic cells of root tips was observed in a hybrid of *Nicotiana suaveolens* and *Nicotiana glutinosa* as a consequence of anaphase abnormalities (Gupta and Gupta 1973).

Several explanations have been proposed for the instability of chromosomes in hybrid embryos such as incomplete attachment of the spindles to the centromeres, lagging chromosomes, nuclear extractions, chromosome breakage, and inactivation of centromeres (Mochida et al. 2004; Gernand et al. 2005; Ishii et al. 2010; Sanei et al. 2011). Chromosome elimination can be induced by crossing *Arabidopsis* plants in which the endogenous centromere-specific histone H3 (CENH3) is complemented by altered or natural variant CENH3 with wild-type plants. In this case, uniparental chromosome elimination

leads to haploid offspring (Ravi and Chan 2010; Karimi-Ashtiyania et al. 2015; Kuppup et al. 2015; Maheshwari et al. 2015). As reported for species hybrids, chromosome fragmentation occurs after crossing plants possessing a modified CENH3 and wild-type *Arabidopsis thaliana* (Tan et al. 2015).

In this study, we aimed to investigate the process leading to chromosome elimination and genomic instability in synthetic hexaploid interspecific hybrids of Napier grass and pearl millet. Our analyses demonstrate that genome instability occurs preferentially in meristematic root tissue. Micronuclei containing DNA of either parental genome are likely formed by centromere inactivation and chromosome fragmentation involving DNA double-strand breaks.

Materials and methods

Plant materials

Parental lines, *P. purpureum* cv. Pioneiro (Napier grass (NG)) and *P. glaucum* cv. BN2 (pearl millet (PM)), the triploid hybrid (NG × PM), and five hexaploid hybrids (6x-1, 6x-2, 6x-3, 6x-4, and 6x-5) were provided by the Active Germplasm Bank of Elephant Grass (BAGCE) from EMBRAPA Dairy Cattle (Brazilian Research Institute) and the Napier grass breeding program, experimental field of José Henrique Bruschi, municipality of Coronel Pacheco, Minas Gerais State, Brazil. The plants were grown in a greenhouse under 16 h light, 25 °C during the day and 18 °C at night.

Analysis of the DNA content

For estimating the genome size, samples of Napier grass, pearl millet, and triploid and hexaploid hybrids were analyzed by flow cytometry as described by Dolezel et al. (2007). Small pieces of young leaf tissue were chopped using a sharp razor blade in nuclei isolation buffer (Galbraith et al. 1983) supplemented with propidium iodide (50 µg/ml) and DNase-free RNase (50 µg/ml). Glycine max cv. Cina 5202 “Vorán” (Genebank Gatersleben accession number: SOJA 932; $2C = 2.23$ pg; Borchert et al. 2009) was used as an internal reference standard. Samples were measured on a CyFLow Space flow cytometer (Sysmex-Partec) equipped with a 532-nm laser. Approximately 10,000 particles per sample were analyzed using the software FlowMax (Sysmex-Partec). The absolute DNA contents of the samples were calculated based on the values of the G1 peak means. Per plant, at least three independent isolations were analyzed.

Chromosome preparation

Root tips were treated with 0.025 % cycloheximide for 2 h in darkness at room temperature (RT) and fixed with 3:1 (v/v) ethanol/glacial acetic acid for 5 days at RT. After replacing the fixative by 70 % (v/v), ethanol root tips were stored at 4 °C until use. Root tips were treated with an enzyme cocktail composed of 1 % (w/v) pectolyase (Sigma), 0.7 % (w/v) cellulase Onozuka R-10 (Yakult), 0.7 % cellulase (Calbiochem), and 1 % cytohelicase (Sigma) dissolved in 0.01 M citrate buffer for 75 min at 37 °C in a humid chamber. Afterwards, the root tips were squashed in 45 % (v/v) acetic acid and frozen in liquid nitrogen and then the cover slips were removed and stored in 99.6 % alcohol at 4 °C until use. The slides were stained with 1 µg/mL

4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-containing Vectashield® antifade solution (Vector Laboratories) and analyzed using a fluorescence microscope. Thirty metaphases were counted for each hexaploid hybrid, and 10 metaphases for Napier grass, pearl millet, and the triploid hybrid.

Immunostaining and fluorescence in situ hybridization

For immunostaining, meristems of roots and shoots as well as leaves were fixed in 2 mL ice-cold 4 % paraformaldehyde in 1x phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min on ice. After fixation, the materials were washed in 1x PBS three times for 5 min each on ice and digested using an enzyme cocktail of 1 % (w/v) pectolyase (Sigma), 0.7 % (w/v) cellulase Onozuka R-10 (Yakult), 0.7 % cellulase (Calbiochem), and 1 % cytohelicase (Sigma) dissolved in 1x PBS for 90 min at 37 °C. The tissue was squashed in one drop of 1x PBS on microscopic slides, and after freezing the slides in liquid nitrogen, the cover slips were removed and the slides were kept in 1x PBS until use. Immunolabeling was performed according to (Houben et al. 2007a) using a pearl millet-specific CENH3 antibody (1:500) (Ishii et al. 2015) and either a CY3-labeled goat anti-rabbit (1:300) (Dianova) or a DyLight 649-labeled goat antirabbit (1:400) (Abcam) for detection. After immunostaining, fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed as described in (Ishii et al. 2015). The 137- bp-long pearl millet centromere repeat was amplified by PCR as described (Ishii et al. 2010) and labeled with Alexa Fluor 488-5-dUTP (Thermo Fisher Scientific) by nick translation. The Arabidopsis-type telomere specific oligo probe was 5'-labeled with CY5 (Eurofins).

For genomic *in situ* hybridization (GISH), genomic DNAs of Napier grass and pearl millet were labeled with Texas red-12-dUTP (Thermo Fisher Scientific) or Alexa Fluor-488-dUTP by nick translation. The slides were washed twice in 2x saline sodium citrate (SSC) for 5 min each, fixed in 2.5 % formaldehyde in 2x SSC for 10 min at RT, washed in 2x SSC three times for 4 min each, and dehydrated in an ethanol series (70, 90, and 99.6 %) at RT for 2 min each. The probe was added to the hybridization mix (50% formamide, 20% dextran sulfate in 2x SSC), denatured for 5 min at 75 °C followed by 5 min on ice, and applied to each slide. The slides were denatured at 80°C for 1 min and 30 s on a hot plate and incubated in a humid chamber at 37°C overnight. Post-hybridization washes were performed in 2x SSC for 20 min at 56°C, followed by dehydration in an ethanol series and counterstaining with DAPI-antifade solution.

The slides were evaluated using an Olympus BX61 fluorescence microscope. Image stacks were captured by means of a cooled CCD ORCA R2 camera (Hamamatsu), deconvolved and merged with maximum intensity projection, and processed using the software packages cellSens Dimension (Olympus) and Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, USA).

Comet assay

The comet assay was performed according to Jovtchev et al. (2001) with some modifications. Five 5-mm-long roots were collected in 1x PBS and chopped with a razor blade in 300 µl 1x PBS on ice to isolate the nuclei. The nuclei suspension was filtered through a 50-µm CellTrics® filters (Sysmex-Partec), and 30 µl thereof was mixed with 30 µl of 1 % low-melting agarose (Cambrex) at 42 °C and dropped on the slides precoated with 1 % normal

melting agarose (Invitrogen). Each drop was spread on the slides with the help of a cover slip before placing the slides on ice to solidify the agarose. Then, nuclei were denatured with 30 mM NaOH, 0.5 mM EDTA, pH 11.8, for 10 min at RT. The slides were washed three times in cold 1x TBE (90 mM Trisborate, 2 mM EDTA, pH 8.4) for 5 min and placed in a horizontal gel electrophoresis chamber in 1x TBE applying 25 V for 15 min at RT. Subsequently, the agarose slides were dehydrated in 70 and 96 % ethanol for 5 min each, dried for 1 h at RT, stained with ethidium bromide (EtBr) (2 µg/ml in water), and covered with a cover slip. Comets of 100 randomly chosen nuclei per slide were analyzed on images recorded with a 40x objective on a fluorescence microscope.

The comets were categorized by scores of 0 to 3 to determine the length of the tail reflecting the occurring damage, as the greater the fragmentation of DNA, the longer the length of the tail. The percentage of damage corresponding to each score was ≤ 5 % (score 0), between 5 and 40 % (1), between 40 and 85 % (2) and >85 % (3) (Grazeffe et al. 2008). In total, 300 nuclei per hexaploid hybrid were analyzed.

The scores obtained were multiplied with the frequency of nuclei found for the corresponding score resulting in values of arbitrary units (AU) ranging from 0 to 300 (0 indicates total absence of damage and 300 maximum damage) (Koçyiğit et al. 2005). The AU values of the individual lines were compared by Tukey's test (at 5 % level) using the free software "R" (R Development Core Team 2011).

Results

Hexaploid hybrids reveal mixoploidy in meristematic tissues

Chromosome counts of 10 metaphases each of root meristems of Napier grass and pearl millet and the triploid hybrid resulted in stable chromosome numbers of $2n=4x=28$, $2n=2x=14$, and $2n=3x=21$, respectively. From five individual hexaploid hybrid plants, 30 metaphases were counted each. In all analyzed plants of the hexaploid hybrid, a high variability in chromosome numbers was detected (Fig. 1), similar as described previously (Abreu et al. 2006; Campos et al. 2009; Andrade-Vieira et al. 2013). The degree of the mixoploidy differed from plant to plant and ranged from $2n=6x=36$ (found in 6x-1, 6x-3, and 6x-5) (Fig. 1) to the expected number of $2n=6x=42$.

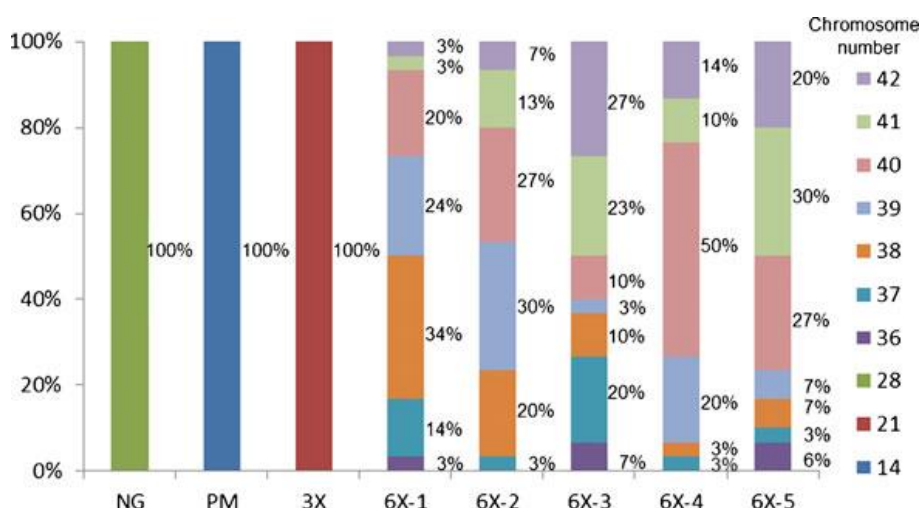


Fig. 1 Frequency (%) of different chromosome numbers in meristematic root cells of Napier grass (NG), pearl millet (PM), triploid hybrid (3x), and hexaploid hybrids (6x-1, 6x-2, 6x-3, 6x-4, and 6x-5) from the cross between Napier grass and pearl millet. Each color represents a different metaphase chromosome number.

In order to check whether the observed chromosome number variability is reflected by genome size variations, we measured the absolute DNA contents of the hybrid plants in comparison to the parental species in leaf tissue using

flow cytometry as described by Dolezel et al. (2007). The DNA content of Napier grass and pearl millet was with 4.49 ± 0.06 and 4.30 ± 0.06 pg/2C, respectively, similar to previous estimates (Martel et al. 1997; Campos et al. 2009). The obtained average values for the hybrids, 4.35 ± 0.08 pg/2C (triploid) and 8.64 ± 0.48 pg/2C (hexaploid), are in close concordance with those expected from calculations based on measurements of the parental genomes (4.39 pg/2C for the triploid and 8.77 pg/2C for the hexaploid hybrid). The values of the individual hexaploid hybrid plants ranged from 8.26 ± 0.12 pg/2C (6x-3) to 9.18 ± 0.32 pg/2C (6x-5) (Supplement Figure 1). Since these values differ from the expected ones in both directions by a similar range and no cells with increased chromosome numbers were found by chromosome counting in root tissue, we consider these deviations as technical variations rather than real genome size differences. This is supported by the fact that simultaneous measurements of the hexaploide hybrids 6x-2 (9.14 pg/2C) and 6x-3 (8.26 pg/2C) did not result in double peaks. In addition, we did not notice a severe increase of the coefficient of variation (CV) of the hybrids (3.90) compared to the parental species (3.59) as one would expect in case of a pronounced mixoploidy. This indicates that the chromosome number in differentiated leaf tissue seems to be stable.

Tissue type-specific genome instability in hexaploide hybrid

To elucidate the reason for the observed mixoploidy found in root tips, we analyzed root and shoot meristems as well as the first leaf around the shoot meristem for the presence of micronuclei (Table 1). While Napier grass and pearl millet as well as the triploid hybrid revealed very low numbers (0.28- 1 %) of micronuclei irrespective of the analyzed tissue, hexaploid hybrids contained

especially in root and shoot meristems a higher number of micronuclei (on average 1.53 and 1.93 %, respectively).

Table 1 Frequency of cells with micronuclei in root meristem, shoot meristem, and leaves of five individual hexaploid hybrids (6x-1, 6x-2, 6x-3, 6x-4, and 6x-5), Napier grass (NG), pearl millet (PM), and triploid hybrid (3x).

	Root meristem (%) ^a	Shoot meristem (%) ^b	Leaf (%) ^b
NG	5 (0.28)	3 (1.0)	1 (0.33)
PM	5 (0.28)	1 (0.33)	1 (0.33)
3x	11 (0.61)	2 (0.67)	2 (0.67)
6x-1	34 (1.89) ^c	8 (2.67) ^d	2 (0.67)
6x-2	22 (1.22) ^c	6 (2.0) ^d	3 (1.0) ^e
6x-3	29 (1.61) ^c	6 (2.0) ^d	2 (0.67)
6x-4	19 (1.06) ^c	4 (1.33) ^d	2 (0.67)
6x-5	34 (1.89) ^c	5 (1.67) ^d	3 (1.0) ^e
6x total	138 (1.53) ^f	29 (1.93) ^f	12 (0.8)

Chi-square test was used for statistical analysis

a One thousand eight hundred cells were analyzed per line

b Three hundred cells were analyzed per line

c One percent significant difference between 6x and NG, between 6x and PM, and between 6x and 3x

d One percent significant difference between 6x and NG, 5 % significant difference between 6x and PM, and 1 % significant difference between 6x and 3x

e Five percent significant difference between 6x and NG and 5% significant difference between 6x and PM

f Five percent significant difference between 6x total and parental line total

To investigate the genomic origin of the micronuclear DNA, we performed GISH with differentially labeled DNA of both genomes on the slides prepared from root meristems of the hexaploid hybrids. 71.4 % of the analyzed micronuclei (10 of 14 micronuclei) contained chromosomal DNA of both parental genomes. Napier grass- or pearl millet-specific signals only were found

in 14.3 % each (2 of 14 micronuclei) (Fig. 2, Suppl. Table 1). Thus, DNA of both parental genomes is lost by micronucleation.

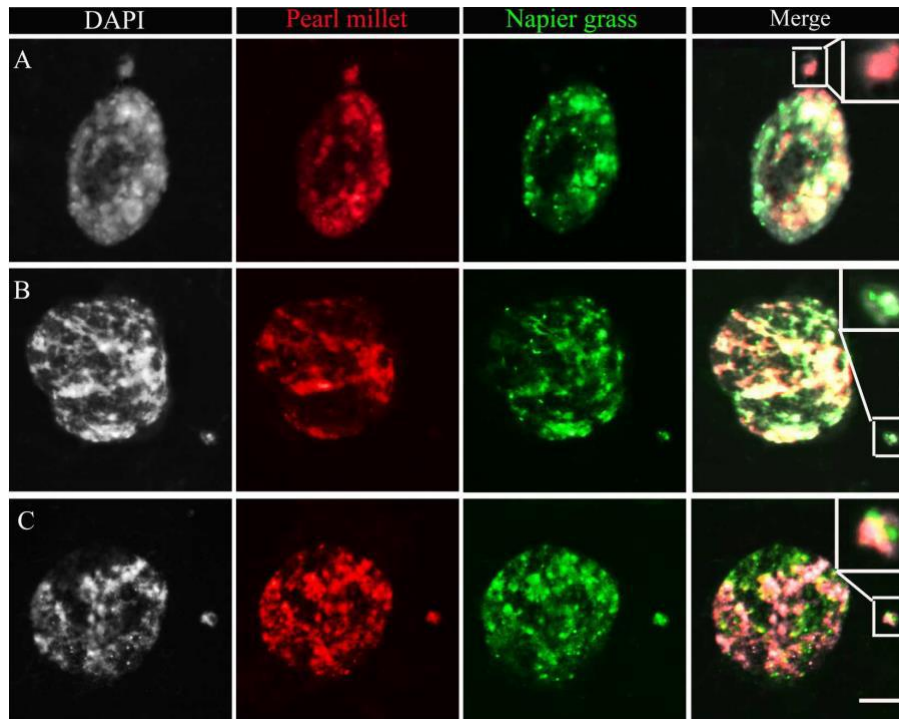


Fig. 2 Analysis of micronuclei of hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet with GISH probed with Napier grass and pearl millet. A Micronuclei only contained pearl millet signal. B Micronuclei only contained Napier grass signal. C Micronuclei contained Napier grass and pearl millet signals. *White* DAPI staining, *red* GISH signal with pearl millet genome, *green* GISH signal with Napier grass genome. Bar = 10 μ m.

To determine whether these micronuclei are formed due to centromere inactivity, we performed immunostaining experiments using a CENH3-specific antibody in combination with FISH, applying a probe to recognize the centromeres of both species (Fig. 3, Suppl. Fig S2). Among the analyzed 141 micronuclei, 29 (20.6 %) revealed centromeric FISH signals only (Fig. 3(A)), 61 (43.3 %) CENH3 and centromeric FISH signals (Fig. 3(B)), and 51 (36.2 %)

neither of them (Fig. 3(C), Table 2). Thus, 20.6% of the identified micronuclei in hexaploid hybrids are likely formed due to centromere dysfunction.

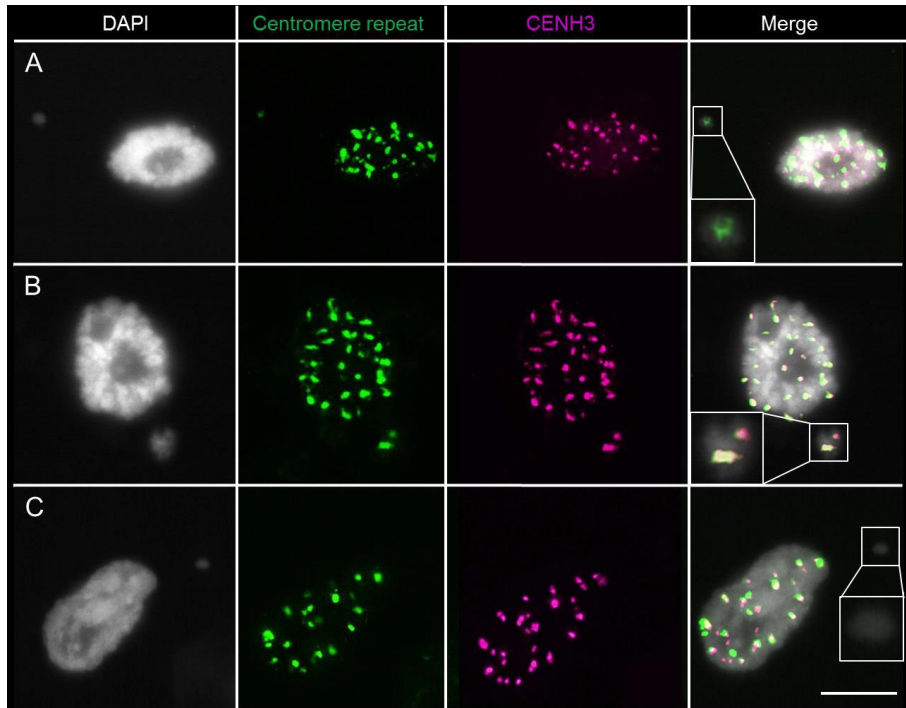


Fig. 3 Immuno-FISH with CENH3 and centromere in micronuclei of meristematic tissue of hexaploid hybrid of Napier grass and pearl millet. A Micronuclei with centromere signals and without CENH3 signals. B Micronuclei with centromere and CENH3 signals. C Micronuclei without centromere and CENH3 signals. Bar=10 μ m

Table 2 Analysis of micronuclei with CENH3 immunostaining and centromere-specific FISH in root meristem, shoot meristem, and leaves of five individual hexaploid hybrids (6x-1, 6x-2, 6x-3, 6x-4, and 6x-5), Napier grass (NG), pearl millet (PM), and triploid hybrid (3x).

Lines	Tissue types	No. of analysed micronuclei	With centromeres		Without centromeres (%)
			CENH3 - (%)	CENH3 + (%)	
6x-1	Root meristem	26	7	8	11
	Shoot meristem	8	0	6	2
	Leaf	2	2	0	0
6x-2	Root meristem	16	1	10	5
	Shoot meristem	6	0	4	2
	Leaf	3	0	2	1
6x-3	Root meristem	19	8	3	8
	Shoot meristem	6	0	2	4
	Leaf	2	0	1	1
6x-4	Root meristem	17	6	7	4
	Shoot meristem	4	0	3	1
	Leaf	2	1	1	0
6x-5	Root meristem	22	2	10	10
	Shoot meristem	5	2	3	0
	Leaf	3	0	1	2
6x total	Root meristem	100	24 (24.0)	38 (38.0)	38 (38.0)
	Shoot meristem	29	2 (6.9)	18 (62.1)	9 (31.0)
	Leaf	12	3 (25.0)	5 (41.7)	4 (33.3)
	Total	141	29 (20.6)	61 (43.3)	51 (36.2)
NG	Root meristem	3	0	1	2
	Shoot meristem	3	0	0	3
	Leaf	1	0	1	0
	Total	7	0 (0)	2 (28.6)	5 (71.4)
PM	Root meristem	3	1	0	2
	Shoot meristem	1	0	0	1
	Leaf	1	1	0	0

Total		5	2 (40.0)	0 (0)	3 (60.0)
3x	Root meristem	8	0	5	3
	Shoot meristem	2	0	2	0
	Leat	2	0	1	1
Total		12	0 (0)	8 (66.7)	4 (33.3)

NG: Napier grass, PM: pearl millet.

Further, we compared the relative size of individual CENH3 signals in nuclei and micronuclei in order to test whether the amount of CENH3 at centromeres within micronuclei is reduced compared to the nuclear CENH3 signals. No significant difference was found, indicating that the amount of CENH3 in micronuclei is not reduced (Fig. 4). However, the increased variability of CENH3 signal size in micronuclei compared to nuclei might be caused by CENH3 degradation or centromere aggregation.

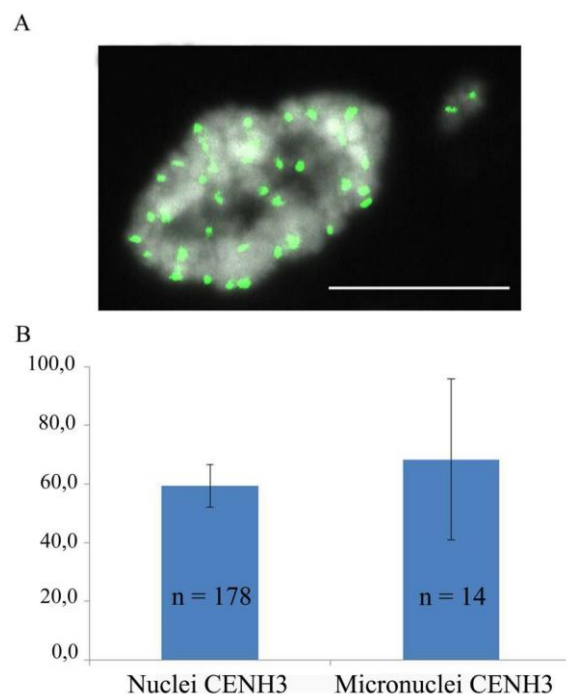


Fig. 4 Comparison of the CENH3-positive areas in nuclei and micronuclei of hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet. a Hybrid cell containing beside nucleus a micronucleus containing two chromosomes immunostained with CENH3 (green). Bar=10 μ m. b The average area size (pixel) of CENH3 signals in nuclei and micronuclei centromere in the hybrid measured by ImageJ version 1.44p. The sizes of nuclei and micronuclei are not significantly different at the 5 % level by t test. The bars show confidence intervals at the 5 % level.

Micronuclei are formed by multiple ways in hexaploide hybrids

To investigate to what degree entire chromosome(s)/arms or chromosome fragments are micronucleated, we additionally included an Arabidopsis-type telomere probe. Analyzing 19 micronuclei, four different categories could be discriminated: (i) CENH3, centromere, and telomere positive (seven; 36.8 %, Fig. 5(A)); (ii) CENH3 negative, centromere, and

telomere positive (two; 10.5 %, Fig. 5(B)); (iii) CENH3 and telomere negative and centromere positive (six; 31.6 %, Fig. 5(C)); and (iv) CENH3, centromere, and telomere negative (four; 21.1 %, Fig. 5(D)) (Fig. 5, Table 3). Hence, beside micronuclei containing complete chromosomes, micronucleus-harboring centric or acentric chromosome fragments occur, which are likely formed by fragmentation.

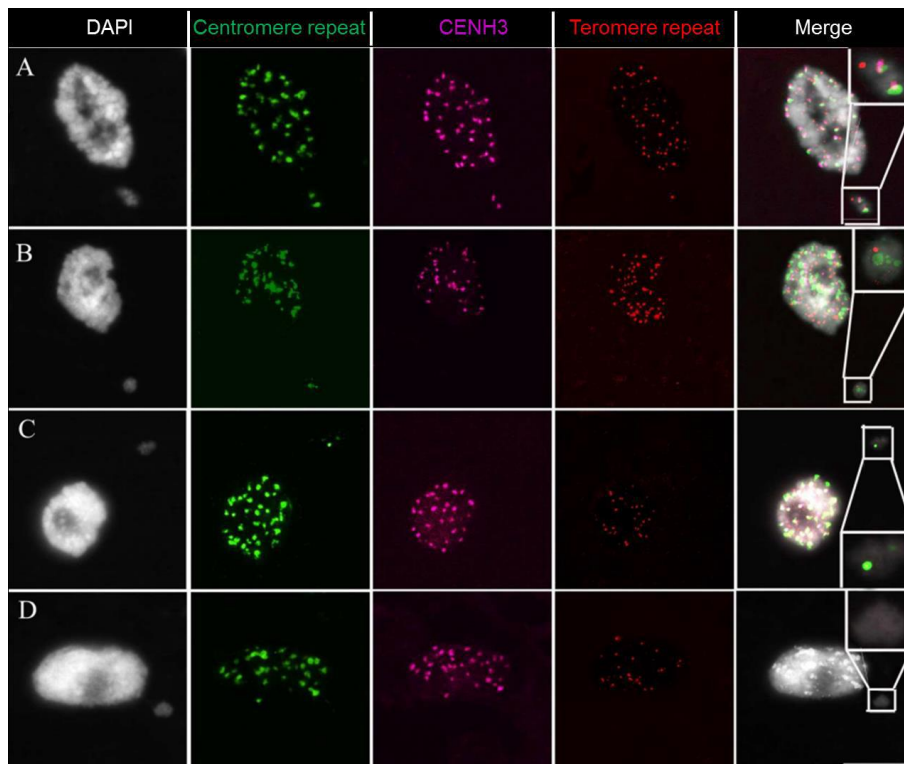


Fig. 5 Immuno-FISH with CENH3- and centromere- and telomere-specific probes in micronuclei of hexaploid hybrid of Napier grass and pearl millet. A Micronuclei with centromere, CENH3, and telomere signals. B Micronuclei with centromere and telomere signals and without CENH3 signals. C Micronuclei with centromere signals and without CENH3 and telomere signals. D Micronuclei without centromere, CENH3, and telomere signals. Bar=10 μ m

Table 3 Analysis of micronuclei with immuno-FISH using CENH3 and centromere and telomere probes in five individual hexaploide hybrid, triploid hybrid, and parental lines.

Lines	No. of analysed micronuclei	With centromeres			Without centromeres
		CENH3 + tel +	CENH3 – tel +	CENH3 – tel -	
6x-1	4	1	0	0	3
6x-2	3	0	0	3	0
6x-3	5	3	0	1	1
6x-4	1	0	1	0	0
6x-5	6	3	1	2	0
Total (%)	19	7 (36.8)	2 (10.5)	6 (31.6)	4 (21.1)
NG	1	0	0	1	0
PM	1	0	0	1	0
Total (%)	2	0	0	2 (100.0)	0
3x (%)	2	0	1(50.0)	0	1 (50.0)

+: signal detected in micronuclei, -: signal not detected in micronuclei
tel telomere

Chromosome fragments are the results of DNA double-strand breaks (van Gent et al. 2001). Therefore, we performed a comet assay to test whether the level of DNA damage differs between the parental species and their corresponding hybrids. The level of DNA damage in all hybrids (triploid and hexaploid hybrids) was found to be significantly higher (at the 5 % level) than in Napier grass and pearl millet, as comet tails classified as score 1 or 2 (according to Grazeffe et al. 2008), indicating 5 to 85 % DNA damage, were more frequent (Fig. 6, Table 4). However, at the cytological level, genome instabilities were found only in the hexaploide hybrids in this work.

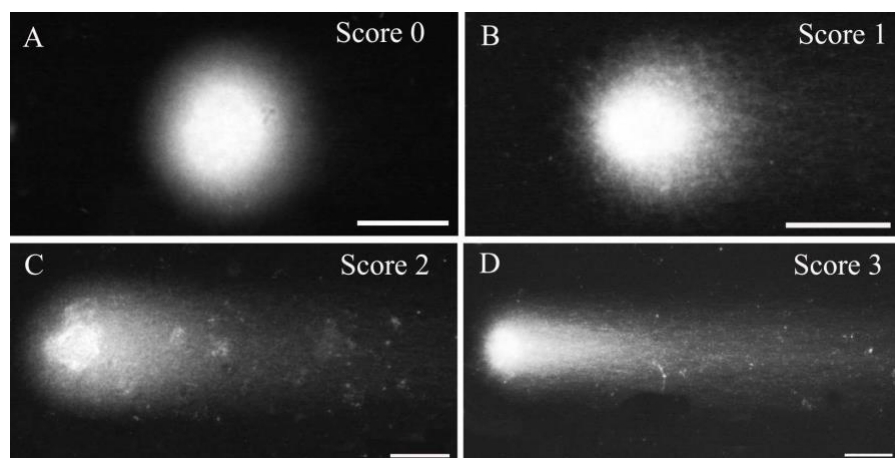


Fig. 6 Representative nuclei of comet assay in hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet. A Comet score 0. B Comet score 1. C Comet score 2. D Comet score 3. Bars=20 μ m

Table 4 Observed damage in nuclei of hexaploid hybrids (6x-1 and 6x-3), triploid hybrid (3x), Napier grass (NG) and pearl millet (PM).

Lines	Scores				% damaged nuclei	AU
	0	1	2	3		
PM	69.83 \pm 8.92	30.00 \pm 9.06	0.17 \pm 0.50	0.00 \pm 0.00	30.17	30.34
NG	62.17 \pm 2.75	37.17 \pm 2.06	0.67 \pm 0.82	0.00 \pm 0.00	37.84	38.51
3x	18.50 \pm 3.20	66.67 \pm 9.38	13.83 \pm 7.50	1.00 \pm 1.29	81.50 ^a	81.50 ^a
6x-1	31.33 \pm 13.74	60.83 \pm 10.87	7.83 \pm 3.86	0.00 \pm 0.00	68.86 ^a	68.66 ^a
6x-3	44.83 \pm 5.44	53.67 \pm 3.70	1.50 \pm 2.22	0.00 \pm 0.00	55.17 ^a	55.17 ^a

Means followed by the standard deviation.

AU: arbitrary units, where 0 = 0% damage and 300 = 100% damage.

^a The values differ significantly of Napier grass and pearl millet at 5%.

Discussion

We detected mixoploidy in root tips of hexaploid hybrids between Napier grass and pearl millet, while parentes and the triploid hybrid showed stable chromosome numbers confirming previous reports (Barbosa et al. 2003,

2007; Abreu et al. 2006; Andrade-Vieira et al. 2013). In contrast to the process of uniparental chromosome elimination observed in unstable young hybrid embryos shortly after the pollination (Gernand et al. 2005; Ishii et al. 2010; Sanei et al. 2011), instability in hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet counts revealed variable chromosome numbers in root meristems. These results suggest that errors during cell division in hexaploid hybrids occur more frequently in meristematic tissues and result then in chromosome instabilities.

Tissue type-dependent chromosome elimination is also found in hybrids between *H. vulgare* x *H. bulbosum*. Leaf meristems close to the spike primordial showed a lower rate of chromosome elimination than spike primordial. It was assumed that this process is due to disturbances of the nuclear division such as noncongressed chromosome at metaphase or lagging chromosomes at anaphase resulting in chromosomal fragments and micronuclei (Bennett et al. 1976; Noda and Kasha 1981). Finch (1983) described a tissue-specific elimination of parental genomes in embryos and endosperm of crosses between different *Hordeum* species. In that case, eliminated chromosomes displayed smaller centromeres and tended to occupy more peripheral regions of congressed chromosomes at metaphase. Ishii et al. (2013) observed translocated chromosomes of oat-pearl millet or pearl millet-pearl millet in endosperm of oat x pearl millet hybrids. On the other hand, hybrid embryos of oat x pearl millet do not have any translocated chromosome, suggesting that genome instability occurs in specific tissue types.

In the present study, we found that the observed micronuclei are composed of entire chromosomes as well as chromosomal fragments. The identification of micronuclei with several centromeric signals suggests that several chromosomes or fragments are micronucleated at once as demonstrated for unstable wheat x pearl millet hybrid embryos (Gernand et al. 2005; Ishii et

al. 2010). Centromere inactivation is one of the possible reasons for these instabilities as 10.5 % of micronuclei revealed no CENH3 signal despite possessing centromeric DNA. Similarly for unstable hybrids between *H. vulgare* x *H. bulbosum*, it was reported that the elimination of *H. bulbosum* chromosomes is due to the inactivity of centromeres as a consequence of CENH3 loss and micronuclei formation (Sanei et al. 2011). Comparably, Marques de Resende et al. (2015) found in other hexaploide hybrids of Napier grass and pearl millet lagging chromosomes and fragments without anti-histone H3S10ph-specific signals, a cell cycle-dependent posttranslational modification shown to be a mark for active centromeres (Houben et al. 2007b). However, it is also possible that some of the centromeres lost activity during or after micronucleation.

Beside micronuclei without CENH3, we observed micronuclei with CENH3 signals of the same intensity like those detected in normal nuclei. Thus, in addition to centromere inactivation, other processes seem to be involved in the observed genome instabilities. Likely, errors during kinetochore attachment and the occurrence of chromosome nondisjunction that prevent the correct separation of the chromatids could explain the presence of micronuclei with signals of CENH3. For instance, in wheat x maize crosses, a malfunction of the kinetochore binding to the spindles is causing a delayed chromosome movement to the poles (Mochida et al. 2004). In unstable wheat x pearl millet hybrid embryos, the cohesin bound to the pearl millet chromosomes may not dissociate normally during cell division, leading to chromosome nondisjunction (Ishii et al. 2010).

In addition, micronuclei without centromeric and telomeric repeats were found to be likely products of chromosome fragmentation events. Such fragments could be caused by an erroneous DNA damage repair mechanism.

Using somatic human-mouse hybrid cells, it was demonstrated that unrepaired DNA damage results in chromosome elimination (Wang et al. 2014). Indeed, our comet assay identified a higher frequency of DNA double-strand breaks in hexaploid hybrids compared to the corresponding triploid hybrid and the parental genomes.

We confirmed that chromosomes of both parental genomes undergo random elimination in hexaploid hybrids. The hexaploid genome combines the genomic content of both parents resulting in a higher dosage of homeologous genes. To counteract this copy number, increased elimination of chromosomes or chromosomal fragments might help the newly polyploidized genome to get stabilized. Similarly, after polyploidization, genomic rearrangements might occur, including exchanges between genomes and gene loss (Levy and Feldman 2004). Furthermore, elimination of sequences is not random. Analysis in polyploid *Arabidopsis* revealed that genes involved in transcription and signal transduction are preferentially retained, while genes involved in DNA repair and genes encoding organellar proteins have been preferentially lost (Blanc and Wolfe 2004). However, we do not have evidence whether the same is true for hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet.

To summarize our findings, we propose in Fig. 7 different mechanisms which could explain the observed chromosome instabilities in hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet. Although centromere dysfunction could be identified as one of the mechanisms explaining the loss of chromosomes in hexaploid hybrids, not all micronuclei could be explained by centromere inactivation alone. Likely, a combination of centromere dysfunction and chromosome fragmentation due to unrepaired DNA double-strand breaks is responsible for the chromosome number variability and the micronuclei formation in hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet.

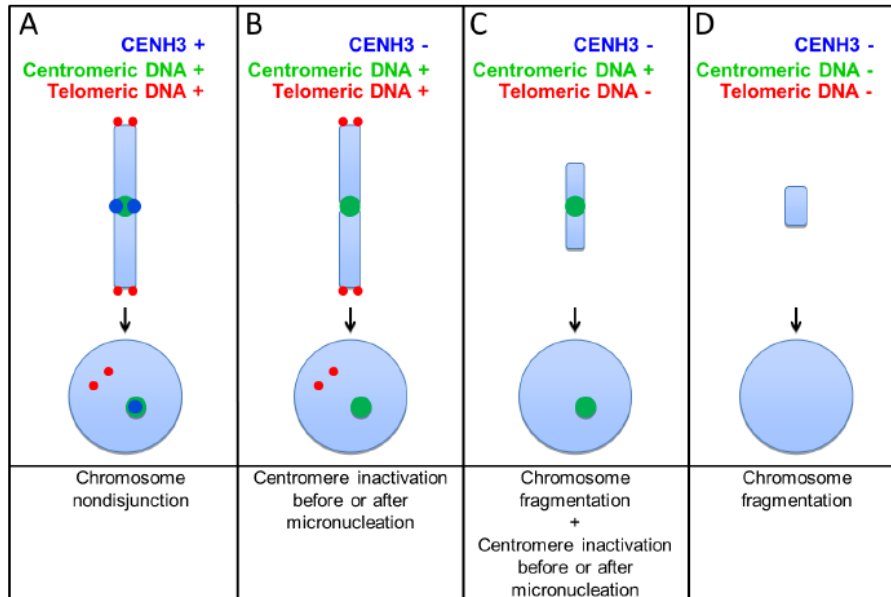


Fig. 7 Proposed mechanisms involved in genome instability acting independently or in combination in hexaploid hybrids of Napier grass and pearl millet root meristem. A Micronuclei formed from chromosomes eliminated due to chromosome nondisjunction at anaphase. B Micronuclei derived from entire chromosomes eliminated due to centromere inactivation. Alternatively, inactivation of centromeres occurred after or during micronucleation. C Micronuclei formation caused by chromosome fragmentation and centromere inactivation after or during micronucleation. D Micronuclei derived from noncentromeric chromosome fragments. Plus sign signals detected in micronuclei, minus sign signals not detected in micronuclei.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and the IPK (Gatersleben) for providing financial support, EMBRAPA (Brazilian Corporation of Agricultural Research) for the plant material and Marcel José Palmieri for statistical analysis.

REFERENCES

- Abreu JC, Davide LC, Vander Pereira A, Barbosa S (2006) Mixoploidy in napiergrass x pearl millet hybrids treated with antimitotic agents. *Pesqui Agropecu Bras* 41: 1629-1635.
- Andrade-Vieira LF, dos Reis GB, Torres GA, Oliveira AR, Brasileiro-Vidal AC, Vander Pereira A, Davide LC (2013) Biparental Chromosome Elimination in Artificial Interspecific Hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Crop Sci* 53: 1917-1924.
- Barbosa S, Davide LC, Pereira AV (2003) Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* Schumack x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. *Ciência e Agrotecnologia* 27(1): 26-35.
- Barbosa S, Davide LC, Pereira AV, Abreu JD (2007). Duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto. *Bragantia* 66(3): 365-372.
- Bennett MD, Finch RA, Barclay IR (1976) The time rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma* 54(2): 175-200.
- Blanc G, Wolfe KH (2004) Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *The Plant Cell* 16(7): 1679-1691.
- Borchert T, Eckardt K, Fuchs J, Kruger K, Hohe A (2009) 'Who's who' in two different flower types of *Calluna vulgaris* (*Ericaceae*): morphological and molecular analyses of flower organ identity. *BMC Plant Biol* 9: 148
- Campos JMS, Davide LC, Salgado CC, Santos FC, Costa PN, Silva PS, Alves CCS, Viccini LF, Pereira AV (2009) In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Plant Breeding* 128: 101-104.
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* 2: 2233-2244.

- Finch RA (1983) Tissue-specific elimination of alternative whole parental genomes in one barley hybrid. *Chromosoma* 88(5): 386-393.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220(4601): 1049-1051.
- van Gent DC, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics* 2(3): 196-206.
- Gernand D, Rutten T, Varshney A, Rubtsova M, Prodanovic S, Bruss C, Kumlehn J, Matzk F, Houben A (2005) Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell* 17: 2431-2438.
- Grazeffe VS, de Freitas Tallarico L, de Sa Pinheiro A, Kawano T, Suzuki MF, Okazaki K, de Braganca Pereira CA, Nakano E. (2008). Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat Res*, 654(1): 58-63.
- Gupta SB, Gupta P (1973) Selective somatic elimination of *Nicotiana glutinosa* chromosomes in the F1 hybrids of *N. suaveolens* and *N. glutinosa*. *Genetics* 73(4): 605-612.
- Houben A, Schroeder-Reiter E, Nagaki K, Nasuda S, Wanner G, Murata M, Endo TR (2007a) CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma*, 116(3): 275-283.
- Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Agueci F, Vlasenko L (2007b) Phosphorylation of histone H3 in plants - a dynamic affair. *Biochim Biophys Acta* 1769(5-6):308-315.
- Ishii T, Ueda T, Tanaka H, Tsujimoto H (2010) Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. *Chromosome Res* 18: 821-831.

- Ishii T, Tanaka H, Eltayeb AE, Tsujimoto H (2013) Wide hybridization between oat and pearl millet belonging to different subfamilies of Poaceae. *Plant Reprod* 26:25-32.
- Ishii T, Sunamura N, Matsumoto A, Eltayeb AE, Tsujimoto H (2015) Preferential recruitment of the maternal centromere-specific histone H3 (CENH3) in oat (*Avena sativa* L.) × pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) hybrid embryos. *Chromosome Res* 23: 709-718.
- Ishii T, Karimi-Ashtiyani R, Houben A (2016) Haploidization via Chromosome Elimination: Means and Mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* (in press).
- Jovtchev G, Menke M, Schubert I (2001) The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. *Mutat Res* 493: 95-100.
- Karimi-Ashtiyani R, Ishii T, Niessen M, Stein N, Heckmann S, Gurushidze M, Banaei-Moghaddam AM, Fuchs J, Schubert V, Koch K, Weiss O, Demidov D, Schmidt K, Kumlehn J, Houben A (2015) Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 11211-11216.
- Kasha KJ, Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874-876.
- Kuppu S, Tan EH, Nguyen, H, Rodgers A, Comai L, Chan SWL, Britt AB (2015) Point Mutations in Centromeric Histone Induce Post-zygotic Incompatibility and Uniparental Inheritance. *Plos Genet* 11: e1005494.
- Laurie DA (1989) The frequency of fertilization in wheat×pearl millet crosses. *Genome* 32:1063-1067.
- Leao FF, Davide LC, de Campos JMS, Vander Pereira A, Bustamante FD (2011) Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. *Pesqui Agropecu Bras* 46: 712-719.
- Leitch AR, Leitch IJ (2008) Perspective - Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320: 481-483.
- Levy AA, Feldman M (2004) Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biol J Linn Soc* 82: 607-613.

- Liu M, Li ZY (2007) Genome doubling and chromosome elimination with fragment recombination leading to the formation of *Brassica rapa*-type plants with genomic alterations in crosses with *Orychophragmus violaceus*. *Genome* 50: 985-993.
- Ma XF, Gustafson JP (2005) Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. *Cytogenet Genome Res* 109: 236-249.
- Maheshwari S, Tan EH, West A, Franklin FCH, Comai L, Chan SWL (2015) Naturally Occurring Differences in CENH3 Affect Chromosome Segregation in Zygotic Mitosis of Hybrids. *Plos Genet* 11: e1004970.
- Marques de Resende KF, Santos FMC, de Paula CP, Techio VH, Davide LC (2015) Effects of hybridization and polyploidy on the histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10ph) in *Pennisetum* spp. Rich. (Poaceae). *Aust J Crop Sci*, 9(5):453-45.
- Martel E, DeNay D, SiljakYakovlev S, Brown S, Sarr A (1997) Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. *J Hered* 88: 139-143.
- Mochida K, Tsujimoto H, Sasakuma T (2004) Confocal analysis of chromosome behavior in wheat x maize zygotes. *Genome* 47: 199-205.
- Noda K, Kasha KJ (1981) Chromosome elimination in different meristematic regions of hybrids between *Hordeum vulgare* L, and *Hordeum bulbosum* L. *Jpn J Genet* 56: 193-204.
- Pereira AV, Ferreira RP, Passos LP, Freitas VP, Verneque RS, Barra RB, Silva CHP (2000) Variação da qualidade de folhas em capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. *Ciênc. e Agrotec.* 24(2): 490-499.
- R Development Core Team (2011) R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ravi M, Chan SWL (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464: 615-U180.

- Reis GB, Mesquita AT, Torres GA, Andrade-Vieira LF, Pereira AV, Davide LC (2014) Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). *Comp Cytogenet* 8: 199-209.
- Riddle NC, Birchler JA (2003) Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends Genet* 19: 597-600.
- Sanei M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A (2011) Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *P Natl Acad Sci* 108: E498-E505.
- Souza-Sobrinho FD, Pereira AV, Ledo FJD, Botrel MA, Oliveira JSE, Xavier DF (2005) Agronomic evaluation of interespecific hybrids of elephant grass and pearl millet. *Pesqui Agropecu Bras* 40: 873-880.
- Tan EH, Henry IM, Ravi M, Bradnam KR, Mandakova T, Marimuthu MPA, Korf I, Lysak MA, Comai L, Chan SWL (2015) Catastrophic chromosomal restructuring during genome elimination in plants. *eLife* 2015;10.7554/eLife.06516.
- Tang ZX, Fu SL, Yan BJ, Zhang HQ, Ren ZL (2012) Unequal chromosome division and inter-genomic translocation occurred in somatic cells of wheat-rye allopolyploid. *J Plant Res* 125: 283-290.
- Tiwari VK, Rawat N, Neelam K, Kumar S, Randhawa GS, Dhaliwal HS (2010) Random chromosome elimination in synthetic Triticum-Aegilops amphiploids leads to development of a stable partial amphiploid with high grain micro- and macronutrient content and powdery mildew resistance. *Genome* 53: 1053-1065.
- Wang Z, Yin H, Lv L, Feng YY, Chen SP, Liang JT, Huang Y, Jiang XH, Jiang HW, Bukhari I, Wu LJ, Cooke HJ, Shi QH (2014) Unrepaired DNA damage facilitates elimination of uniparental chromosomes in interspecific hybrid cells. *Cell Cycle* 13: 1345-1356.

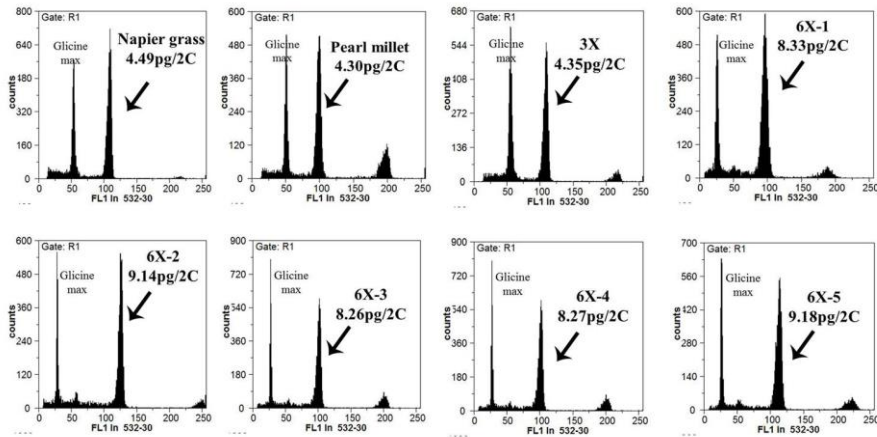


Figure Suppl. 1. Flow cytometry histograms of analysed Napier grass, pearl millet and hexaploid hybrids (6X-1, 6X-2, 6X-3, 6X-4 and 6X-5).

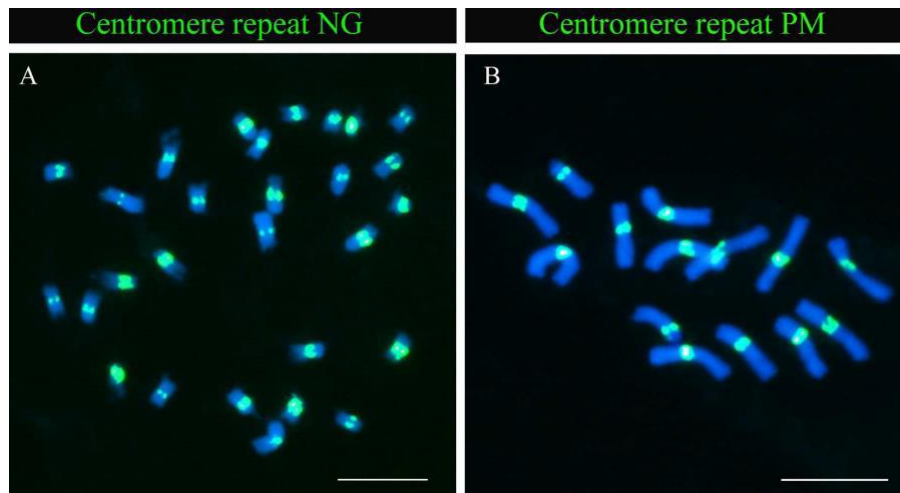


Figure Suppl. 2. Fluorescence *in situ* hybridization with centromere-specific probes. (A) Napier grass (NG). (B) Pearl millet (PM). Bars = 10 μ m.

Suppl. Table 1. Analysis of micronuclei with GISH probed with Napier grass and pearl millet in five individual hexaploid hybrid, triploid hybrid and parental lines.

Lines	No. of analysed micronuclei	Micronuclei with		
		PM	NG	both
6x-1	4	0	1	3
6x-2	3	1	0	2
6x-3	3	1	1	1
6x-4	2	0	0	2
6x-5	2	0	0	2
6x total (%)	14	2 (14.3)	2 (14.3)	10 (71.4)
NG	1	0	1	0
PM	1	1	0	0
3x (%)	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)

NG: Napier grass, PM: pearl millet.

ARTIGO 2

Norma NBR 6022 (ABNT 2003)

Investigation of genomic affinity of *Pennisetum purpureum* and related species

RESUMO

O gênero *Pennisetum* (Poaceae) apresenta de 80 a 140 espécies, sendo que somente as espécies cultivadas milheto (*P. glaucum*, $2n=2x=14$, AA) e capim-elefante (*P. purpureum*, $2n=4x=28$, A'A'BB) têm suas composições genômicas definidas. Ambas são espécies próximas, cujos genomas A e A' apresentam alto nível de homeologia e entre estes e o genoma B a homologia é reduzida. Além disso, os genomas A e A' provavelmente divergiram de um ancestral comum enquanto o doador do genoma B ainda é desconhecido. O objetivo deste trabalho foi utilizar a hibridização *in situ* genômica (GISH) para investigar espécies cujo genoma apresente homologia e/ou homeologia com o genoma B de *P. purpureum*. A partir dos resultados verificou-se que *P. glaucum*, *P. violaceum* e *P. schweinfurthii* apresentam genomas com alto nível de homologia/similaridade, compartilhando o mesmo genoma A. O genoma B está presente em *P. purpureum* e *P. flacidum*, e em um menor grau de homologia em *P. vilosum* e *P. orientale* deve apresentar o genoma A'.

Palavras-chave: *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum*, Hibridização *in situ* genômica, Similaridade genômica.

ABSTRACT

The *Pennisetum* genus presents 80 to 140 species which only the cultivated species pearl millet (*P. glaucum*, $2n=2x=14$, AA) and Napier grass (*P. purpureum*, $2n=4x=28$, A'A'BB) have genomic composition known. Both species are related and A and A' genomes are high level of homeology but between these and B genome the homology is reduced. Moreover, A and A' genomes probably present a common ancestor while the donor of B genome is unknown. The aim of this work was use genomic *in situ* hybridization (GISH) to investigate species whose genome presents homology and/or homeology with the B genome of *P. purpureum*. The results allowed showing that A genome is found in *P. glaucum*, *P. violaceum* and *P. schweinfurthii* with high level of homology and/or similarity. In the same way, B genome is presented in *P. purpureum* and *P. flaccidum* and *P. villosum* in lower level. *P. orientale* may have A' genome.

Keywords: *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum*, Genomic *in situ* hybridization, Genomic similarity.

INTRODUCTION

The genus *Pennisetum* (Richard, 1805) belongs to the family Poaceae, group Paniceae of the subfamily Panicoideae and is closely related to the genera *Cenchrus* and *Setaria* (DAHLGREN; CLIFFORD; YEO, 1985). It comprises about 80-140 species (BRUNKEN, 1977; CHEMISQUY et al., 2010; MARTEL et al., 2004; WIPFF; VELDKAMP, 1999) with chromosome numbers of $x = 5, 7, 8, 9$ or 17 (JAUHAR, 1981; CHEMISQUY et al., 2010), ploidy levels ranging from diploid to octoploid and distributed in tropical and subtropical regions (ROBERT et al., 2011). The species are distributed in five sections (*Penicillaria*, *Brevivalvula*, *Gymnothrix*, *Heterostachya* and *Eu-Pennisetum*) based on morphological characteristics (STAPF; HUBBARD, 1934). Brunken (1977) revised section *Pennisetum* and concluded that *Penicillaria* was a synonym of this type section. Finally, Clayton and Renvoize (1986) recognized only sections *Brevivalvula*, *Dactylophora*, *Heterostachya* and *Pennisetum*. The section *Pennisetum* includes the domesticated crop *Pennisetum glaucum* (pearl millet), which is a very important cereal crop in Africa and India but serves also as fodder in other areas. *Pennisetum purpureum* (Napier grass), is an important food crop and forage. The other species are of multiple purpose uses (forage, pasture grasses, ornamentals, biodiesel) (ROBERT et al., 2011).

Harlan and Wet (1971) proposed a gene pool classification based on the level of reproductive isolation of the pearl millet with its wild relatives. This classification includes three gene pools. The primary gene pool consists of the domesticated form (*P. glaucum* ssp. *glaucum* and *P. glaucum* spp. *monodii*) (diploid, $x = 7$) and the wild annual and weedy forms (*P. violaceum* and *P. mollissimum*). These wild forms cross easily with the cultivated form to produce viable seeds and fertile hybrids (BRUNKEN, 1977). The secondary gene pool

includes the polyploid species *P. purpureum* and *P. squamulatum*. These two species are easily crossable with pearl millet, but the hybrids are highly sterile. All remaining species of *Pennisetum* were in the tertiary gene pool (HARLAN; WET, 1971). Strong reproductive barriers avoid natural gene flow and occurrence of hybrids between the members of the tertiary gene pool and the forms belonging to primary and secondary gene pools (ROBERT et al., 2011).

Among the species of the *Pennisetum* genus, only the cultivated species *P. glaucum* (genome AA) and *P. purpureum* (genomes A'A'BB) have their genomic composition defined. These species are closely related, constituting a monophyletic group with a basic chromosome number of $x = 7$, but different chromosome sizes and recent divergence, corresponding to the morphological section *Pennisetum* (MARTEL et al., 2004). The genomes A and A' are more related, with high level of homeology, and between these and the genome B the affinity/homeology is reduced. Moreover, the donor of B genome is not known (JAUHAR, 1968, 1981; REIS et al., 2014; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, 2006). The regions of homology between A and B genomes are restricted to the centromeric region (REIS et al., 2014), composed by repetitive DNA which is present in the most of species. Phylogenetic relationships presented by Martel et al. (2004) suggested an ancient polyploid origin of *P. glaucum* complex species, followed by a diploidization event after the divergence of *P. purpureum*.

In this study, *Pennisetum* species related with *P. purpureum* were analyzed based on phylogenetic tree of Martel et al. (2004) and on results with tandem repetitive sequences in genus *Pennisetum* presented by Ishii et al. (2013) to provide information to knowledge of the origin of B genome of *P. purpureum*.

MATERIAL AND METHODS

Plant Materials

We included seven species and three plants per specie representing *Pennisetum* genus based in a phylogenetic tree presented in Ishii et al. (2013). The representatives plants are *Pennisetum purpureum* ($2n = 4x = 28$, genomes A'A'BB), *P. glaucum* ($2n = 2x = 14$, genomes AA), *P. schweinfurthii* ($2n = 2x = 14$), *P. orientale* (diploid cytotype, $2n = 2x = 18$), *P. villosum* ($2n = 4x = 36$), *P. flacidum* ($2n = 6x = 54$), *P. violaceum* ($2n = 2x = 14$). *P. purpureum* and *P. glaucum* were provided by the Active Germplasm Bank of Elephant Grass (BAGCE) from EMBRAPA Dairy Cattle (Brazilian Research Institute) and the Napier grass breeding program, experimental station José Henrique Bruschi, municipality of Coronel Pacheco, Minas Gerais State, Brazil. *P. schweinfurthii*, *P. orientale*, *P. villosum*, *P. flacidum* and *P. violaceum* were provided by ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics).

Chromosome preparation

Root tips were treated with 0.025% cyclohexamide for 2 h in darkness at room temperature (RT) and fixed with 3:1 (v/v) ethanol/glacial acetic acid for 5 days at RT. After replacing the fixative by 70% (v/v) ethanol root tips were stored at 4°C until use. Root tips were treated with an enzyme cocktail composed of 1% (w/v) pectolyase (Sigma), 0.7% (w/v) cellulase “ONOZUKA” R-10 (Yakult), 0.7% cellulase (CalBioChem), and 1% cytohellicase (Sigma) dissolved in 0.01 M citrate buffer for 75 min at 37°C in a humid chamber. Afterwards, the root tips were squashed in 45% (v/v) acetic acid, frozen in liquid nitrogen, and then the cover slips were removed and stored in 99.6% alcohol at 4°C until use.

Genomic *in situ* hybridization

For genomic *in situ* hybridization (GISH), genomic DNAs of *P. purpurem* (P. pur), *P. glaucum* (P. gla), *P. schweinfurthii* (P. sch), *P. orientale* (P. ori), and *P. villosum* (P. vil) were labeled with Texas red-12-dUTP (ThermoFisher) by nick translation. Slides were washed twice in 2X saline sodium citrate (SSC) for 5 min each, fixed in 2.5% formaldehyde in 2X SSC for 10 min at RT, washed in 2X SSC three times for 4 min each and dehydrated in an ethanol series (70, 90 and 99.6 %) at RT for 2 min each. The probe was added to the hybridization mix (50% formamide, 20% dextran sulfate in 2X SSC), denatured for 5 min at 75°C followed by 5 min on ice and applied to each slide. Slides were denatured at 80°C for 1 min 30 sec on a hot plate and incubated in a humid chamber at 37°C overnight. Post-hybridization washes were performed in 2X SSC for 20 min at 56°C, followed by dehydration in an ethanol series and counterstaining with DAPI-antifade solution.

Slides were evaluated using an Olympus BX61 fluorescence microscope. Images were captured by means of a cooled CCD ORCA R² camera (Hamamatsu) and processed using the software packages cellSens Dimension (Olympus) and Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, USA).

Hybridization patterns were classified as a score pattern from 1 to 5 in which 1 corresponds to no labeled (0-10%), 2 corresponds to 20-40%, 3 corresponds to 40-60%, 4 corresponds to 60-80% and 5 is completely labeled (80-100%). Signals in centromeres and telomeres were not taking in account once these regions contain repetitive DNA present in the most of species. To similarity criteria are adopted scores above 4.

RESULTS AND DISCUSSION

Previous studies have shown the phylogenetic relationships between species of genus *Pennisetum* using variations in chloroplast DNA (CLEGG; RAWSON; THOMAS, 1984; RENNO et al., 2001), mitochondrial DNA (CHOWDHURY; SMITH, 1988), comparisons of repetitive DNA sequences (INGHAM et al., 1993), internal transcribed spacer (ITS) sequences and cytogenetic data (MARTEL et al., 2004) or a combination of morphological, plastid and nuclear data (CHEMISQUY et al., 2010).

Martel et al. (2004) showed that the basal node of the genus *Pennisetum* in the consensus tree showed the separation of two clades, both containing tertiary gene pool species, with one of them including the primary and secondary gene pool species. These authors hypothesis that the ancestral karyotype had basic number of chromosomes of $x = 9$ and small chromosomes. Derived basic chromosome numbers $x = 5, 7, \text{ or } 8$ appear in more recently diverged clades, indicating that the genome structure in *Pennisetum* might have evolved towards reduction of chromosome number (decreasing dysploidy) and increase of chromosome size. Chemisquy et al. (2010) also showed that the basic chromosome number $x = 9$ was found to be plesiomorphic while $x = 5, 7, 8, 10$ and 17 were derived states. The nuclear phylogenetic analysis revealed a reticulate pattern of relationships among *Pennisetum* and *Cenchrus*, suggesting that there are at least three different genomes within the species. Nevertheless, these studies do not consider the relation between the genomes of species. In this sense, we performed the evaluation of genomic relationships among some species of *Pennisetum* genus by hybridization of genomic probes. The presence of A and B genomes were inferred from the level of labeling of genomic probes of *P. glaucum* and *P. purpureum*, respectively, on related species.

Using GISH analyses, we hybridized all the species with five different probes (*P. pur*, *P. gla*, *P. sch*, *P. ori*, *P. vil*) and compared the results of the

distribution and proportion of the probes in the chromosomes. Probe of *P. orientale* was not completely hybridized in its own genome (Table 1). According with Ali, Lysak e Schubert (2004) GISH often fail to decorate entire chromosomes of plants with very small genomes (<0.6 pg/1 C) and only regions with clustered repetitive DNA sequences such as in pericentromeric heterochromatin blocks present detectable signal. So, we considered as completely labeled chromosome of *P. orientale* with P. ori probe.

Table 1 – Levels of hybridization, based on average of three metaphases, of five different *Pennisetum* genomic probes in chromosomes of seven species showing different combinations of A and B genomes.

Species	Chromosome number	Basic number	DNA content per x (pg)*	Probes				
				P. pur	P. gla	P. sch	P. ori	P. vil
<i>P. purpureum</i>	2n = 4x = 28	x = 7	1.15	5	4	4	4	3
<i>P. glaucum</i>	2n = 2x = 14	x = 7	2.36	4	5	4	3	1
<i>P. schweinfurthii</i>	2n = 2x = 14	x = 7	2.49	1	4	5	3	2
<i>P. orientale</i>	2n = 2x = 18	x = 9	0.94	4	3	3	5	1
<i>P. villosum</i>	2n = 4x = 36	x = 9	0.87	3	1	2	1	5
<i>P. flaccidum</i>	2n = 6x = 54	x = 9	-	4	1	3	1	1
<i>P. violaceum</i>	2n = 2x = 14	x = 7	2.25	1	4	4	4	1

1: 0-10% labelled, 2: 20-40%, 3: 40-60%, 4: 60-80%, 5: 80-100%.

*DNA amounts estimated by flow cytometry for *Pennisetum* species (MARTEL et al., 1997).

Fonte: Do autor (2016).

In *P. purpureum*, the pattern completely labeled (score 5) only happened when we used the genomic probe P. pur (Figure A1). The P. gla probe (A genome) showed a stronger signal (score 4) with the chromosomes (Figure A2) reaffirming the high level of homology between both genomes. Probes of P. sch (Figure A3) and P. ori (Figure A4) also labeled the chromosomes of *P. purpureum*.

P. glaucum chromosomes were completely marked by probe of P. gla (Figure B2). The chromosomes of *P. schweinfurthii* (Figures B3 and C2) and *P. violaceum* (Figure G2) were strongly marked by P. gla probe suggesting these species share the same A genome. This result is consistent with the hypothesis that *P. glaucum* derived from *P. violaceum*, and it is in accordance with a conspecific with its wild relatives (BRUNKEN, 1977; MARTEL et al., 1997). Based on morphological and plastid data, Chemisquy et al. (2010) also showed that *P. glaucum*, *P. schweinfurthii* and *P. violaceum* are related.

P. orientale (Figure D1 and D2) showed strong marks of P. pur (score 4) and P. gla (score 3) probes and may have A' genome, which is found in both *P. purpureum* and in *P. glaucum* in the form of A genome. *P. flaccidum* were strongly labeled only by P. pur probe (Figure F1) suggesting the presence of B genome as one of the genomes present in its constitution.

The proximity of these two species was also reported by Elaimen et al. (2007). The authors showed by EST markers that *P. orientale* and *P. flacidum* are included in one phylogenetic group and revealed genome similarity between them while *P. orientale* and *P. schweinfurthii* showed dissimilarity between their genomes (ELAIMEN et al., 2007).

Finally, *P. villosum* is the most distance between studied species. It was completely label only using the probe of its own genome. As the high level of hibridization of *P. villosum* was with P. pur probe (score 3) and considering the

results of Ingham et al. (1993), we may consider that *P. villosum* has the B genome or a very similar genome to one (Figure E5).

Ingham et al. (1993) compared the average sequences of *P. purpureum* *KpnI* families to other *Pennisetum* species to identify relationships among genomes of the allotetraploid *Pennisetum purpureum* and closely related *Pennisetum* species. After digestion with *KpnI* they found two highly repetitive fragments of 140 bp and 160 bp. 140 bp and the 160 bp *KpnI* families were present in the allotetraploids *P. purpureum* and *P. squamulatum* whereas *P. glaucum* (diploid) contains only the 140 bp *KpnI* family. For the authors, the 140 bp *KpnI* family is probably the A' genome marker while the 160 bp *KpnI* family may be contained within the B genome. The 140 bp *KpnI* repeat was found only in the three related *Pennisetum* species *P. purpureum*, *P. squamulatum*, and *P. glaucum* which are nearly identical suggesting a recent divergence. Other *Pennisetum* species, including *P. villosum*, *P. setaceum*, *P. orientale*, and *P. flaccidum*, also contain a 160 bp *KpnI* Family (INGHAM et al., 1993). These results are in agreement with our findings once we found that probably *P. orientale* should presents A' genome (once it combine signals of *P. gla* and *P. pur*) and *P. flaccidum* and *P. villosum* present the same B genome found in *P. purpureum*.

Figure 1 – Representative metaphases of *Pennisetum* species with different GISH probes. (A) *P. purpureum*. (B) *P. glaucum*. (C) *P. schweinfurthii*. (D) *P. orientale*. (E) *P. villosum*. (F) *P. flacidum*. (G). *P. violaceum*. (A1-G1) *P. pur* probe. (A2-G2) *P. gla* probe. (A3-G3) *P. sch* probe. (A4-G4) *P. ori* probe. (A5-G5) *P. vil* probe. Bar: 20 μ m.

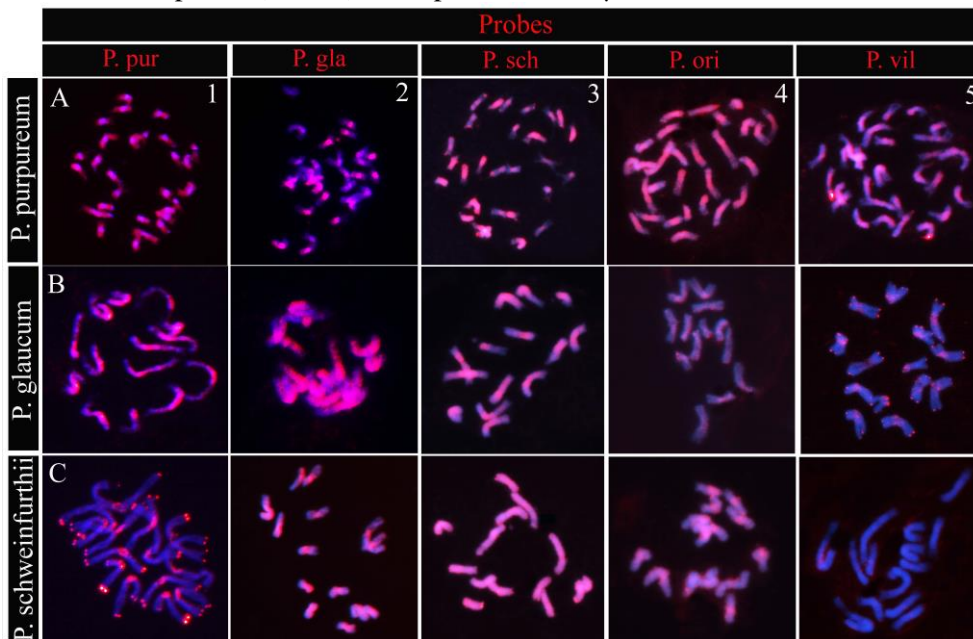
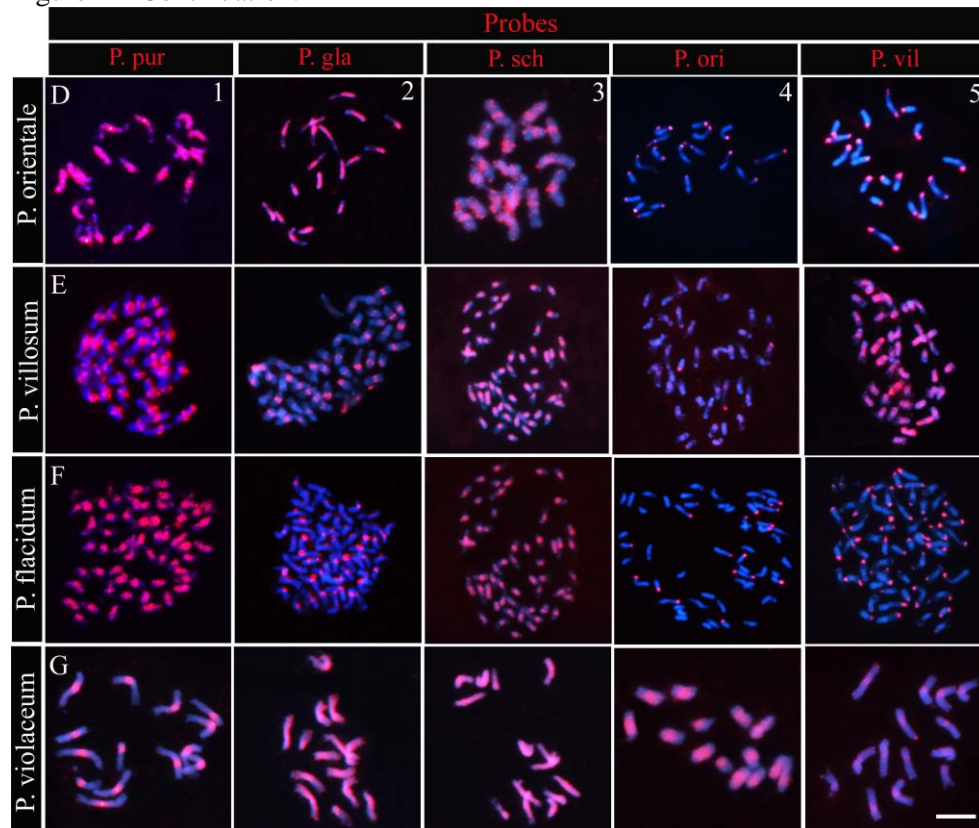


Figure 1 – Continuation.



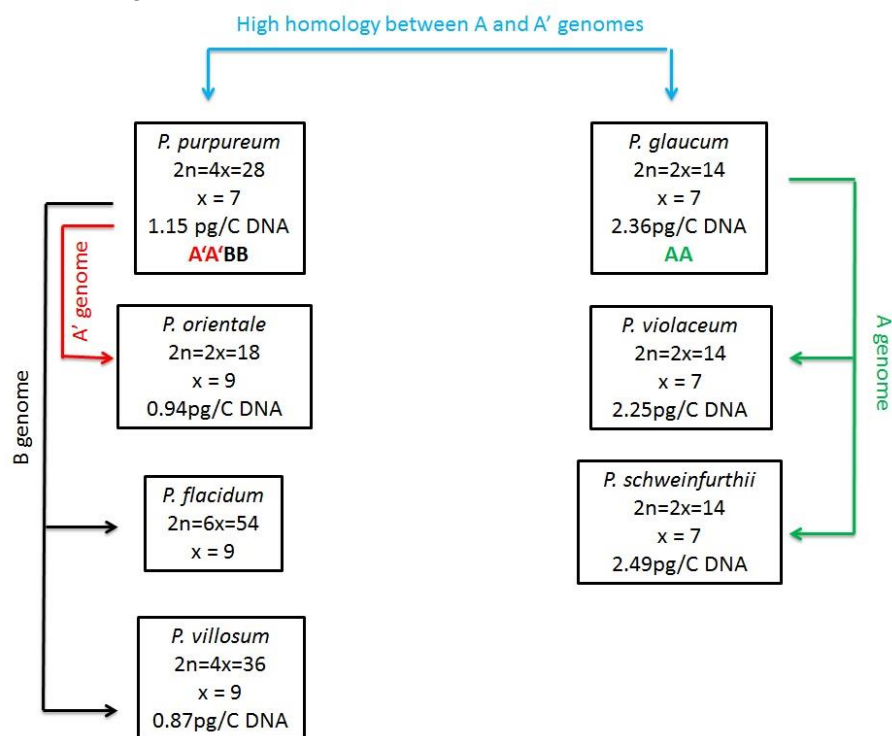
Fonte: Do autor (2016).

Comparisons of the structure of the grass genomes have shown the existence of a large number of genomic rearrangements even in closely related species. Amplification of transposable elements and the polyploidy and segmental duplication followed to the gene losses are normal phenomena in the history of plants, including grasses (BENNETZEN, 2007).

Genomic relationship between *Pennisetum glaucum* and *Pennisetum purpureum* was also studied by Techio, Davide and Pereira (2005). The results showed that the genetic and structural differences between the genomes A and A' are small, but between them and the B genome the differences are larger. Despite this, there is homeology between the genomes A and A' with B, although in a less degree. This proposition is supported by the hybrid origin of Napier grass parent who assembled the genomes A' and B. According to the authors, it is likely that the donor species progenitors of these two genomes had some homology between chromosomes to allow the formation of a stable hybrid as Napier grass.

Based in our findings, we can hypothize that A genome of *P. glaucum* is found in *P. violaceum* and *P. schweinfurthii* with high level of homology and/or similarity. In addition, B genome presented in *P. purpureum* is also found in *P. flacidum* and, in a lower level, in *P. vilosum*. *P. orientale* may have A' genome. These relations are presented in the squematic Figure 2.

Figure 2 – Genomic interrelations between the species of *Pennisetum*. Red arrow shows A' genome, black arrows show B genome, green arrows show A genome and blue arrow show the relationship of A and A' genomes.



Fonte: Do autor (2016).

This study is the first attempt to clarify the origin of B genome. Besides that, studies of genomic relationships provide subsidies for the knowledge about phylogenetic relations and evolution, and are useful in breeding programs seeking gene introgression.

REFERENCES

ALI, H. B. M.; LYSAK, M. A.; SCHUBERT, I. Genomic in situ hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. **Genome**, Canada, v. 47, n. 5, p. 954–960, Oct. 2004.

BENNETZEN, J. L. Patterns in grass genome evolution. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 10, n. 2, p. 176-181, Apr. 2007.

BRUNKEN, J. N. A systematic study of *Pennisetum* sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 64, n. 2, p. 161-176, Feb. 1977.

CHEMISQUY, M. A. et al. Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 107–130, July 2010.

CHOWDHURY, M. K. V.; SMITH, R. L. Mitochondrial DNA variation in pearl millet and related species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, n. 1, p. 25–32, July 1988.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. **Genera Graminum. Grasses of the world**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986. 389 p.

CLEGG, M. T.; RAWSON, J. R. Y.; THOMAS, K. Chloroplast DNA variation in pearl millet and related species. **Genetics**, Austin, v. 106, n. 3, p. 449–461, Mar. 1984.

DAHLGREN R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocotyledons (Structure, evolution and taxonomy)**. New-York: Springer, 1985. 520 p.

ELAIMEN, H. M. M. et al. Evolution of chromosomes in the genus *Pennisetum*. **Chromosome Science**, Tokyo, v. 10, n. 2, p. 55-63, Dec. 2007.

HARLAN, J. R.; WET, J. M. J. de. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, n. 3, p. 509-517, Aug. 1971.

INGHAM, L. D. et al. Origin of the main class of repetitive DNA within selected *Pennisetum* species. **Molecular Genetic Genomics**, Berlin, v. 238, n. 3, p. 350-356, Nov. 1993.

ISHII, T. et al. Evolution of subtelomeric and centromeric repetitive sequences in genus *Pennisetum* (Poaceae). **Chromosome Science**, Matsudo, v. 15, n. 3, p. 53-59, July 2013.

JAUHAR, P. P. Cytogenetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 34, p. 407-479, June 1981.

JAUHAR, P. P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, Netherlands, v. 39, n. 1, p. 360-370, Mar. 1968.

MARTEL, E. et al. Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 249, n. 3/4, p. 139-149, Nov. 2004.

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar. 1997.

REIS, G. B. et al. Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). **Comparative Cytogenetics**, Bulgaria, v. 8, n. 3, p. 31-41, Aug. 2014.

RENNO, J. F. et al. Haplotype variation of cpDNA in the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). **Heredity**, Baltimore, v. 86, n. 5, p. 537–544, May 2001.

ROBERT, T. et al. *Pennisetum*. In: KOLE, C. (Ed.). **Wild crop relatives: genomic and breeding resources, millets and grasses**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 217-255.

STAPF, O.; HUBBARD, C. E. *Pennisetum*. In: PRAIN, D. (Ed.). **Flora of Tropical Africa: part 6**. Ashford: Reeve & Co, 1934. p. 954–1070.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, jan. 2006.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. P. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* and *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 8, n. 1, p. 28-33, Jan. 2005.

WIPFF, J. K.; VELDKAMP, J. F. *Pennisetum advena* sp. nov. (Poaceae: Paniceae): A common ornamental grass throughout the southern United States. **Sida, Contributions to Botany**, Dallas, v. 18, n. 4, p. 1031-1036, Dec. 1999.