



CRISTINA MARIA PINTO DE PAULA

**PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA HISTONA H3
FOSFORILADA NA SERINA 10 DURANTE A
MITOSE E A MEIOSE EM ESPÉCIES DE
*Brachiaria***

LAVRAS – MG

2012

CRISTINA MARIA PINTO DE PAULA

**PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA HISTONA H3 FOSFORILADA NA
SERINA 10 DURANTE A MITOSE E A MEIOSE EM ESPÉCIES DE
*Brachiaria***

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dr^a. Vânia Helena Techio

Coorientador

Dr. Fausto de Souza Sobrinho

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Paula, Cristina Maria Pinto de.

Padrão de distribuição da histona H3 fosforilada na serina 10 durante a mitose e a meiose em espécies de *Brachiaria* / Cristina Maria Pinto de Paula. – Lavras : UFLA, 2012.

57 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Coesão de cromátides irmãs. 2. Fosforilação de histonas. 3. Divisão celular. 4. Epigenética. 5. Imunodeteção. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.9048762

CRISTINA MARIA PINTO DE PAULA

**PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA HISTONA H3 FOSFORILADA NA
SERINA 10 DURANTE A MITOSE E A MEIOSE EM ESPÉCIES DE
*Brachiaria***

Dissertação 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 a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de julho de 2012.

Dr. Fausto de Souza Sobrinho

Embrapa

Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Dr^a. Vânia Helena Techio

Orientadora

LAVRAS – MG

2012

A Deus, que ilumina meus caminhos.

OFEREÇO

Aos meus pais Taninha e Miguel, meus irmãos Leonardo e Raquel pelo amor e apoio incondicional.

Em especial ao Lenilson, pelo amor, incentivo 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 mestrado e estrutura concedida para realização desse trabalho.

À Professora Dra. Vânia Helena Techio, 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, especialmente ao pesquisador Dr. Fausto de Souza Sobrinho, pela orientação, disponibilidade e por ser um grande incentivador para meu ingresso no mestrado.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em especial as professoras Lisete Chamma Davide e Giovana Augusta Torres, pelos ensinamentos e contribuições.

À todos os amigos do laboratório de citogenética pela amizade e pelos ótimos momentos compartilhados.

À Iara, técnica do laboratório, pela amizade e por tornar nosso trabalho possível.

Às amigas Fernandinha, Gaby e Natália, pela amizade, companheirismo, risadas e conhecimentos compartilhados.

À Aline, pela sua contribuição na execução deste trabalho.

Aos meus pais, Taninha e Miguel pela educação, amor e apoio.

Aos meus irmãos mais que queridos, Léo e Raquel, pela amizade, carinho, força e incentivo.

Ao meu namorado Lenilson, pelo amor, carinho, companhia e apoio constante nos momentos difíceis.

Às amigas de Juiz de Fora Selda e Poliana pela amizade sincera, apoio e carinho.

À amiga Cristiane do laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite, essa pessoa maravilhosa que tanto me ajudou, obrigada pela amizade, disponibilidade e atenção.

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

“A possibilidade de realizar um sonho
é o que faz a vida ser interessante.”

Paulo Coelho

RESUMO

As histonas são as principais proteínas associadas ao DNA dos eucariotos. Modificações pós-traducionais na cauda N-terminal das histonas que compõem os nucleossomos geralmente estão associadas com funções biológicas distintas. Entre as várias modificações, destaca-se a fosforilação da histona H3 na serina 10 (H3S10f), provavelmente envolvida na condensação cromossômica e/ou coesão de cromátides irmãs. Apesar de as histonas serem altamente conservadas, tem sido demonstrado que o papel e a distribuição da H3S10f pode diferir entre as espécies. Neste trabalho, o padrão de fosforilação da H3S10 foi avaliado por meio da técnica de imunodeteção, durante a mitose e a meiose em genótipos diploides e tetraploides de *Brachiaria* spp. Os resultados revelaram diferenças na distribuição cromossômica da H3S10f quando comparadas a mitose e a meiose. Durante a meiose I, cromossomos inteiros foram fosforilados, já na meiose II, assim como na mitose, a fosforilação foi restrita à região pericentromérica. Não houve variação no padrão de fosforilação entre genótipos diploides e tetraploides. Com base na coordenação espaço-temporal nas espécies de *Brachiaria* avaliadas a H3S10f está relacionada com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs durante as divisões celulares.

Palavra-chave: Coesão de cromátides irmãs. Divisão celular. Epigenética. Fosforilação de histonas. Imunodeteção.

ABSTRACT

Histones are the main proteins associated with eukaryotic DNA. Post-translational modifications of the histone N-terminal tail comprising the nucleosomes are often associated with distinct biological functions. Among the many changes, it is histone H3 phosphorylation at serine 10 (H3S10f), likely involved in chromosome condensation and/or sister chromatid cohesion. Despite high conservation of histones, it has been shown that the role and distribution of H3S10f may differ between species. In this study, the H3S10 phosphorylation pattern was evaluated by immunodetection technique during mitosis and meiosis in diploid and tetraploid genotypes of *Brachiaria* spp. Results revealed differences in chromosome distribution of H3S10f when comparing mitosis and meiosis. During meiosis I, all chromosomes were phosphorylated, while in meiosis II, as well as in mitosis, phosphorylation was restricted to the pericentromeric region. There was no difference in phosphorylation pattern between diploid and tetraploid genotypes. Spatio-temporal dynamics of H3S10f in *Brachiaria* species evaluated indicates that this modified histone is related to maintenance of cohesion between sister chromatids during cell division.

Keywords: Cell division. Epigenetics. Histone phosphorylation. Immunodetection. Sister chromatid cohesion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Estrutura geral da cromatina.....	14
2.2 Importância das modificações pós-traducionais das histonas.....	19
2.3 Fosforilação da histona H3 na serina 10 durante as divisões celulares.....	21
2.4 O gênero <i>Brachiaria</i> (Trinius) Grisebach: aspectos taxonômicos e citogenéticos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Local	29
3.2 Material vegetal	29
3.3 Obtenção das células mitóticas.....	29
3.4 Obtenção das células meióticas	30
3.5 Imunodeteção	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em eucariotos, a cromatina é organizada em unidades básicas, denominados nucleossomos, que consistem em um centro proteico formado por um octâmero, constituído por duas moléculas das histonas H2A, H2B, H3 e H4, no qual o DNA enrola-se em voltas com aproximadamente 147 pares de bases (pb) de comprimento. Cada uma das histonas que compõem o octâmero nucleossomal possui uma cadeia de aminoácidos terminais, denominada cauda N-terminal, a qual está sujeita a diversas modificações pós-traducionais (JIN et al., 2008; KOUZARIDES, 2007).

Essas modificações desempenham um papel fundamental na maioria dos processos biológicos que estão envolvidos na expressão do DNA, tais como o controle epigenético que regula a ativação gênica e as modificações da cromatina durante os ciclos celulares (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Há pelo menos oito diferentes tipos de alterações encontradas em histonas, dentre as quais destacam-se as acetilações, as metilações e as fosforilações, que são as mais estudadas (CHEN et al., 2010; KOUZARIDES, 2007). A fosforilação é uma alteração que pode ter consequências importantes para a compactação da cromatina, através da mudança de carga da histona (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011) e tem sido associada à condensação e segregação cromossômica, transcrição e reparo de danos ao DNA e ativação da apoptose (HOUBEN et al., 2007).

Entre as fosforilações, destaca-se a do resíduo da serina 10 na histona H3 (H3S10f). Embora a sua função durante as divisões celulares em plantas ainda não esteja bem determinada, as hipóteses levantadas apontam para um papel na condensação cromossômica e/ou na manutenção da coesão entre cromátides irmãs (HOUBEN et al., 2007; JOHANSEN; JOHANSEN, 2006;).

Apesar das histonas e algumas de suas modificações serem altamente conservadas, estudos demonstram que a distribuição espaço-temporal da H3S10f pode diferir durante o ciclo celular entre as espécies estudadas (HANS; DIMITROV, 2001). Em protozoários, nematoides, insetos e mamíferos foi demonstrado que a fosforilação da H3 na serina 10 é distribuída homogeneamente nos cromossomos inteiros durante a mitose e a meiose (HENDZEL et al., 1997). Em leveduras, a fosforilação da serina 10 na H3 não é necessária para a progressão do ciclo celular (HSU et al., 2000). Em trigo e centeio os níveis de fosforilação são altos na região pericentromérica durante a mitose e diferem entre a primeira e segunda divisão meiótica. Durante a primeira divisão meiótica, cromossomos inteiros são fosforilados, enquanto que na segunda divisão a marcação se limita a região pericentromérica (MANZANERO et al., 2000).

Em cromossomos mitóticos de plantas, a distribuição da H3S10f está associada à região pericentromérica (HOUBEN et al., 2007). Em raízes de *Secale cereale* e *Hordeum vulgare* a fosforilação é ausente na intérfase e os sinais aparecem no início da prófase, atingindo um máximo de marcação na região pericentromérica na pró-metáfase e metáfase (HOUBEN et al., 1999).

A avaliação do padrão de distribuição da histona H3S10f durante a meiose e a mitose em espécies de *Brachiaria* e, conseqüentemente, a determinação de sua função durante as divisões celulares é importante, uma vez que não se encontrou na literatura estudos com imunodeteção nestas espécies, as quais são cultivadas em mais de 80 milhões de hectares no Brasil (PEREIRA et al., 2005). O estudo com espécies que apresentam diferentes níveis de ploidia também é relevante, para observar se existem variações decorrentes da poliploidização.

Os conhecimentos sobre as funções específicas das modificações de histonas em plantas, especialmente em gramíneas, ainda são insuficientes para elucidação das questões divergentes que persistem com relação à fosforilação da histona H3 na serina 10. Além disso, a maioria dos estudos que envolvem as modificações das histonas estão relacionados à microorganismos (AHN et al., 2005; HSU et al., 2000; WEI et al., 1998) e animais (HANSON et al., 2005; HENDZEL et al., 1997; HOOSER et al., 1998). Essas informações são importantes para elucidar processos moleculares envolvidos na modelagem da cromatina. Desta forma, a imunodeteção representa uma ferramenta eficiente para análises em biologia celular e molecular. Por meio da técnica de imunodeteção, é possível analisar modificações pós-traducionais nas proteínas ligadas a cromatina e como sua atividade é coordenada durante o ciclo celular, através da utilização de anticorpos específicos para determinadas proteínas, tais como para a histona H3S10f.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o padrão de distribuição da histona H3 fosforilada na serina 10 durante a mitose e a meiose em *Brachiaria ruziziensis*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, a fim de investigar se a dinâmica da fosforilação da histona H3 na serina 10 está relacionada com a condensação cromossômica e/ou coesão de cromátides irmãs.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estrutura geral da cromatina

Em eucariotos, o DNA nuclear está associado com histonas e outras proteínas em uma complexa estrutura denominada cromatina. O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, que consiste em um centro proteico no qual o DNA enrola-se em, aproximadamente, 1,7 voltas com aproximadamente 147 pares de bases (Pb). O centro proteico é composto por um octâmero das quatro principais histonas (H3, H4, H2A, H2B), sendo que as histonas H2A e H2B formam dois dímeros e as histonas H3 e H4 formam um tetrâmero (JIN et al., 2008; KOUZARIDES, 2007).

Dois tipos de fibra de cromatina podem ser encontradas: a fibra de 10 nm de diâmetro, que é uma cadeia flexível com aspecto de “colar de contas”, onde cada esfera corresponde a um nucleossomo e a fibra de 30 nm, em que os nucleossomos são dobrados em um arranjo solenóide com, aproximadamente, seis nucleossomos por volta. Tal conformação é facilitada pela histona H1 situada imediatamente adjacente ao nucleossomo (LEWIN, 2004). O solenóide dobra-se sobre si próprio formando alças sobre um esqueleto central proteico (escafóide), gerando os cromômeros (300 nm). O fio formado pelo conjunto de cromômeros sofre pelo menos duas espiralizações sucessivas para formar o cromossomo metafásico com 1400 nm (GUERRA, 1988; LEWIN, 2004).

Com relação à cromatina, o genoma dos eucariotos é organizado em duas regiões distintas, a eucromatina e a heterocromatina, que são citologicamente caracterizadas por diferentes graus de compactação da cromatina e estão relacionadas com o controle da expressão gênica e

comportamento dos cromossomos durante a divisão celular (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; FUCHS et al. 2006;).

A heterocromatina, termo proposto por Heitz (1928), descreve as regiões cromossômicas que permanecem condensadas durante todo o ciclo celular. Pode ser dividida em heterocromatina facultativa e a constitutiva. A heterocromatina facultativa ocorre em apenas um dos cromossomos do par, e é ativo em apenas um curto período de tempo do ciclo de vida, mantendo-se epigeneticamente reprimido e heterocromático o restante da vida do indivíduo, como por exemplo o cromossomo X inativo das fêmeas de mamíferos. A heterocromatina constitutiva ocorre no par de cromossomos homólogos e normalmente é transcricionalmente inativa. É constituída por sequências de DNA altamente repetitivas, contém poucos genes e é encontrada em centrômeros e telômeros. A eucromatina, em contraste com a heterocromatina, é uma região bastante descondensada com genes ativos e que alterna regiões com maior e menor densidade de genes. Algumas regiões da eucromatina são enriquecidas com determinadas modificações de histonas, enquanto outras regiões parecem relativamente desprovidas de modificações. Em geral, essas modificações ocorrem em “ilhas”, que tendem a ser regiões que regulam a transcrição ou são os locais de transcrição ativa. (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; SUMNER, 2003).

O remodelamento da cromatina pode impedir ou facilitar a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios, promovendo o silenciamento ou a ativação gênica. Este modo de regulação gênica conhecido como regulação epigenética refere-se principalmente às alterações hereditárias que não estão associadas à sequência de DNA, mas podem ser confiavelmente herdadas de uma geração para a próxima (FUCHS et al., 2006; LEWIN, 2004). Existem vários mecanismos epigenéticos de herança, como a metilação do DNA, modificações

de histonas, RNA de interferência (siRNA), paramutação, arranjo de nucleossomos, e outros (CHEN et al., 2010).

Uma característica marcante das histonas e, em particular, de sua cadeia de aminoácidos terminais, denominada "cauda" N-terminal, é o grande número e tipo de modificações pós-traducionais (PTMs) que apresentam. Modificações pós-traducionais podem também ocorrer no núcleo das histonas, no entanto, devido à restrição estrutural da molécula ocorrem em menor frequência (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Há pelo menos oito diferentes tipos de alterações encontradas em histonas, tais como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, deiminação e isomerização de prolina, que geralmente estão associadas com funções distintas (CHEN et al., 2010; KOUZARIDES, 2007) (Figura 1). Assim, em muitos aspectos, as caudas das histonas podem ser consideradas como superfícies complexas de interações proteína-proteína, que são reguladas por diversas modificações pós-traducionais (HOUBEN et al., 2007). As modificações das histonas são os principais fatores determinantes do controle epigenético que regula a ativação gênica e as modificações da cromatina durante os ciclos celulares.

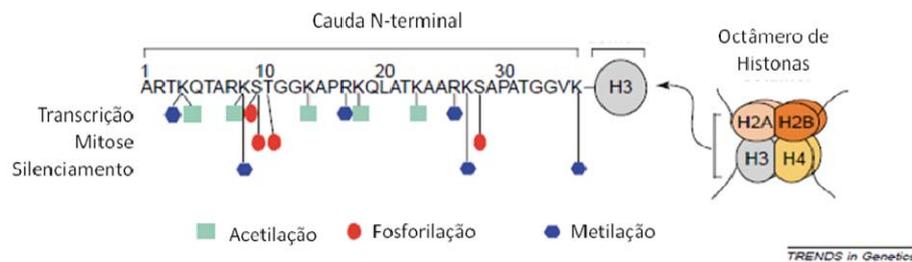


Figura 1 Modificações na cauda N-terminal da histona H3. Os locais das modificações covalentes, acetilação, fosforilação e metilação, são indicados. Os processos celulares associados são indicados à esquerda de cada conjunto de modificações.
 Fonte adaptado de Nowak; Corces (2004).

Durante o ciclo celular, a cromatina passa por intensos rearranjos estruturais e espaciais, tais modificações estão associadas às principais funções das células: replicação do genoma, transcrição e condensação cromossômica (BRADBURY, 1992). Na intérfase, quando as células não estão se dividindo a cromatina encontra-se dispersa no núcleo. Na divisão celular, ocorre um processo de compactação dando origem aos cromossomos (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011).

A adequada condensação cromossômica é essencial para a correta segregação durante a mitose e meiose. Além da modificação de histonas, outras proteínas não histonas também estão envolvidas no processo de condensação dos cromossomos, a topoisomerase II, o complexo condensina e a coesina (MOSER; SWEDLOW, 2011).

A mitose é um processo contínuo dividido em quatro fases. A prófase é marcada pelo início da condensação progressiva dos cromossomos, na metáfase os cromossomos estão no equador da célula e atingem a sua máxima condensação, que permanece durante a anáfase. Já na telófase, após atingirem o

pólo da célula, ocorre uma gradual descondensação dos cromossomos (GRIFFITHS et al., 2008; MOSER; SWEDLOW, 2011).

Durante a meiose a condensação dos cromossomos ocorre gradualmente durante a prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese). Na diacinese, os bivalentes atingem a condensação máxima desta subfase. Na metáfase e anáfase I, os cromossomos mantêm o grau de condensação. Na telófase I, após atingirem o pólo da célula, os cromossomos desespiralizam-se. Na meiose II os cromossomos seguem o padrão de condensação da mitose (GRIFFITHS et al., 2008; RONCERET et al., 2007).

A precisão na segregação cromossômica requer uma série de eventos moleculares. O principal deles é a deposição e remoção das coesinas, um complexo proteico formado por quatro subunidades, responsável pela coesão entre cromátides irmãs durante a mitose e a meiose (LEE; ORR-WEAVER, 2001). O complexo coesina é composto por duas proteínas da família SMC (proteínas de manutenção estrutural do cromossomo): SMC1 e SMC3, e duas proteínas da família SCC (proteínas de coesão de cromátides irmãs): SCC1 e SCC3 (NASMYTH; HAERING, 2009).

A coesão entre as cromátides irmãs é essencial não somente para manter os cinetócoros em sua correta orientação, como também para criar a tensão necessária para estabilizar a conexão entre as mesmas (NASMYTH; HAERING, 2009).

A dissolução da coesão ocorre em duas fases. A primeira se inicia durante a prófase, onde as coesinas dos braços dos cromossomos são clivadas, diminuindo sua afinidade pelo DNA e as encontradas nos centrômeros permanecem intactas. Durante a segunda fase, pouco antes do início da anáfase as coesinas restantes (predominantes no centrômero, mas também nos braços

cromossômicos) se dissociam devido à clivagem da separase, permitindo a disjunção das cromátides (PAULI et al., 2008).

2.2 Importância das modificações pós-traducionais das histonas

As modificações pós-traducionais ou a combinação de modificações, implicam em diferentes efeitos na estrutura e função da cromatina e são correlacionadas com funções biológicas particulares, tais como a ativação ou silenciamento gênico (JIN et al., 2008). Este modo de regulação gênica tem sido referido como “regulação epigenética” que denota um estado herdável da estrutura da cromatina, não associado à sequência do DNA. Apesar de reversível, uma vez que a estrutura da cromatina é estabelecida por essas modificações, esta pode persistir através das divisões celulares e ser conservada ao longo das gerações (FUCHS et al., 2006).

As modificações pós-traducionais das histonas (HPTMs) exercem seus efeitos na cromatina através de três principais mecanismos. O primeiro envolve a modificação de forma direta, influenciando na estrutura geral da cromatina, por modificações covalentes, evitando contatos que facilitam certas conformações da cromatina, tais como acetilação ou fosforilação. O segundo e o terceiro envolvem alteração na regulação da ligação das moléculas efetoras, onde uma HPTM pode inibir a ligação de proteínas que se associam com a cromatina ou com a histona, ou pode fornecer superfície de ligação alterada que atraem certas proteínas efetoras (ALLIS et al., 2007; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

O efeito de cada modificação (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, deiminação e isomerização de prolina) depende do aminoácido modificado, da sua posição na cadeia de

polipeptídeo e da presença de outras modificações na histona (FUCHS et al., 2006). A variedade das modificações e o elevado número de resíduos de aminoácidos que podem ser modificados nas histonas (mais de 60 resíduos diferentes) fornecem um “código de histonas”, uma vez que a correlação dessas alterações e suas combinações de modificações determinam funções específicas (KOUZARIDES, 2007). Assim, qualquer alteração na carga da histona terá, sem dúvidas, consequência estrutural para a arquitetura da cromatina.

A acetilação da lisina, catalisada por proteínas histona acetiltransferases (HAT), é uma modificação que tem potencial para desdobrar a cromatina, uma vez que neutraliza a carga positiva do aminoácido, eliminando sua interação com o grupo fosfato do DNA, resultando em uma estrutura da cromatina menos condensada facilitando o acesso de fatores regulatórios ao DNA. (FUCHS et al., 2006; KOUZARIDES, 2007).

A metilação das histonas é catalisada pelas metiltransferases, ocorre principalmente sobre as cadeias laterais da lisina e arginina, não altera a carga da histona e geralmente está associada com a inatividade transcricional da cromatina, embora também possa estar correlacionada com sítios transcricionalmente ativos no DNA. As lisinas podem ser mono, di ou trimetiladas, enquanto a arginina pode ser mono-metilada simetricamente ou dimetilada assimetricamente (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; FUCHS et al., 2006).

A fosforilação é outra alteração que pode também ter consequências importantes para a compactação da cromatina, através da mudança de carga da histona (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Os níveis desta modificação são controlados por Kinases e fosfatases que adicionam e removem a modificação respectivamente (ITO, 2007). As Kinases transferem o grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxila da cadeia de aminoácidos alvo. Deste modo, esta

modificação adiciona carga negativa a histona e, conseqüentemente, influencia na estrutura da cromatina (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

Fosforilação de histonas tem sido associada à condensação e à segregação cromossômica, transcrição e reparo de danos ao DNA e ativação da apoptose. Desta forma, a fosforilação da histona H3 está envolvida em dois processos estruturalmente opostos: ativação transcricional que requer a fibra de cromatina descondensada durante a intérfase, e condensação cromossômica durante a divisão celular (HOUBEN et al., 2007).

A modificação de histonas por fosforilação pode ocorrer em todas as classes das histonas, em resíduos de serina e treonina. Quatro sítios de fosforilação na serina são identificados: Serina 10 e 28 da H3, serina 1 da H4, serina 1 da H2A e serina 14 da H2B (SCHROEDER-REITER et al., 2003). Entre essas modificações, destaca-se a fosforilação do resíduo serina-10 da histona H3 (H3S10f). Embora a sua função durante as divisões celulares em plantas ainda não esteja bem determinada, as hipóteses levantadas apontam para um papel na condensação cromossômica e/ou na manutenção da coesão entre cromátides irmãs.

2.3 Fosforilação da histona H3 na serina 10 durante as divisões celulares

Por meio da técnica de imunodeteção, através da utilização de anticorpos específicos para determinadas proteínas, é possível analisar modificações pós-traducionais que ocorrem nas proteínas associadas à cromatina e como sua atividade de algumas proteínas é coordenada durante o ciclo celular (SEIJO et al., 2010). Após o desenvolvimento e a utilização de um anticorpo policlonal específico para histona H3 fosforilada na serina 10 (HENDZEL et al.,

1997), tornou-se possível estudar sua distribuição e função durante as divisões celulares.

Em eucariontes, a fosforilação da histona H3 na serina 10 (H3S10f) pode estar relacionada com eventos críticos da divisão celular, tais como condensação cromossômica (HENDZEL et al., 1997), coesão entre cromátides irmãs na metáfase I (KASZÁS; CANDE, 2000) e segregação de cromátides irmãs na segunda divisão da meiose (MANZANERO et al., 2000).

Apesar das histonas e algumas das suas modificações serem altamente conservadas, estudos demonstram que a distribuição espaço-temporal da H3S10f pode diferir entre as espécies (HANS; DIMITROV, 2001; HOUBEN et al., 2007). Em mamíferos, o ciclo celular depende da fosforilação da H3 na serina 10 e 28, que se origina na região pericentromérica e se espalha por todo o cromossomo durante a transição de G2 para mitose, provavelmente está relacionado com o início da condensação cromossômica (HOOSER et al., 1998). Em leveduras, a fosforilação da serina 10 na H3 não é necessária para a progressão do ciclo celular, pois a fosforilação da histona H2B substitui a função da fosforilação da H3 (HSU et al., 2000).

A fosforilação da H3 pode ocorrer no início da condensação cromossômica ou em estruturas já fortemente condensadas, em todo comprimento do cromossomo ou apenas na região pericentromérica, além disso, o padrão de fosforilação na mitose pode diferir da meiose em um mesmo organismo. No entanto, a fosforilação da H3 apresenta uma característica comum em ambas às divisões celulares e não diferem nos organismos estudados, os cromossomos são sempre fortemente fosforilados na metáfase e desfosforilados após saírem da mitose ou meiose (HANS; DIMITROV, 2001).

Durante a divisão celular em muitos organismos, tais como células de mamíferos, *Drosophila* e *Arabidopsis*, a cromatina pericentromérica é

fosforilada na histona H3 nos resíduos de serina 10 e 28 (H3S10f e H3S28f) por Aurora Kinases, que são reguladores chave da transição da metáfase para a anáfase e para a liberação das cromátides. Estes eventos de fosforilação são importantes para a condensação cromossômica e em plantas estão fortemente correlacionados com a coesão das cromátides irmãs (TOPP; DAWE, 2006).

Cheung et al. (2000) e Lo et al. (2000) relatam que a fosforilação da H3S10 precede e facilita a acetilação da lisina 14 (K14) durante a ativação transcricional, mas também, conforme Rea et al. (2000), pode afetar negativamente a metilação de K9. Isso caracteriza a via regulatória trans-histona, na qual modificações que ocorrem em uma histona podem afetar outras histonas.

Análises de fosforilação da histona H3 na serina 10 na mitose revelaram que a fosforilação é necessária para iniciar a condensação cromossômica em células de mamíferos e no protozoário *Tetrahymena thermophila*. Nestas espécies, os cromossomos são fosforilados ao longo de todo seu comprimento (HOOSER et al., 1998; WEI et al., 1998).

O padrão mitótico de fosforilação da H3 é diferente em plantas, a distribuição da H3 fosforilada na serina 10 correlaciona-se com a posição da cromatina pericentromérica (HOUBEN et al., 2007). A fosforilação inicia-se no final da prófase quando os cromossomos já estão bastante condensados, fornecendo desta forma, um forte argumento contra a função desta modificação na condensação cromossômica (HANS; DIMITROV, 2001).

Especialmente na meiose, o papel da H3S10f apresenta divergências entre espécies estudadas, quanto ao momento e a região cromossômica em que se inicia a fosforilação. Em *Tetrahymena thermophila*, o modelo temporal de fosforilação da H3 é similar na meiose I e II. Estudos em uma estirpe mutante (S10A) que apresenta meiose anormal permitiu determinar que a condensação

cromossômica meiótica está relacionada com a fosforilação da H3 na serina 10 (WEI et al., 1998). No entanto, esta conclusão não pode ser generalizada.

Distribuição da H3S10f em meiócitos de *Secale cereale* e *Triticum aestivum* diferem entre a primeira e a segunda divisão meiótica. Na primeira divisão, cromossomos inteiros são marcados, enquanto que na segunda divisão a marcação se limita a região pericentromérica. Uma possível suposição é que em células vegetais o padrão de distribuição da H3 fosforilada está mais relacionada com a coesão de cromátides irmãs do que com a condensação cromossômica em ambas as divisões meióticas (MANZANERO et al., 2000).

Estudos em milho indicam que a fosforilação da histona H3 na serina 10 durante a mitose e a meiose ocorre a partir da prófase, após a condensação cromossômica ter iniciado, e parece estar associada com coesão dos cromossomos e não condensação cromossômica (KASZÁS; CANDE, 2000).

2.4 O gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach: aspectos taxonômicos e citogenéticos

O gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach pertencente à tribo Paniceae, reúne cerca de 100 espécies, sendo algumas de grande importância econômica como forrageiras, especialmente nos países tropicais e subtropicais, com grande concentração no continente africano. As plantas desse grupo vegetam *habitats* muito variados, desde várzeas inundáveis até regiões semidesérticas, no entanto a ocorrência mais comum é em vegetação de savana (VALLE et al., 2009).

A primeira descrição do gênero *Brachiaria* foi feita por Trinius, em 1834, que o classificou como uma subdivisão de *Panicum*, e posteriormente, em 1953, foi elevada a categoria de gênero por Grisebach. As principais características que identificam o gênero, dentro da tribo Paniceae, são as

espiguetas ovais a oblongas, arranjadas em racemos unilaterais, com a gluma inferior adjacente à ráquis, em posição adaxial. (PEREIRA et al., 2001).

Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* encontram-se inseridas na subfamília Panicoideae e família Poaceae, entretanto os critérios taxonômicos utilizados, tanto em relação ao gênero quanto as espécies componentes não são ainda bem definidos. Com base em estudos da biologia floral foi sugerida uma nova nomenclatura para algumas espécies, antes formalmente inseridas no gênero *Brachiaria*, incluindo-as no gênero *Urochloa*. Esta nova sistemática tem sido utilizada em trabalhos recentes como forma de sinônimos para algumas espécies do gênero *Brachiaria*, sendo nomeadas *Urochloa brizantha*, *Urochloa decumbens*, *Urochloa dictyoneura*, *Urochloa humidicola* e *Urochloa ruziziensis* (GONZÁLEZ; MORTON, 2005).

As espécies de *Brachiaria* caracterizam-se por apresentar número básico de cromossomos $x = 7, 8$ e 9 , com predominância de $x=9$ (BASAPPA et al., 1987; DARLINGTON; WYLIE, 1955; DUJARDIN 1979; MORRONE; ZULOAGA, 1992; VALLE; SAVIDAN, 1996). Todavia, Risso-Pascotto et al. (2006) relataram a ocorrência de $x = 6$ para acessos de *B. dictyoneura*, os quais apresentaram $2n = 24$, e *B. humidicola*, com $2n=42$. Valle e Savidan (1996) resumiram os dados encontrados na literatura sobre o nível de ploidia de algumas dessas espécies, das quais as mais importantes são: *B. brizantha* ($2n = 2x = 18$; $2n = 4x = 36$; $2n = 5x = 45$ ou $2n = 6x = 54$), *B. decumbens* ($2n = 2x = 18$ ou $2n = 4x = 36$) e *B. ruziziensis* ($2n = 2x = 18$).

O cariótipo de 12 acessos e cinco espécies de *Brachiaria* foram caracterizados por Bernini e Marin-Morales (2001). Os autores relataram variações no número cromossômico em *B. decumbens* ($2n = 18$ e 36) e em *B. humidicola* ($2n = 36, 42$ e 54). *B. jubata* e *B. brizantha* apresentaram $2n = 36$ e *B. ruziziensis*, $2n = 18$. Os cariótipos foram classificados como simétricos com

tendência à assimetria em direção aos poliploides. Além disso, foi sugerido também que alterações estruturais como deleções e adições e, principalmente, poliploidia estão envolvidas na evolução desse gênero.

Esse gênero é caracterizado por uma maioria de espécies poliploides e apomíticas. A apomixia está normalmente associada à poliploidia e essa por sua vez frequentemente resulta em irregularidades meióticas levando a baixa fertilidade do pólen (PEREIRA et al., 2001). A apomixia descrita é do tipo apospórica, e o saco embrionário do tipo *Panicum* com quatro núcleos, enquanto as plantas sexuais apresentam sacos embrionários do tipo *Polygonum* com oito ou mais núcleos (VALLE et al., 1994). Em algumas espécies, como *B. brizantha* e *B. decumbens* foram caracterizadas variedades sexuais diploides e apomíticas tetraploides, apresentando assim, tanto acessos com modo de reprodução apomítico quanto com modo de reprodução sexual (VALLE; SAVIDAN 1996).

Dentre os estudos básicos necessários em programa de melhoramento, como o de *Brachiaria*, a citogenética mostra-se crucial, não apenas para auxiliar na seleção de genitores compatíveis através da determinação do nível de ploidia e a ausência de anormalidades meióticas que comprometam a viabilidade dos gametas, como também, para identificação de problemas de fecundidade e produção de sementes viáveis em híbridos selecionados pelo bom desenvolvimento vegetativo (VALLE et al., 2009).

O uso da técnica de FISH (Fluorescent in situ hybridization) em análise citogenética de *Brachiaria*, permitiu o mapeamento físico de sequências heterólogas de rDNA, associado com a cariotipagem convencional em acessos de *B. brizantha* sexual diploide (BRA 002747) e apomíticos tetraploides (BRA000591), onde evidenciou-se a última sendo de origem alopoliploide. Com base nos resultados e no conhecimento anterior sobre a apomixia em *B.*

brizantha, os autores sugerem que a origem da apomixia foi provavelmente uma consequência da hibridação (NIELEN et al., 2010).

De acordo com Valle e Savidan (1996), plantas naturalmente diploides de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* exibem meiose regular, com a formação de nove bivalentes e modo sexual de reprodução. Já as plantas tetraploides apresentam meiose bastante irregular, com a formação frequente de univalentes e quadrivalentes, e a apomixia como modo de reprodução. A variação observada no número de cromossomos, na quantidade de DNA nuclear, aliada as irregularidades meióticas presentes nos poliploides sugerem que em *Brachiaria* tenha ocorrido a alopoliploidização de genomas distintos ou ocorreu diferentes processos de poliploidização na história evolutiva do gênero, assim como em outras gramíneas.

Três híbridos sexuais interespecíficos de *Brachiaria* resultantes do cruzamento entre *Brachiaria ruziziensis* (genitor feminino) e *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* (genitores do sexo masculino) foram estudados e a análise citogenética mostrou a ocorrência de anormalidades meióticas comum entre eles, tais como segregação cromossômica irregular, devido à poliploidia. Outras anormalidades, como aderências cromossômicas, ausência de citocinese, citocinese irregular, orientação anormal no fuso e a desintegração anormal do nucléolo, também foram encontradas (FUZINATTO et al., 2007).

Utilizando a técnica de citometria de fluxo para avaliação de uma coleção de *Brachiaria* spp. com relação ao conteúdo de DNA nuclear e o nível de ploidia correspondente, Penteadó et al. (2000) detectaram a presença de variação intra e interespecífica na quantidade de DNA e nos níveis de ploidia, além de encontrarem pela primeira vez, a presença de pentaploides naturais no gênero.

O tamanho do genoma de quatro espécies de *Brachiaria* foi estimado por Ishigaki et al. (2010) utilizando a citometria de fluxo. O resultado foi expresso em valor C e diferiu entre as cultivares analisadas, aumentando de acordo com o nível de ploidia. Os maiores valores foram encontrados em poliploides apomíticos (*B. decumbens* tetraploide 1633 Mbp C⁻¹, *B. brizantha* tetraploide 1404 Mbp C⁻¹, *B. brizantha* pentaploide 1743 Mbp C⁻¹ e *B. humidicola* hexaploide 1953 Mbp C⁻¹) já a espécie diploide sexual apresentou menor valor C (*B. ruziziensis* 615 Mbp C⁻¹). Esses resultados demonstram que o tamanho do genoma depende do nível de ploidia e modo de reprodução em *Brachiaria*.

A caracterização do nível de ploidia por meio da citometria de fluxo também foi estimado por Timbó (2010) para *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, que apresentaram quantidade média de DNA igual a 1,74 pg (picogramas), 3,74 pg e 3,52 pg respectivamente.

Não foram encontrados relatos de trabalhos que envolvam modificações pós-traducionais ou imunodeteção para espécies de *Brachiaria*. As informações geradas serão relevantes para serem agregadas a estudos já realizados com outras gramíneas, tais como trigo, centeio e milho (HOUBEN et al., 1999; KASZÁS; CANDE, 2000; MANZANERO et al., 2000), além de fornecer informações moleculares relevantes para caracterização do banco de germoplasma de *Brachiaria*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido no laboratório de Citogenética no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG e no laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite (CNPGL), Juiz de Fora - MG.

3.2 Material vegetal

A técnica de imunodeteção foi aplicada em plantas de *Brachiaria ruziziensis* (cultivar Comum e população tetraploidizada obtida pela Embrapa Gado de Leite) com $2n = 2x = 18$ e $2n = 4x = 36$, *Brachiaria brizantha* (cultivar Marandu) com $2n = 4x = 36$ e *Brachiaria decumbens* (cultivar Basilisk) com $2n = 4x = 36$, cedidas pela Embrapa Gado de leite, localizada em Juiz de Fora – MG.

3.3 Obtenção das células mitóticas

As raízes foram coletadas e fixadas por 40 minutos em temperatura ambiente em solução de paraformaldeído 4% contendo PBS (Posphate Buffer Saline) 1x e, posteriormente, foram lavadas em PBS 1x por quatro vezes (10 minutos cada). As raízes foram submetidas a tratamento enzimático (Celulase 2% : Pectinase 2%) a 37°C, durante duas horas e trinta minutos. Após este tempo, as raízes foram lavadas em PBS 1x, por três vezes (5 minutos cada). As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento em PBS 1x, sob o

microscópio estereoscópio. A lamínula foi retirada em nitrogênio líquido. Após a secagem, prosseguiu-se com as etapas para imunodeteccção, conforme descrito no item 3.5.

3.4 Obtenção das células meióticas

Os botões florais jovens foram selecionados e as anteras fixadas por 40 minutos em temperatura ambiente em solução de paraformaldeído 4% contendo PBS (Posphate Buffer Saline) 1x. Posteriormente, as anteras foram lavadas em PBS 1x, por quatro vezes (10 minutos cada). Sob o microscópio estereoscópio, as anteras foram maceradas sobre uma lâmina com uma gota de PBS 1x e esmagadas com lamínula para a liberação dos meiócitos. A lamínula foi retirada em nitrogênio líquido. Após a secagem, prosseguiu-se com as etapas para imunodeteccção, conforme descrito no item 3.5.

3.5 Imunodeteccção

A técnica de imunodeteccção para marcação da histona H3 fosforilada na serina 10 nas plantas coletadas foi realizada seguindo o método descrito por Manzanero et al. (2000), com algumas modificações.

Para evitar a marcação não específica do anticorpo, as lâminas foram incubadas por 20 minutos em 50 μ L de PBS contendo BSA (Albumina de soro bovino) 3% e Triton x-10 0,1% (solução bloqueadora) à temperatura ambiente. Posteriormente foi aplicado sobre as lâminas 25 μ L/lâmina de solução contendo anticorpo primário (Rabbit polyclonal IgG, Sta Cruz Biotechnology, USA) e solução bloqueadora (1:100). As lâminas foram mantidas em câmara úmida por no mínimo 16 horas a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes (5

minutos cada) em PBS 1x e foi aplicado sobre a preparação 25 μ L/lâmina da mistura de anticorpo secundário (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Sta Cruz Biotechnology, USA) e solução bloqueadora (1:100). As lâminas foram mantidas em câmara úmida, por 3 horas em temperatura ambiente sob condições afóticas. Após a lavagem das lâminas por três vezes (5 minutos cada) em tampão PBS 1x, as mesmas foram contra-coradas e montadas em uma solução de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)/Vectashield H-1000 (1:100) e guardadas em caixa escura. Posteriormente, as lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para o DAPI e 495/515 para a FITC (isotiacianato de fluoresceína). O padrão de distribuição da H3S10f foi determinado a partir das observações dos eventos de ocorrência e não ocorrência da imunodeteção em, no mínimo 100 lâminas para cada espécie avaliada durante a mitose e a meiose.

As imagens de todas as fases da mitose e da meiose de todas as espécies analisadas foram fotografadas com câmera digital (Sony Cyber-shot, 10.1 mega pixels) e otimizadas para melhor contraste e brilho, utilizando o Adobe Photoshop CS3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um resumo do padrão de imunodeteção obtido com anticorpo contra histona H3 fosforilada na serina 10 durante as diferentes fases da mitose e da meiose em *Brachiaria* spp. está apresentado na tabela 1.

A histona H3 fosforilada na serina 10 durante a mitose e a meiose apresentam um padrão especificamente coordenado no espaço e tempo, ou seja, o local e momento da fosforilação durante as divisões celulares foi o mesmo em *B. ruziziensis* (diploide e tetraploide), *B. decumbens* e *B. brizantha*.

No entanto, o modelo de imunodeteção obtido no presente trabalho, apresentou diferenças na distribuição cromossômica da H3S10f quando comparadas a mitose e a meiose. A variação entre as divisões celulares tem sido observada também em algumas gramíneas, tais como, *Secale cereale* e *Triticum aestivum* (MANZANERO et al., 2000) e *Zea mays* (KASZÁS; CANDE, 2000). A diferença observada entre a mitose e a meiose sugere que essa modificação pós-traducional da cromatina, pode desempenhar diferentes funções, especialmente na meiose de plantas.

Tabela 1 Distribuição da H3S10f na mitose e meiose de *Brachiaria* spp. P: imunodeteção na região pericentromérica; +: imunodeteção visível ao longo de todo o cromossomo; -: não detectável; Fases da divisão: L, leptóteno; Z, zigóteno; Pa, paquíteno; D, diplóteno; Dc, diacinese; MI, metáfase I; AI, anáfase I; TI, telófase I; PII, prófase II; MII, metáfase II; AII, anáfase II; TII, telófase II.

Material	Mitose	Primeira divisão meiótica								Segunda divisão meiótica			
		L	Z	Pa	D	Dc	MI	AI	TI	PII	MII	AII	TII
<i>B. ruziziensis</i> (2x)	P	+	+	+	+	+	+	+	-	P	P	P	-
<i>B. ruziziensis</i> (4x)	P	+	+	+	+	+	+	+	-	P	P	P	-
<i>B. brizantha</i> (4x)	P	+	+	+	+	+	+	+	-	P	P	P	-
<i>B. decumbens</i> (4x)	P	+	+	+	+	+	+	+	-	P	P	P	-

O modelo mitótico de fosforilação da histona H3S10 foi similar nos cromossomos de *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, ou seja, a variação no nível de ploidia não interferiu nesta modificação pós-traducional, que se mostrou conservada entre as espécies de *Brachiaria*.

A fosforilação foi ausente na intérfase (Figura 2), o que significa que esta modificação pós-traducional da H3 é dependente do ciclo celular (SCHROEDER-REITER et al., 2003). Observações em vários organismos têm demonstrado que os níveis de fosforilação da H3S10 que são reduzidos na intérfase, aumentam substancialmente no início da divisão celular e reduzem novamente durante a telófase (HANDZEL et al., 1997; HOUBEN et al., 1999; WEI et al., 1998). Desta forma, conforme já havia sido descrito por Germand et al. (2003), a progressão do ciclo celular dependente da fosforilação da histona H3 na serina 10 é conservado em eucariotos.

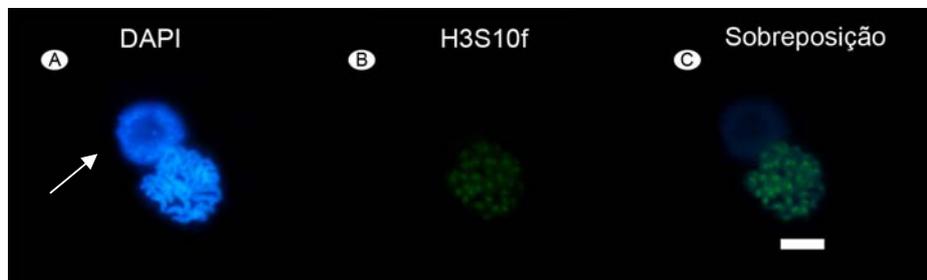


Figura 2 Imunodeteção da fosforilação da H3S10 em núcleo interfásico (seta) de *Brachiaria brizantha*. (A) Observados no DAPI. (B) Observados no FITC. (C) sobreposição das imagens com DAPI e FITC. A barra representa 10 μ m.

Em *Brachiaria* spp., a distribuição da H3 fosforilada na serina 10 durante a mitose foi restrita à região pericentromérica (Tabela 1e Figura 3), o que corrobora com os dados da literatura, que em plantas o padrão mitótico de

fosforilação da H3 correlaciona-se com a cromatina pericentromérica (HANS; DIMITROV, 2001; ZHANG et al., 2005).

A fosforilação inicia-se no final da prófase (Figuras 3A e 4A) quando os cromossomos já estão bastante condensados e prossegue na placa metafásica (Figuras 3B e 4B), onde todos os cromossomos apresentam fosforilação da H3, na região da cromatina pericentromérica, que se mantém na anáfase (Figuras 3C e 4C) e desaparece gradualmente na telófase (Figuras 3D e 4D).

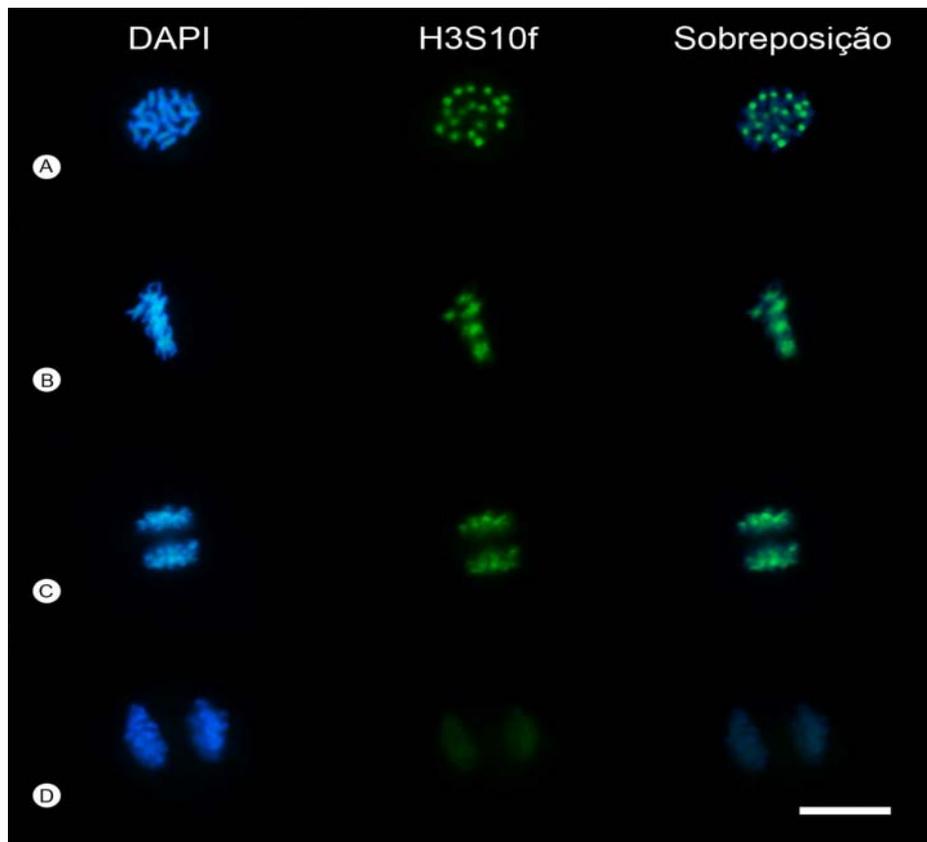


Figura 3 Imunodeteção da histona H3S10f durante a mitose em *B. ruziziensis* diploide. (A) prófase, (B) metáfase, (C) anáfase e (D) telófase. A barra representa 10 μ m.

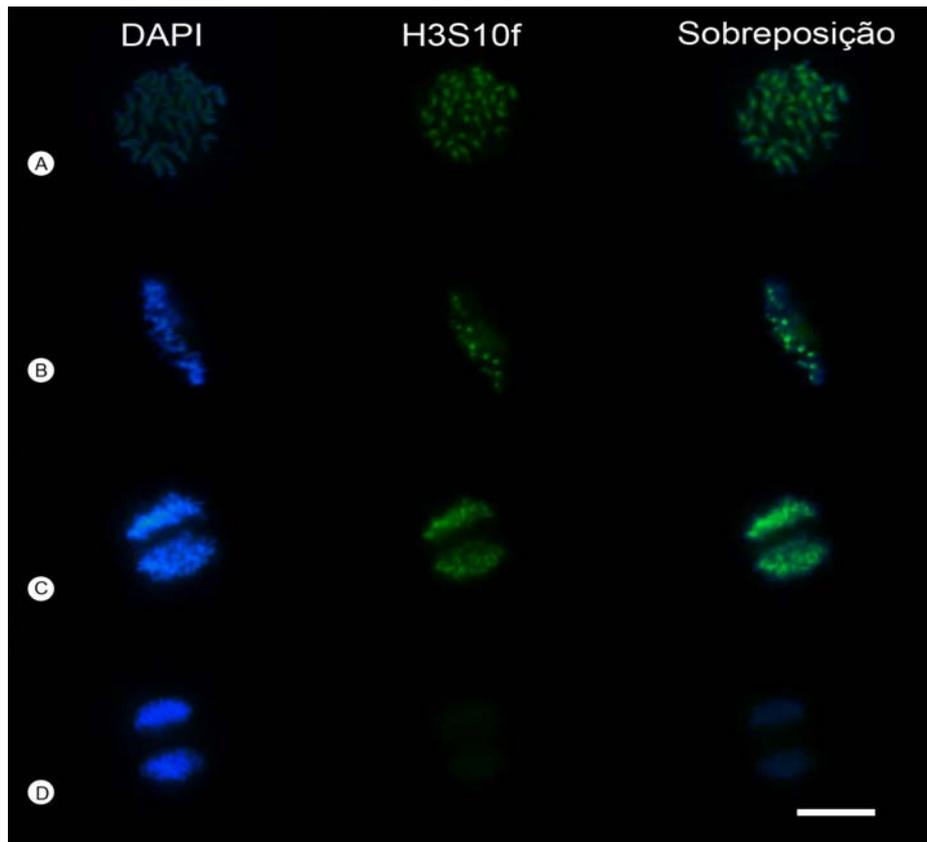


Figura 4 Imunodeteccção da histona H3S10f durante a mitose em *B. brizantha*. (A) prófase, (B) metáfase, (C) anáfase e (D) telófase. A barra representa 10 μm .

O modelo de distribuição da fosforilação na H3S10 na mitose, apresentado no presente trabalho para as espécies do gênero *Brachiaria*, foi semelhante ao de espécies vegetais já relatadas na literatura, tais como, *Secale cereale* e *Triticum aestivum* (MANZANERO et al., 2000), *Hordeum vulgare* e *Vicia faba* (HOUBEN et al., 1999) e *Cestrum strigilatum* (FERNANDES et al.,

2008). O início da fosforilação da H3 observado na prófase, em cromossomos já condensados, associado à imunodeteção localizada na região pericentromérica, fornece um forte argumento contra um importante papel dessa modificação pós-traducional na condensação cromossômica durante a mitose em plantas.

A espécie *Eleutherine bulbosa* apresenta um distinto padrão de condensação precoce bem definida na prófase, que é restrita ao par I de cromossomos. Todavia estes cromossomos não são precocemente fosforilados e nem mais extensivamente fosforilados do que os outros cromossomos, apoiando assim a opinião de que a H3S10f não tem uma relação causal com a condensação mitótica em plantas (FEITOZA; GUERRA 2011).

Espécies com centrômeros monocêntricos, como as do gênero *Brachiaria*, quando comparadas com espécies de centrômeros holocêntricos como *Luzula luzuloides* (GERMAND et al., 2003) e *Rhynchospora tenuis* (GUERRA et al., 2006) demonstram um mesmo padrão temporal de fosforilação da H3S10. No entanto, em contraste com os cromossomos de *Brachiaria* spp., os cromossomos das espécies holocêntricas aparecem uniformemente marcados em toda a extensão do cromossomo na metáfase e anáfase. Isto confirma que a distribuição da H3 fosforilada se correlaciona com a distribuição de centrômero ativo, desta forma todo o comprimento dos cromossomos holocêntricos estaria funcionando como uma região centromérica estendida.

Houben et al. (1999) relataram que a fosforilação da H3S10 não é observada em centrômeros inativos de cevada. Neste trabalho foram analisados cromossomos semi-dicêntricos, oriundos de uma translocação recíproca (5³), em que a constrição remanescente do centrômero do cromossomo 3 é menos pronunciada do que o centrômero original do cromossomo 5. A imunodeteção revelou que o centrômero inativo oriundo do cromossomo 3 não foi marcado, apenas o centrômero ativo do cromossomo 5 apresentou marcação.

O centrômero de cromossomos eucariotos é uma importante estrutura para a precisa segregação das cromátides durante as divisões celulares. Na região que circunda o centrômero, vários tipos de proteínas se juntam para formar o complexo centrômero/cinetócoro, uma das regiões mais diferenciadas do cromossomo (SHIBATA; MURATA, 2004).

O centrômero, composto por DNA repetitivo, é associado com uma variante particular de histona H3, exibe um diferenciado arranjo de fibra cromatina, e desempenha um papel essencial na manutenção das duas cromátides irmãs unidas até o início da anáfase (SUMNER, 2003). Por outro lado, o cinetócoro compreende um número relativamente pequeno de uma estrutura proteica, localizada apenas sobre a região centromérica de cromossomos monocêntricos. Ele funciona como uma região de ancoragem para os microtúbulos do fuso e está indiretamente envolvido nos movimentos do fuso durante a mitose e meiose (MANEY et al., 2000).

Com base na hiperfosforilação da histona H3 pronunciada nas regiões centroméricas em plantas, Houben et al. (1999) sugeriram que esta modificação é uma característica essencial da estrutura centrômero/cinetócoro. A hiperfosforilação poderia gerar uma cromatina centromérica com a estabilidade mecânica necessária para competir com as forças geradas nos cinetócoros durante o movimento cromossômico.

Em *Arabidopsis thaliana* a imunodeteção da H3S10f foi co-localizada com o sítio do principal satélite centromérico, através da técnica de FISH (Fluorescent in Situ Hybridization). Essas observações indicam uma estreita correlação entre a fosforilação da histona H3S10 e a atividade centromérica (SHIBATA; MURATA, 2004).

Após análise dos dados da literatura, Hans e Dimitrov (2001) sugeriram que a fosforilação da H3S10 parece ser algum tipo de marcação de cromossomos

metafásicos. A presença dessa marcação seria uma indicação para a célula que os cromossomos estão prontos para continuar com anáfase. Isto significa que a fosforilação H3 durante a mitose simplesmente serve como uma "memória" de que os cromossomos estão prontos para separação.

Uma forte associação temporal em mamíferos, entre o aparecimento da H3S10f e a condensação cromossômica (HANDZEL et al., 1997) levou a suposição de que a fosforilação da histona H3 tenha um papel importante no processo de condensação durante a mitose. Entretanto, esta associação temporal não foi observada nas espécies de *Brachiaria* avaliadas neste trabalho.

A observação de que a fosforilação da histona H3 na serina 10 ocorre no final da prófase mitótica, associada aos demais argumentos mencionados, sugere que é improvável que esta modificação pós-traducional desempenhe um papel importante na condensação cromossômica na mitose das espécies de *Brachiaria*, mas que está diretamente relacionada com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs na região pericentromérica.

O padrão de imunodeteção com o anticorpo contra H3 fosforilada na serina 10 nos diferentes estágios da meiose foi o mesmo para todas as espécies de *Brachiaria* estudadas. Assim como na mitose, a diferença no nível de ploidia das espécies de *Brachiaria* não alterou o padrão de distribuição da H3S10f (Tabela 1).

Em núcleos interfásicos, não foi observada imunodeteção da H3S10f nas espécies de *Brachiaria* avaliadas. Altos níveis desta modificação são observados somente nas fases da meiose, da mesma forma que observado na mitose.

Em *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha*, a distribuição da H3S10f variou entre a primeira e segunda divisão meiótica, semelhante ao observado em meiócitos de *Secale cereale* e *Triticum aestivum* por Manzanero

et al. (2000). Durante a primeira divisão, cromossomos inteiros foram marcados e a fosforilação da H3 terminou próximo à telófase I. Na segunda divisão meiótica, somente a região pericentromérica da prófase II até a anáfase II foram marcadas, análogo à mitose (Tabela 1 e Figuras 5, 6, 7 e 8).

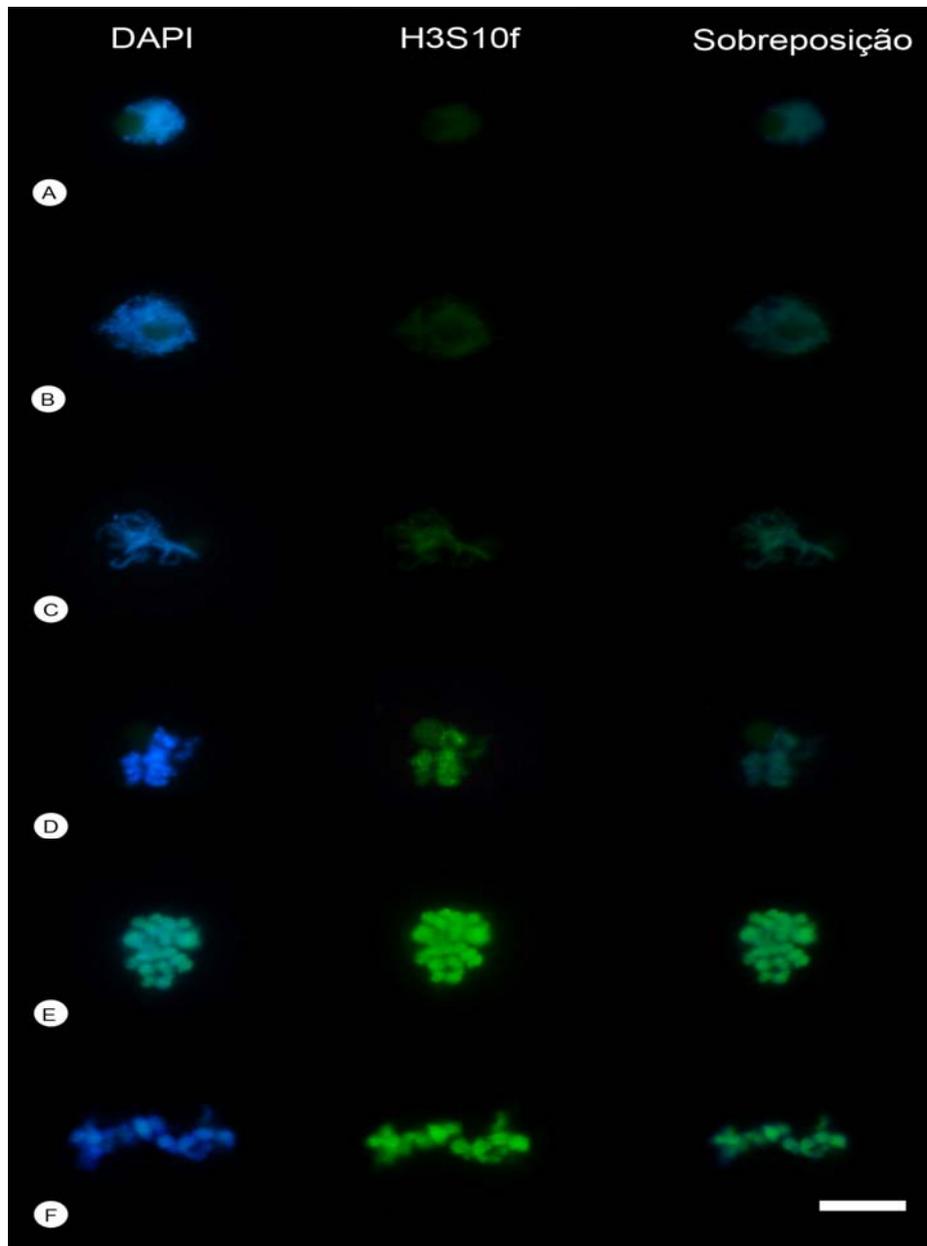


Figura 5 Imunodeteção da histona H3S10f durante a meiose em *B. brizantha*. (A) leptóteno, (B) zigóteno, (C) paquíteno, (D) diplóteno, (E) diacinese e (F) metáfase I. A barra representa 10 μm.

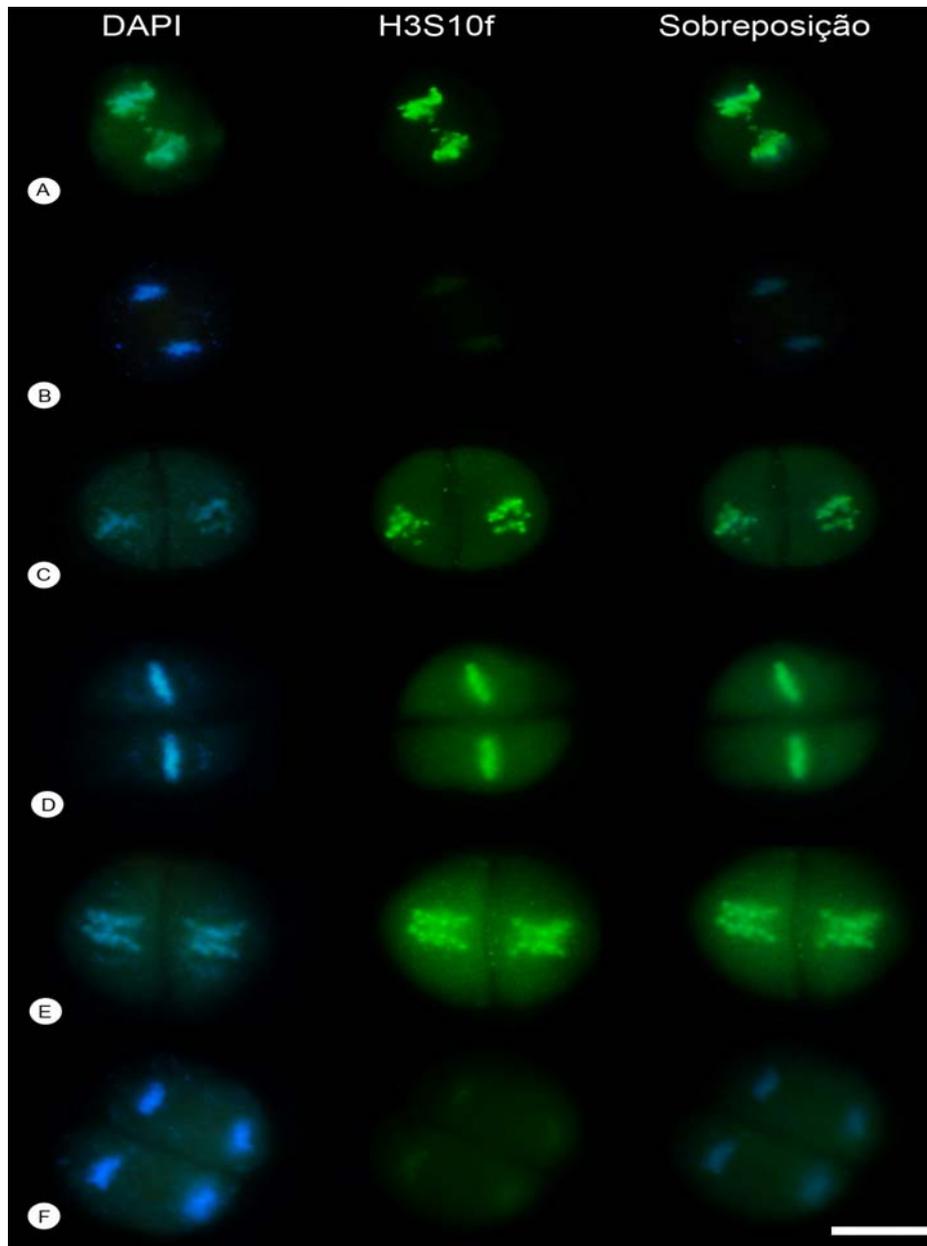


Figura 6 Imunodeteção da histona H3S10f durante a meiose em *B. brizantha*. (A) anáfase I, (B) telófase I, (C) prófase II, (D) metáfase II, (E) anáfase II e (F) telófase II. A barra representa 10 μ m.

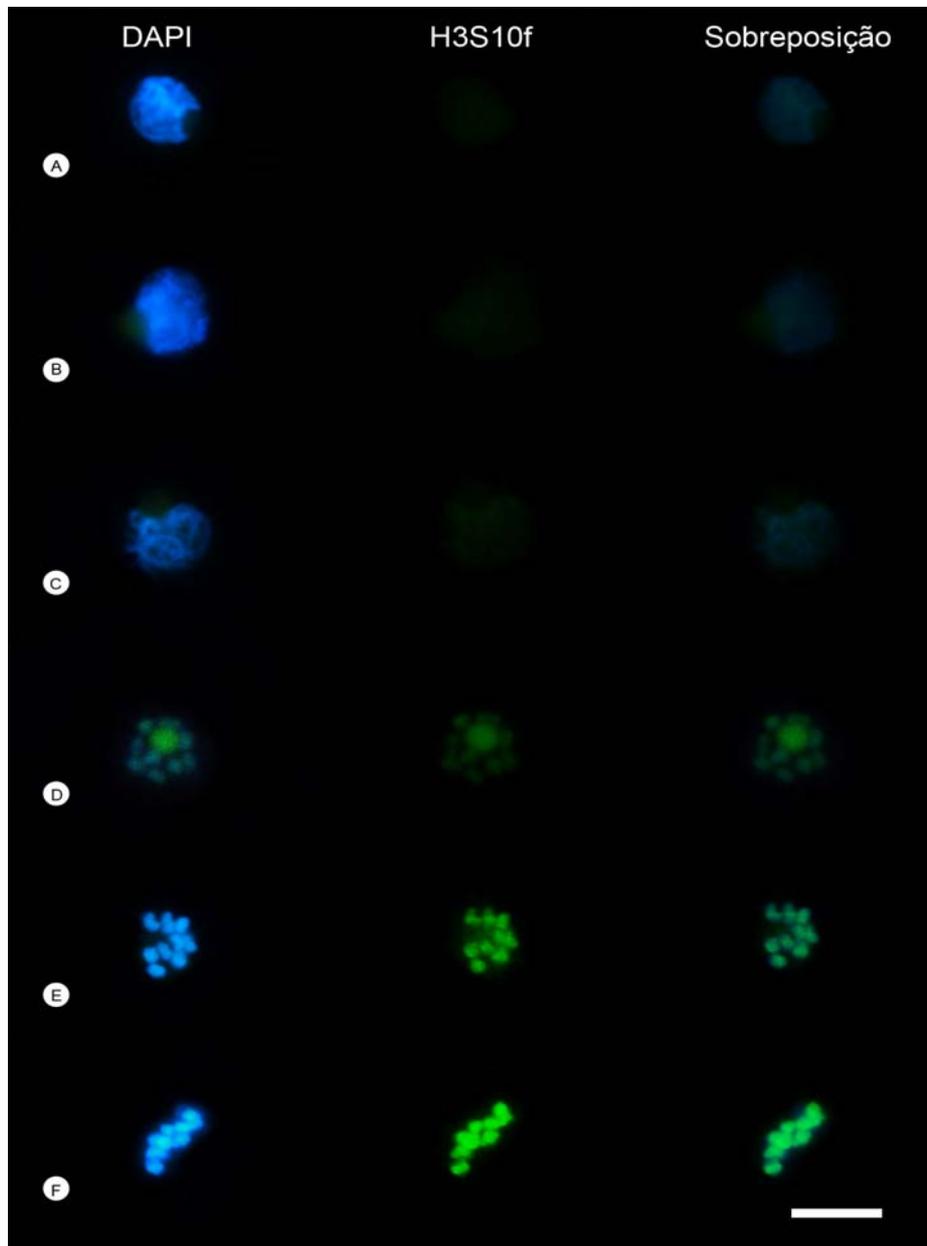


Figura 7 Imunodeteção da histona H3S10f durante a meiose em *B. ruziziensis* diploide. (A) leptóteno, (B) zigóteno, (C) paquíteno, (D) diplóteno, (E) diacinese e (F) metáfase I. A barra representa 10 μ m.

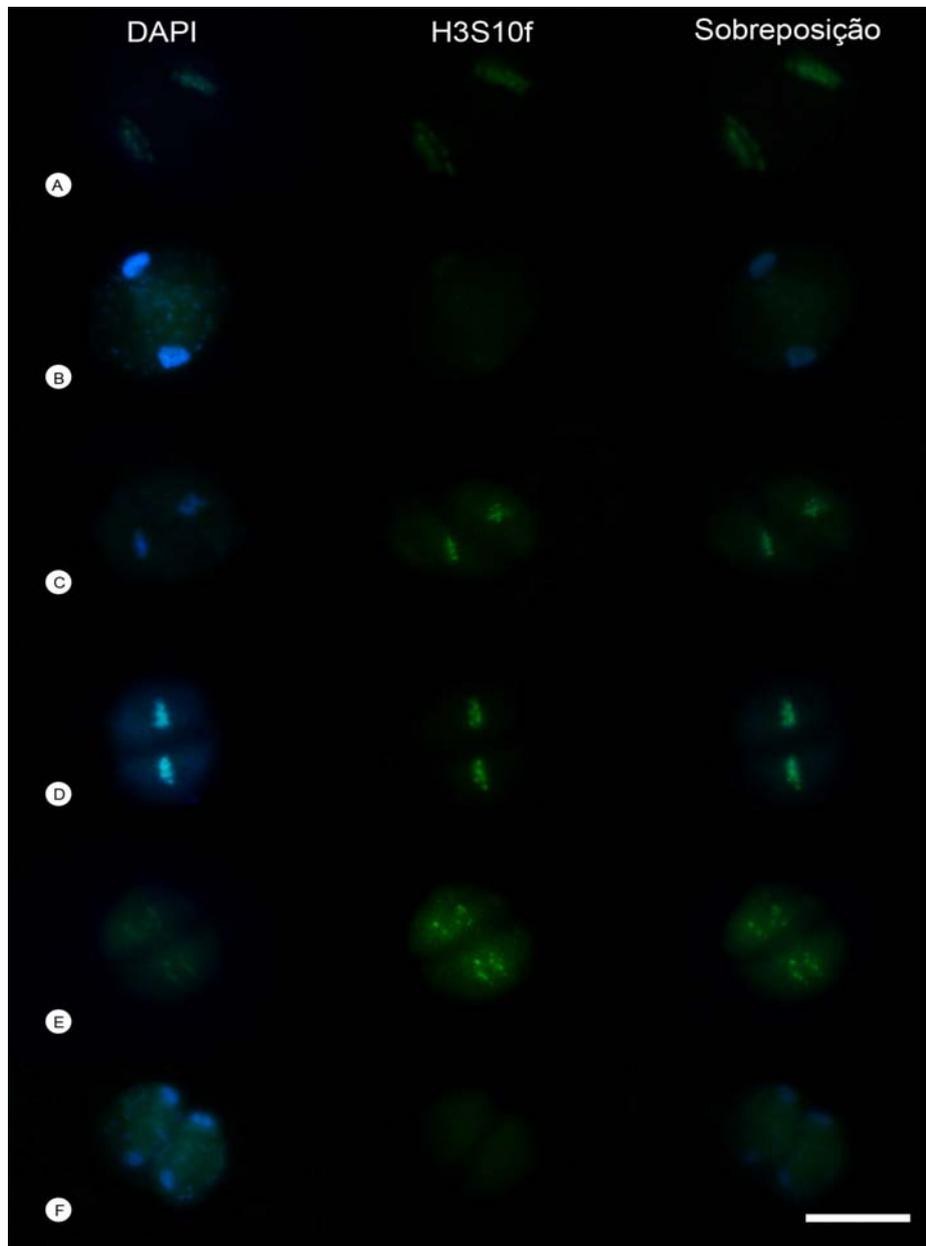


Figura 8 Imunodeteção da histona H3S10f durante a meiose em *B. ruziziensis* diploide. (A) anáfase I, (B) telófase I, (C) prófase II, (D) metáfase II, (E) anáfase II e (F) telófase II. A barra representa 10 μ m.

A progressão do ciclo celular nos estágios iniciais da prófase I (leptóteno, zigóteno e paquíteno) ocorreu na presença de fosforilação da H3S10. O sinal da imunodeteção aumentou gradualmente a partir do diplóteno e atingiu uma intensa detecção já na diacinese. Sendo assim, a imunodeteção mais intensa da fosforilação foi observada no final da prófase I, num momento em que os cromossomos já estão compactados e quando os homólogos já estão prontos para se alinhar na placa metafásica (Tabela 1 e Figuras 5 e 7).

O modelo temporal de fosforilação da H3S10 em *Brachiaria* spp. foi semelhante ao observado em trigo e centeio, onde os primeiros imunossinais foram detectados durante a transição do leptóteno para o zigóteno (MANZANERO et al., 2000) e diferiu do observado em milho (KASZÁS; CANDE, 2000), em que a transição do leptóteno até o zigóteno ocorreu na ausência da fosforilação da H3.

Em *Zea mays* foi demonstrado que as alterações na fosforilação da H3 nas fases da meiose se correlacionaram com a manutenção para a coesão das cromátides irmãs, e não com a condensação cromossômica. A fosforilação ocorre na transição da diacinese/pró-metafase I (quando os cromossomos já estão em um estado altamente compactado) e coincide com a ruptura da membrana nuclear (KASZÁS; CANDE, 2000).

Ainda na primeira divisão, em *Brachiaria* spp., na metáfase I, os bivalentes foram totalmente e fortemente marcados. Os cromossomos migraram reducionalmente para os pólos da célula na anáfase I ainda marcados de forma homogênea, no entanto com redução da intensidade (Tabela 1 e Figuras 5 e 6).

Com base na coordenação espaço-temporal observada da H3S10f na meiose I dos genótipos de *Brachiaria* avaliados poderia ser feita uma correlação com a condensação cromossômica. No entanto, é preciso considerar que as

coesinas (complexo proteico que promove a coesão entre cromossomos e cromátides irmãs), embora sejam enriquecidas ao redor do centrômero, elas também se ligam a sítios ao longo dos braços cromossômicos durante meiose I (KASZAZ; CANDE, 2000; ECKERT et al., 2007). Essas proteínas do complexo coesina se associam primeiramente as regiões próximas ao centrômero e depois se difundem, ou são ativamente movidas para os braços do cromossomo (ECKERT et al., 2007) com a finalidade de manter os bivalentes intactos. Na progressão da meiose, essa associação ao longo dos braços do cromossomo desaparece na anáfase I, permitindo que os homólogos segreguem para pólos opostos da célula (NASMYTH; HAERING, 2009). Essas características podem explicar o motivo pelo qual os cromossomos de *Brachiaria* spp. mostram-se inteiramente marcados na imunodeteção durante a prófase I - metáfase I e declinam, em intensidade de sinal, na anáfase I.

Além disso, a imunodeteção da H3S10f em meiócitos de trigo haploide, mostrou que, cromátides únicas resultantes da divisão equacional de univalentes na anáfase I não apresentam fosforilação da H3. Independente do seu baixo nível de fosforilação, cromátides separadas prematuramente apresentam condensação normal e seus cinetócoros interagem com os microtúbulos (GERMAND et al., 2003; MANZANERO et al., 2000), excluindo desta forma uma relação causal da H3S10f com a condensação cromossômica.

Essa hipótese foi suportada por observações em um milho mutante (*adf1*) que apresenta deficiência na coesão entre cromátides irmãs na metáfase II. Neste mutante, os univalentes na metáfase I foram fortemente fosforilados apenas na região pericentromérica. Já na meiose II não há nenhuma marcação, suportando desta forma, a hipótese que a H3S10f em milho está associada com a coesão das cromátides irmãs (KASZÁS; CANDE, 2000).

Um padrão de fosforilação da H3S10 incomum foi observado em *Cestrum strigilatum* (solanácea). Esta espécie apresentou diferenças significativas com relação a esta modificação pós-traducional no complemento cromossômico A e em cromossomos B. Os sinais foram observados apenas na região pericentromérica em todas as fases estudadas do complemento A (mitose, meiose I e II). Já os cromossomos B exibiram fosforilação da H3S10 em quase todo o cromossomo na primeira divisão da meiose e não apresentaram fosforilação na segunda divisão (FERNANDES et al., 2008). Este padrão de fosforilação pode ser considerado pouco frequente quando comparados com as informações disponíveis na literatura e os resultados aqui apresentados. Os autores sugerem que em *C. strigilatum*, a fosforilação na região pericentromérica pode estar envolvida com a motilidade dos cromossomos durante a divisão celular e não com a condensação cromossômica.

Na espécies de *Brachiaria* avaliadas, durante a telófase I e intercinese, a histona H3 tornou-se desfosforilada e foi novamente fosforilada durante a prófase II (Tabela 1 e figuras 6 e 8). Segundo Houben et al. (2007) este comportamento indica que essa modificação pós-traducional é reversível e pode ocorrer de forma independente do processo de replicação do DNA.

O padrão de fosforilação da H3 na segunda divisão meiótica segue o mesmo padrão de distribuição observado na mitose dos genótipos de *Brachiaria* avaliados, com imunodeteção na região pericentromérica. Na prófase II, os cromossomos são novamente condensados e acompanhados da H3S10f na região pericentromérica. A fosforilação manteve-se na metáfase II, apresentando ligeira redução na anáfase II. Na telófase II, a fosforilação da histona H3 desapareceu gradualmente com a descondensação dos cromossomos (Tabela 1 e Figuras 6 e 8). Na formação da tétrade não há nenhuma marcação da H3S10f (Figura 9).

Na meiose II, assim como na mitose, a coesão restrita a região pericentromérica é de fundamental importância para correta orientação do cinetócoro, além de estabilizar a conexão entre as cromátides irmãs mediante as forças geradas pelas fibras do fuso (NASMYTH; HAERING, 2009).

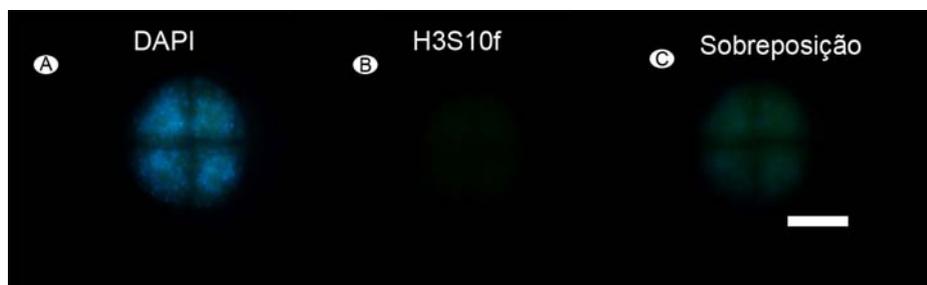


Figura 9 Imunodeteção da fosforilação da H3S10 na tétrade de *Brachiaria brizantha*. (A) Observadas no DAPI. (B) Observadas no FITC. (C) sobreposição das imagens com DAPI e FITC. A barra representa 10 μm .

Uma suposição baseada nos resultados aqui apresentados e os dados disponíveis na literatura é a de que, o padrão de fosforilação da H3S10 em células vegetais está mais coincidente com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs, do que com a condensação cromossômica. Essas observações reforçam a hipótese de que em plantas, a fosforilação da H3 é requerida para coesão de cromátides irmãs durante a metáfase I e para região pericentromérica de cromátides irmãs na metáfase II e mitose.

No entanto, conforme discutido por Manzanero et al. (2000) a correlação entre a coesão de cromátides irmãs e a fosforilação da H3S10 não é perfeita, pois ambos os processos não começam e terminam ao mesmo tempo. As cromátides irmãs são fisicamente unidas a partir de sua formação na fase S, por proteínas do complexo coesina (BARDAN, 2010).

Com base nas observações em milho, Kaszás e Cande (2000) sugerem que pode haver pelo menos dois possíveis modelos para o papel da H3S10f na coesão entre cromátides irmãs. Primeiro, a fosforilação pode proteger o local de coesão das cromátides irmãs, talvez estabilizando a ligação da coesina à cromatina durante a metáfase. Esta regulação seria necessária uma vez que a maioria das coesinas se dissocia dos cromossomos durante a prófase/pró-metáfase (LOSADA et al., 1998). Alternativamente, a fosforilação poderia preparar os cromossomos para destruição da coesão na transição da metáfase para anáfase. Os sinais restantes na anáfase seriam sítios fosforilados, em que fosfatases endógenas não teriam ainda atuado.

Embora vários fatores que estão envolvidos no recrutamento da coesina já tenham sido identificados, o mecanismo exato de requerimento da coesina para locais genômicos específicos não é bem compreendido. Estudos sugerem que modificações pós-traducionais das histonas podem estar envolvidos nestes mecanismos (NASMYTH; HAERING, 2009; ÜNAL et al., 2004).

A fosforilação da H3S10 nas espécies de *Brachiaria* foi detectada tardiamente durante a mitose e a prófase meiótica e não nos cromossomos imediatamente após a replicação do DNA, quando a coesão é estabelecida. Por conseguinte, fosforilação da histona H3 não deve estar envolvida na iniciação da coesão das cromátides irmãs, mas pode estar relacionada com a manutenção da coesão de cromátides irmãs. Nasmyth e Haering (2009) consideram que alguns fatores são requeridos somente para estabelecer a coesão entre cromátides irmãs e outros são requeridos para manter a coesão ao longo do processo.

Uma possibilidade alternativa é que a fosforilação da H3 na serina 10 pode servir como um sinal, para o recrutamento de proteínas específicas envolvidas na manutenção da coesão entre cromátides irmãs, durante as divisões celulares.

Os resultados apresentados no presente trabalho, associado a resultados anteriores realizados com outras gramíneas, tais como, trigo (MANZANERO et al., 2000), centeio (HOUBEN et al., 1999) e milho (KASZAS; CANDE, 2000) suportam a hipótese de que a fosforilação da H3 na serina 10 está envolvido na regulação da manutenção da coesão entre cromátides irmãs e não na condensação cromossômica, onde talvez outras modificações pós-traducionais possam estar envolvidas ou dependam da fosforilação para ocorrerem, através da regulação trans-histona.

No entanto, uma ressalva importante nesta interpretação é que o papel preciso do mecanismo de fosforilação da histona H3S10 não é claro na maioria dos organismos. Dessa forma, fica evidente a necessidade de se fazer estudos mais aprofundados para alcançar uma compreensão maior dos mecanismos que regem estas complexas alterações.

5 CONCLUSÕES

A fosforilação da histona H3 na serina 10 está associada com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs na mitose e meiose em *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria ruziziensis*.

O padrão de distribuição da H3S10f foi o mesmo para as espécies avaliadas durante a mitose e a meiose, independente do nível de ploidia.

REFERÊNCIAS

- AHN, S. H. et al. H2B (Ser10) phosphorylation is induced during apoptosis and meiosis in *S. cerevisiae*. **Cell Cycle**, Austin, v. 4, n. 6, p. 780-783, June 2005.
- ALLIS, C. D. et al. **Epigenetics**. New York: Cold Spring Harbor, 2007. 502 p.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 381-395, Feb. 2011.
- BARDAN, A. Many functions of the meiotic cohesion. **Chromosome Research**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 909-924, Dec. 2010.
- BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2297-2309, Nov. 1987.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, Cambridge, v. 104, n. 407, p. 157-171, Jan. 2001.
- BRADBURY, E. M. Reversible histone modification on the chromosome cell cycle. **Bioessays**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 9-16, Apr. 1992.
- CHEN, M.; SHAOLEI, L. V.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. **Development Growth & Differentiation**, Nagoya, v. 52, n. 7, p. 555-566, Sept. 2010.
- CHEUNG, P. et al. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 905-915, June 2000.
- DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. 519 p.
- DUJARDIN, M. Additional chromosome numbers and meiotic behavior in tropical African grasses from western Zaire. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 864-876, 1979.
- ECKERT, C. A.; GRAVDAHL, D. J.; MEGEE, P. C. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components

promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubule-based tension. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 21, n. 3, p. 278-291, Feb. 2007.

FEITOZA, L.; GUERRA, M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. **Genetica**, Dordrecht, v. 139, n. 3, p. 305-314, Mar. 2011.

FERNANDES, T. et al. An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. **Genome**, Ottawa, v. 51, n. 9, p. 772-777, Aug. 2008.

FUCHS, J. et al. Chromosomal histone modification patterns: from conservation to diversity. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 4, p. 199-208, Aug. 2006.

FUZINATTO, V. A.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Microsporogenesis in sexual *Brachiaria* hybrids (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 4, p. 1107-1117, Aug. 2007.

GERMAND, D.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A. The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 101, n. 2, p. 172-176, May 2003.

GONZÁLEZ, A. M. T.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 37, n. 1, p. 36-44, Jan. 2005.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 684 p.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, M. et al. Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). **Genetica**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 126-133, Jan. 2006.

HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, Basingstoke, v. 20, n. 24, p. 3021-3027, May 2001.

HANSON, K. K.; KELLEY, A. C.; BIENZ, M. Loss of *Drosophila borealin* causes polyploidy, delayed apoptosis and abnormal tissue development. **Development**, Cambridge, v. 132, n. 21, p. 4777-4787, Nov. 2005.

HEITZ, E. Das heterochromatin der moose I. **Jahrbuch Wissenschaften Botanisches**, Berlin, v. 69, p. 762-818, 1928.

HENDZEL, M. J. et al. Mitosis specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, Berlin, v. 106, n. 6, p. 348-360, Nov. 1997.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 66, n. 1, p. 18-33, Jan. 2011.

HOOSER, A. van et al. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance of mammalian chromosome condensation. **Journal of Cell Science**, London, v. 111, n. 23, p. 3497-3506, Dec. 1998.

HOUBEN, A. et al. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 675-679, June 1999.

_____. Phosphorylation of histone H3 in plants: a dynamic affair. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1769, p. 308-315, 2007.

HSU, J. Y. et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. **Cell**, Cambridge, v. 102, n. 3, p. 279-291, Aug. 2000.

ISHIGAKI, G. et al. Estimation of genome size in *Brachiaria* species. **Grassland Science**, Hoboken, v. 56, n. 4, p. 240-242, Dec. 2010.

ITO, T. Role of histone modification in chromatin dynamics. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 141, n. 5, p. 609-614, May 2007.

JIN, W. et al. Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 1203-1214, Aug. 2008.

JOHANSEN, K. M.; JOHANSEN, J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 393-404, May 2006.

KASZÁS, E.; CANDE, W. Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 18, p. 3217-3226, 2000.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 693-705, Feb. 2007.

LEE, J. Y.; ORR-WEAVER, T. L. The molecular basis of sister chromatid cohesion. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 753-777, 2001.

LEWIN, B. **Genes VIII**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004. 1027 p.

LO, W. S. et al. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 5, n. 6, p. 917-926, June 2000.

LOSADA, A.; HIRANO, M.; HIRANO, T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 13, p. 1986-1997, July 1998.

MANEY, T. et al. The kinetochore of higher eukaryotes: a molecular view. **International Review of Cytology**, New York, v. 194, n. 1, p. 67-131, Feb. 2000.

MANZANERO, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, Berlin, v. 109, n. 5, p. 308-317, Aug. 2000.

MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* e *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 31, n. 1/4, p. 43-109, 1992.

MOSER, S. C.; SWEDLOW, J. R. How to be a mitotic chromosome. **Chromosome Research**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 307-319, Apr. 2011.

NASMYTH, K.; HAERING, C. H. Cohesin: its roles and mechanisms. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 43, p. 525-558, Dec. 2009.

NIELEN, S. et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 23, n. 1, p. 45-51, 2010.

NOWAK, S. J.; CORCES, V. G. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. **Trends in Genetics**, London, v. 20, n. 4, p. 214-220, Apr. 2004.

PAULI, A. et al. Celltype-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 239-251, Feb. 2008.

PENTEADO, M. I. O. et al. **Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2000. 32 p. (EMBRAPA Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 11).

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

_____. Selection of interspecific *Brachiaria* hybrids to intensify milk production on pastures. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 99-104, Jan./Feb. 2005.

REA, S. et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. **Nature**, London, v. 406, n. 6796, p. 593-599, Aug. 2000.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae:Paniceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 7-10, Feb. 2006.

RONCERET, A.; SHEEHAN, M. J.; PAWLOWSKI, W. P. Chromosome dynamics in meiosis. **Plant Cell Monographs**, New York, v. 9, n. 1, p. 103-124, 2007.

SCHROEDER-REITER, E.; HOUBEN, A.; WANNER, G. Immunogold labelling of chromosomes for scanning electron microscopic: a closer look at phosphorylated histone H3 in mitotic metaphase chromosomes of *Hordeum vulgare*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 585-596, Sept. 2003.

SEIJO, G. et al. La citogenética molecular e inmunocitogenética em el estudio de los genomas vegetales. In: LEVITUS, G. et al. (Ed.). **Biotecnología y mejoramiento vegetal II**. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 2010. p. 34-46.

SHIBATA, F.; MURATA, M. Differential localization of the centromere-specific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Cell Science**, London, v. 117, n. 14, p. 2963-2970, June 2004.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Berlin: Blackwell, 2003. 287 p.

TIMBÒ, A. L. O. **Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp.** 2010. 100 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

TOPP, C. N.; DAWE, R. K. Reinterpreting pericentromeric heterochromatin. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 6, p. 647-653, Dec. 2006.

ÜNAL, E. et al. DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a doublestrand break-specific cohesin domain. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 16, n. 6, p. 991-1002, Sept. 2004.

VALLE, C. B. do; GLIENKE, C.; LEGUISAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, Paris, v. 7, n. 1, p. 42-43, 1994.

VALLE, C. B. do; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 56, n. 4, p. 460-472, 2009.

VALLE, C. B. do; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of Brachiaria. In: MILES, J. W. et al. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 147-163.

WEI, Y. et al. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, n. 13, p. 7480-7484, June 1998.

ZHANG, X. et al. Phosphoserines on maize Centromeric Histone H3 and Histone H3 Demarcate the Centromere and Pericentromere during chromosome segregation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 2, p. 572-583, Feb. 2005.