



**CRISTINA MARIA PINTO DE PAULA**

**CITOGENÔMICA COMPARATIVA E  
ASPECTOS EPIGENÉTICOS EM ESPÉCIES  
DE *Brachiaria* E HÍBRIDOS  
INTERESPECÍFICOS**

**LAVRAS – MG**

**2015**

**CRISTINA MARIA PINTO DE PAULA**

**CITOGENÔMICA COMPARATIVA E ASPECTOS EPIGENÉTICOS  
EM ESPÉCIES DE *Brachiaria* E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS**

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.

Orientadora

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

Coorientador

Dr. Fausto Souza Sobrinho

**LAVRAS – MG**

**2015**

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

Paula, Cristina Maria Pinto de.

Citogenômica comparativa e aspectos epigenéticos em espécies  
de *Brachiaria* e híbridos interespecíficos / Cristina Maria Pinto de  
Paula. – Lavras : UFLA, 2015.

113 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Eucromatina. 2. FISH. 3. Forrageiras. 4. GISH. 5.  
Heterocromatina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CRISTINA MARIA PINTO DE PAULA**

**CITOGENÔMICA COMPARATIVA E ASPECTOS EPIGENÉTICOS  
EM ESPÉCIES DE *Brachiaria* E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS**

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 07 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade-Vieira	UFLA
Profa. Dra. Andrea Beatriz Mendes-Bonato	UEM
Dr. Flávio Rodrigo Gandolfi Benites	EMBRAPA

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

Orientadora

Dr. Fausto Souza Sobrinho

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*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 doutorado 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 Souza Sobrinho, pela coorientação, disponibilidade e por ser um grande incentivador para meu sucesso profissional e ao Dr. Flávio Rodrigues Gandolfi Benites pelas colaborações com a visão de um melhorista, além da amizade.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, em especial as professoras Lisete, Giovana e Larissa, 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.

À minha querida amiga Gaby, pela amizade sincera, por dividir comigo momentos bons e ruins e mesmo a distância esteve presente todos os momentos. Às amigas Gisele, Ludmila e Thaís, pela amizade, companheirismo, risadas e conhecimentos compartilhados. À Karol, 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 noivo 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.

## RESUMO

O gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach é composto por espécies com diferentes níveis de ploidia e modo de reprodução, algumas de grande importância econômica sendo utilizadas como forrageiras. Estudos sobre a composição e relação genômica dentro do gênero são restritos, assim como a avaliação de marcas epigenéticas que estão envolvidas com a organização estrutural e funcional do genoma. O objetivo do primeiro estudo foi investigar as relações genômicas entre *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* por meio da técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH). Adicionalmente, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com rDNA 45S e 5S e a quantificação do tamanho do genoma nuclear foram realizadas. O híbrido 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*) apresentou número cromossômico ( $2n=36$ ), quantidade de DNA (3,24 pg) e quatro sítios de rDNA 45S e sete de 5S conforme o esperado a partir do cruzamento de *B. ruziziensis* x *B. brizantha*. O híbrido cv. Mulato II [(*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) x *B. brizantha*] também apresentou  $2n=36$  cromossomos, sete sítios de rDNA 5S, quatro de 45S e 3,83 pg de DNA, superior à média dos genitores (3,43 pg). No híbrido 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*), todas as metáfases apresentaram  $2n=38$  cromossomos, excedendo 2 cromossomos do esperado, que representou um aumento de 0,29 pg de DNA, considerando a média do conteúdo de DNA dos genitores (3,33 pg) e a presença de cinco sítios de rDNA 45S e sete de 5S. A análise da GISH nos híbridos permitiu identificar a ocorrência de rearranjos e diferenças da contribuição dos genomas genitores na constituição do híbrido. Com base nos resultados da GISH foi proposta a constituição genômica de *B. brizantha* ( $BBB^1B^1$ ), *B. decumbens* ( $B^1B^1B^2B^2$ ) e *B. ruziziensis* ( $B^2B^2$ ). Os genomas B,  $B^1$  e  $B^2$  foram considerados homeólogos, com menor afinidade entre os genomas B e  $B^2$ . Em uma segunda abordagem, o objetivo foi analisar as modificações pós-traducionais de histonas e metilação de DNA associadas com a modulação da cromatina e silenciamento gênico em espécies e híbridos de *Brachiaria*, com diferentes níveis de ploidia e modo de reprodução. A comparação da distribuição cromossômica de modificações de histonas entre as espécies e híbridos revelou uma maior variação de tipos cromossômicos para a marcação heterocromática (H3K9me2) em *B. decumbens* e no híbrido 963, enquanto que, para a marca epigenética da eucromatina (H3K4me2), a variação foi maior em *B. brizantha*, *B. decumbens* e híbrido 963. A distribuição cromossômica da 5-mCyt foi similar entre *B. brizantha* e *B. decumbens*, espécies tetraploides e apomíticas, as quais diferiram do observado em *B. ruziziensis*, espécie diploide e sexual. Significativas alterações na metilação do DNA foram observadas na *B. ruziziensis* duplicada e nos híbridos interespecíficos, possivelmente como consequência dos processos de poliploidização e hibridação, respectivamente.

Palavras-chave: Eucromatina. FISH. Forrageiras. GISH. Heterocromatina. Metilação.

## ABSTRACT

The *Brachiaria* (Trinius) Grisebach genus consists of species with different ploidy levels and reproduction mode, some of great economic importance are used as forage. Studies about the genomic constitution and relationship within of the genus are restricted, as well as the evaluation of epigenetic marks that are involved in structural and functional organization of the genome. The aim of the first study was to investigate the genomic relationship among *B. ruziziensis*, *B. decumbens* and *B. brizantha* by means of Genomic *in situ* Hybridization (GISH). In addition, Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with 45S and 5S rDNA and quantification of the nuclear genome size were performed. The hybrid 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*) presented chromosome number ( $2n = 36$ ), DNA amount (3.24 pg) and four sites of 45S rDNA and seven of 5S as expected from crossing between *B. ruziziensis* and *B. brizantha*. The hybrid cv. Mulato II [(*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) x *B. brizantha*] also presented  $2n=36$  chromosomes, seven sites of 5S rDNA, four of 45S and 3.83 pg of DNA, higher than the average of the parents (3.43 pg). The hybrid 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) all metaphases presented  $2n = 38$  chromosomes, exceeding 2 chromosomes to the expected, which represented an increase of 0.29 pg of DNA, considering the average of DNA content of the parents (3.33 pg ) and the presence of five sites of 45S rDNA and seven of 5S. The GISH analysis in the hybrid indicated the occurrence of rearrangements and differences in the contribution of parent genomes in the constitution of the hybrid. Based on GISH results, was proposed the genomic constitution of *B. brizantha* ( $BBB^1B^1$ ), *B. decumbens* ( $B^1B^1B^2B^2$ ) and *B. ruziziensis* ( $B^2B^2$ ). The genomes B,  $B^1$  and  $B^2$  were considered homeologous, with lower affinity between the genomes B e  $B^2$ . In a second approach, the aim was to evaluate the histone post-translational modifications and DNA methylation associated with chromatin modulation and gene silencing, in *Brachiaria* species and hybrids which have different ploidy levels and reproduction mode. Comparison of chromosomal distribution in histone modifications among species and hybrids showed greater variation of chromosomal types for the heterochromatic marks (H3K9me2) in *B. decumbens* and the 963 hybrid, while, for the euchromatin epigenetic mark (H3K4me2), the variation was higher in *B. brizantha*, *B. decumbens* and 963 hybrid. The chromosome distribution of 5-mCyt was similar between *B. brizantha* and *B. decumbens*, tetraploid and apomictic species, which differ from the distribution observed in *B. ruziziensis*, a diploid and sexual species. Significant alterations in DNA methylation were observed in the duplicated *B. ruziziensis* and in the interspecific hybrids, possibly as a result of hybridization and polyploidization process.

Keywords: Euchromatin. FISH. Forage. GISH. Heterochromatin. Methylation.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b>	
	<b>ARTIGO 1</b> Constituição e relação genômica em espécies e híbridos de <i>Brachiaria</i> (Poaceae).....	44
	<b>ARTIGO 2</b> Distribuição cromossômica de modificações de histonas e metilação do DNA em espécies e híbridos interespecíficos do gênero <i>Brachiaria</i> (Poaceae).....	82

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Gramíneas do gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach [(syn. *Urochloa* Hochst. ex A. Rich.) R.D.Webster] reúnem cerca de 100 espécies (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996), sendo algumas de grande importância econômica como forrageiras (VALLE; JANK; RESENDE, 2009). Estima-se que aproximadamente 85% das áreas de pastagens cultivadas no Brasil, utilizam cultivares de *Brachiaria* (MACEDO, 2006), dentre as quais as de maior importância agrônômica são as apomíticas e, geralmente, poliploides *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.), *B. decumbens* Stapf, *B. humidicola* (Rendle) Schweick e a diploide e sexual *B. ruziziensis* (R. Germ & Evrard) (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

As espécies do gênero *Brachiaria* tem despertado interesse para o melhoramento genético, por sua ampla distribuição e adaptação no país. Os programas têm utilizado como estratégia a avaliação e seleção de genótipos superiores, além de cruzamentos intra e interespecíficos envolvendo *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* tetraploidizada (SOUZA SOBRINHO, 2005; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Apesar de existir grande semelhança entre as espécies do gênero *Brachiaria* e haver a possibilidade de se obter cruzamentos interespecíficos, estudos específicos sobre a relação genômica dentro do gênero são escassos. Nesse sentido, análises citológicas, morfológicas e moleculares têm contribuído para o estabelecimento de uma relação entre as espécies. Análise de divergência genética baseada em caracteres morfológicos (ASSIS et al., 2002; RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996), marcadores moleculares RAPD (AMBIEL et al., 2010; TOHME et al., 1996) e ISSR (AZEVEDO et al., 2011) e polimorfismo do espaçador transcrito interno (ITS) do DNA ribossomal (TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005), classificaram *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* em um mesmo grupo.

Adicionalmente, o pareamento cromossômico na meiose em híbridos (MENDES-BONATO et al., 2006; RISSO-PASCOTTO et al., 2004a) também têm contribuído para avaliação das relações genômicas entre as espécies de *Brachiaria*. No entanto, ainda não há clareza com relação à caracterização/composição dos genomas, que foram, a princípio, designados a partir de estudos com meiose, com as iniciais dos nomes científicos das espécies, sendo genoma R para *B. ruziziensis* e genoma B para *B. brizantha*.

Análises de citogenética molecular, tais como, as técnicas de FISH e GISH, fornecem um resultado visual e direto para a investigação da composição e relação genômica entre espécies, e tem sido amplamente utilizadas para melhorar o conhecimento e diferenciação dos genomas de plantas (WOLNY et al., 2011), solucionar alguns processos de evolução cromossômica, incluindo rearranjos estruturais (KSIĄŻCZYK et al., 2014) e estudos sobre relações filogenéticas e genômicas (KOPECKÝ et al., 2006; REIS et al., 2014). A GISH ainda não foi usada para discriminar os genomas das espécies de *Brachiaria*, mas tem sido aplicada com essa finalidade em alguns grupos importantes de gramíneas, tais como, *Pennisetum* (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013; REIS et al., 2014), *Lolium* e *Festuca* (KOPECKÝ et al., 2009) e *Setaria* (ZAO et al., 2013).

Além das relações genômicas, outro fator interessante a ser estudado em espécies do gênero *Brachiaria* está relacionado a aspectos epigenéticos, no qual é possível estudar a plasticidade genômica das espécies. Os mecanismos epigenéticos são capazes de alterar o padrão temporal, espacial e a abundância da expressão gênica, nos quais se destacam, a metilação do DNA, as modificações de histonas e o RNA de interferência (siRNA) (CHEN; SHAOLEI; MENG, 2010). As modificações de histonas e a metilação do DNA podem constituir marcas características de determinadas regiões cromossômicas, tais como regiões eucromáticas e heterocromáticas (FENG; JACOBSEN, 2011) que, respectivamente, caracterizam regiões ativas e inativas geneticamente. Assim, de forma semelhante aos estudos realizados com outras espécies, tais como milho (HE et al., 2010) e

*Arabidopsis thaliana* (VAUGHN et al., 2007), é plausível o estudo da distribuição nuclear e em nível cromossômico, de marcas epigenéticas em genótipos como os de *Brachiaria* que apresentam diferentes modos de reprodução e que reúnam em seu processo evolutivo, eventos de poliploidização e hibridação interespecífica. A avaliação de espécies de *Brachiaria* pode ser um bom modelo para estudar a plasticidade do genoma em plantas de reprodução sexual e apomítica, diploide e tetraploides naturais (alotetraploides) e induzidos (autotetraploides) e também em híbridos interespecíficos. Dentre as possibilidades de estudo, uma delas é realizar um mapeamento de regiões eucromáticas, heterocromáticas e silenciadas nos cromossomos/genomas de *Brachiaria*, utilizando a técnica de imunolocalização de histonas modificadas e metilação do DNA.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as relações genômicas e aspectos epigenéticos em espécies de *Brachiaria* e híbridos interespecíficos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach: aspectos taxonômicos, botânicos e citogenéticos

Gramíneas do gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach [(syn. *Urochloa* Hochst. ex A.Rich.) R.D.Webster], pertencem à tribo Paniceae, subfamília Panicoideae e família Poaceae, reúnem cerca de 100 espécies de gramíneas (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). Algumas espécies apresentam grande importância econômica, como as forrageiras. Elas são amplamente distribuídas nos países tropicais e subtropicais, com grande concentração no continente africano, o qual é considerado seu centro de origem. As plantas desse grupo se estabelecem em *habitats* muito variados, desde várzeas inundáveis até regiões semidesérticas. A ocorrência mais comum, no entanto é em savanas, também chamada de “cerrados” (SOUZA SOBRINHO, 2005; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

*Brachiaria* foi descrita pela primeira vez por Trinius, em 1834, que a classificou como uma subdivisão de *Panicum*, e posteriormente, em 1953, foi elevada a categoria de gênero por Grisebach (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

*Brachiaria*, *Urochloa*, *Eriochloa* e *Panicum* formam um grupo de gêneros que compartilham a via fotossintética C4 com a utilização da enzima PEP-CK (Fosfoenol Piruvato Carboxiquinase). No entanto, esses gêneros apresentam limites taxonômicos ainda indefinidos. As principais características que identificam o gênero *Brachiaria*, dentro da tribo Paniceae, são as espiguetas ovais a oblongas, arranjas em racemos unilaterais, com a gluma inferior adjacente à ráquis, em posição adaxial. (PEREIRA et al., 2001; RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). No entanto, essas características não são consistentes dentro do gênero, pois, às vezes, elas são difíceis de distinguir.

Os critérios taxonômicos utilizados, tanto em relação ao gênero *Brachiaria* 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*. No entanto, por falta de informações convincentes, 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* (TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005).

Além da confusão taxonômica, há também um problema de identificação dentro do gênero. Segundo Mass (1996) o processo de disseminação durante o intercâmbio de germoplasma das espécies de *Brachiaria*, contribuiu para aumentar a confusão na identificação dos acessos, no qual um mesmo genótipo foi distribuído com vários nomes diferentes ou identificado de forma errada.

Estudos específicos sobre a relação genômica dentro do gênero *Brachiaria* são escassos, no entanto, análises citológicas, morfológicas e moleculares têm contribuído para o estabelecimento de uma relação entre as espécies.

Análise de divergência baseada na avaliação de 24 caracteres morfológicos classificou as principais espécies do gênero em três diferentes grupos: o primeiro constituído por *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis*; o segundo por *B. dictyoneura* e *B. humidicola*; e o último grupo por espécies de *B. jubata* (ASSIS et al., 2002).

Estudos sobre a divergência genética utilizando marcadores moleculares RAPD (AMBIEL et al., 2010) e ISSR (AZEVEDO et al., 2011) incluiu genótipos de *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* em um mesmo grupo e *B. humidicola* foi separada em outro grupo. A proximidade filogenética entre essas espécies foi reforçada em estudos sobre a filogenia no gênero baseado em dados moleculares (espaçador transcrito interno ITS1,

5.8s e ITS2 do rDNA nuclear) e morfológicos (TORRES-GONZÁLEZ; MORTON, 2005). Entretanto, com base em análise de um conjunto de sementes, viabilidade de mudas e pareamento cromossômico em híbridos, Lutts, Ndikumana e Louant (1991) constataram que *B. ruziziensis* é mais estreitamente relacionada com *B. decumbens* do que *B. brizantha*.

O gênero é caracterizado por uma maioria de espécies poliploides e apomíticas. A apomixia está normalmente associada à poliploidia e esta, por sua vez, frequentemente resulta em irregularidades meióticas levando a baixa fertilidade do pólen. O modo de reprodução sexual, geralmente é encontrado no nível diploide e está associado ao pareamento e divisão cromossômica regular (PEREIRA et al., 2001; VALLE; PAGLIARINI, 2009). 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; GLIENKE; LEGUISAMON, 1994).

As plantas do gênero *Brachiaria*, geralmente são caracterizadas por serem robustas, cespitosas, com 1,5 a 2,0 m de altura, colmos inicialmente prostrados. Seus rizomas são geralmente muito curtos e retorcidos, as inflorescências podem atingir até 40 cm de comprimento, com 4 a 6 racemos, medindo de 7 a 10 cm de comprimento, e são geradas a partir de colmos eretos. Possuem bainhas pilosas e as lâminas foliares são linear-lanceoladas, esparsamente pilosas na face ventral e glabras na face dorsal (SEIFFERT, 1984).

As espécies caracterizam-se por apresentar número básico de cromossomos  $x = 6, 7, \text{ e } 9$ , com predominância de  $x=9$  (DARLINGTON; WYLIE, 1955; DUJARDIN, 1979; MORRONE; ZULOAGA, 1992; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006; VALLE; SAVIDAN, 1996). Valle e Pagliarini (2009) resumiram os dados encontrados na literatura sobre o nível de ploidia de algumas dessas espécies, das quais as de maior interesse agrônomo e econômico 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), *B. dictyoneura* ( $2n = 4x = 36$  e  $2n = 6x = 54$ ), *B. humidicola* ( $2n = 6x = 36$ ,  $2n = 7x = 42$  e  $2n = 9x = 54$ ) e *B. ruziziensis* ( $2n = 2x = 18$ ).

A caracterização cromossômica foi realizada por Bernini e Marin-Morales (2001) em 12 acessos de cinco espécies de *Brachiaria*. 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, a poliploidia está envolvida na evolução desse gênero.

De acordo com Valle e Savidan (1996), plantas naturalmente diploide de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* exibem meiose regular, com a formação de nove bivalentes e modo sexual de reprodução. As plantas tetraploides apresentam meiose bastante irregular, com a formação frequente de univalentes a tetravalentes, e a apomixia como modo de reprodução.

Apesar de existir grande semelhança entre espécies do gênero e haver a possibilidade de se obter cruzamentos interespecíficos, a análise meiótica de híbridos, obtidos por cruzamentos interespecíficos utilizando-se genótipos tetraploides artificiais de *B. ruziziensis* como genitores femininos e genótipos tetraploides de *B. brizantha* e *B. decumbens* como genitores masculinos, tem revelado uma alta frequência de anormalidades meióticas sendo, a maioria delas, na meiose I e relacionadas à segregação irregular de cromossomos, típica de poliploides (ADAMOWSKI; PAGLIARINI; VALLE, 2008; FELISMINO et al., 2008; FELISMINO; PAGLIARINI; VALLE, 2008; FUZINATTO; PAGLIARINI; VALLE, 2007, 2008; MENDES-BONATO et al., 2004, 2006; MENDES-BONATO; PAGLIARINI; VALLE, 2006, 2007; RISSO-PASCOTTO et al., 2004a, 2004b; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2005).

Mendes-Bonato et al. (2006) relataram uma reduzida afinidade entre os genomas parentais em híbridos de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, o qual frequentemente formou bivalentes distribuídos em duas placas metafásicas, sugerindo assim, a ocorrência do pareamento cromossômico dentro do mesmo genoma, denominados genoma R (*B. ruziziensis*) e genoma B (*B. brizantha*). Assincronia de ambos os genomas parentais foi relatado em um híbrido triploide ( $2n = 3x = 27$ ) de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, onde o genoma R (genitor feminino) permaneceu atrasado em relação ao genoma B (genitor masculino) e foi eliminado em micrósporos na tétrade (RISSO-PASCOTTO et al., 2004a).

No entanto, o comportamento meiótico em híbridos interespecíficos não é sempre idêntico, análises meióticas do pareamento cromossômico na diacinese em híbridos demonstram comportamento genótipo específico, ou seja, a afinidade genômica está relacionada com a base genética dos genótipos envolvidos no cruzamento. Adamowski, Pagliarini e Valle (2008), por exemplo, observaram uma alta frequência de multivalentes na diacinese em híbridos de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, demonstrando que as espécies são relacionadas e a introgressão gênica entre elas é possível por meio da recombinação.

Utilizando a citometria de fluxo para avaliação de uma coleção de *Brachiaria* com relação ao conteúdo de DNA nuclear e o nível de ploidia correspondente, Penteado 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 Mpb  $C^{-1}$ , *B. brizantha* tetraploide 1404 Mpb  $C^{-1}$ , *B. brizantha* pentaploide 1743

Mpb C<sup>-1</sup> e *B. humidicola* hexaploide 1953 Mpb C<sup>-1</sup>) já a espécie diploide sexual apresentou menor valor C (*B. ruziziensis* 615 Mpb C<sup>-1</sup>). 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 et al. (2014) nas espécies comerciais *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.

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 (BRA 000591), onde evidenciou-se a última sendo de origem aloploiploide. Com base nos resultados e no conhecimento anterior sobre a apomixia em *B. brizantha*, os autores sugeriram que a origem da apomixia foi provavelmente uma consequência da hibridação (NIELEN et al., 2010).

A coexistência de diferentes genomas, ou seja, aloploiploidia nas espécies de *Brachiaria* também foi evidenciado nos estudos de Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010) através da técnica de FISH. Os autores observaram diferenças no número de loci 5S não apenas entre espécies, mas também dentro das espécies.

A variação observada no número de cromossomos, na quantidade de DNA nuclear, aliada às irregularidades meióticas presentes nos poliploides, sugerem que em *Brachiaria* tenha ocorrido a aloploiploidização de genomas distintos ou ocorreu diferentes processos de poliploidização na história evolutiva do gênero, assim como em outras gramíneas (VALLE; SAVIDAN, 1996).

## 2.2 Avaliações citogenéticas no melhoramento de *Brachiaria*

Plantas forrageiras possuem um importante papel na agropecuária, sendo utilizadas como fonte nutritiva para o gado. Nesse sentido, gramíneas forrageiras como as do gênero *Brachiaria* desempenham um papel primordial na produção de carne e de leite no Brasil, inicialmente por viabilizarem a pecuária em solos ácidos e fracos (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008) e atualmente por possuir espécies com resistência à cigarrinha das pastagens (SOUZA SOBRINHO; AUAD; LÉDO, 2010) e por compor sistemas de integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF) (MACHADO; BALBINO; CECCON, 2011).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2006), as áreas de pastagens são de aproximadamente 170 milhões de hectares e estima-se que, aproximadamente, 85% dessas áreas utilizam cultivares de *Brachiaria* (MACEDO, 2006), dentre as quais, as de maior importância agrônômica são as apomíticas e, geralmente, poliploides *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.), *B. decumbens* Stapf, *B. humidicola* (Rendle) Schweick e a diploide e sexual *B. ruziziensis* (R. Germ & Evrard). Por sua ampla distribuição e adaptação, algumas espécies de *Brachiaria* tem despertado interesse para o melhoramento genético (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Os programas de melhoramento têm utilizado como principal estratégia a avaliação e seleção de genótipos superiores, além de cruzamentos intra e interespecíficos envolvendo *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* tetraploidizada (SOUZA SOBRINHO, 2005; VALLE; PAGLIARINI, 2009). Desta forma, buscam-se obter híbridos persistentes que reúnam características desejáveis de genitores agronomicamente promissores, tais como adaptação a solos ácidos, alta produtividade, bom valor nutritivo e resistência à cigarrinha-das-pastagens (PEREIRA et al., 2001).

Uma das limitações do melhoramento via hibridação no gênero *Brachiaria* é a diferença de ploidia entre as plantas sexuais e apomíticas (ARAÚJO, 2005) o que dificulta os cruzamentos, gerando um baixo número de híbridos e com alto grau de esterilidade (VALLE et al., 2004). Sendo assim, uma estratégia interessante tem sido a tetraploidização artificial da espécie diploide e sexual *B. ruziziensis*, para possibilitar a realização de hibridações interespecíficas com genótipos tetraploides e apomíticos de *B. brizantha* e *B. decumbens* (ISHIGAKI et al., 2009) e assim explorar a variabilidade genética para a seleção de materiais superiores (PEREIRA et al., 2001; SOUZA SOBRINHO, 2005).

A indução da poliploidia é feita utilizando substâncias antimitóticas, tais como a colchicina, um alcaloide amplamente utilizado em espécies forrageiras (PEREIRA et al., 2012). Nesse sentido, vários trabalhos foram desenvolvidos em *Brachiaria*, a partir de sementes germinadas *in vivo* (SWENNE; LOUANT; DURJARDIN, 1981; TIMBÓ et al., 2014), pelo cultivo *in vitro* de sementes germinadas e múltiplos brotos (ISHIGAKI et al., 2009) e segmentos basais (PINHEIRO et al., 2000; SIMIONI; VALLE, 2009).

A primeira cultivar híbrida de *Brachiaria* lançada foi a cultivar Mulato I, que reuniu características favoráveis de *B. ruziziensis* e *B. brizantha* cv. Marandu (SOUZA SOBRINHO, 2005). Posteriormente, o CIAT (Centro Internacional de agricultura Tropical) lançou a cv. Mulato II. Esse híbrido é o resultado de três gerações de cruzamento e seleção, iniciados com o cruzamento de *B. ruziziensis* x *B. decumbens*. As progênies sexuais deste primeiro híbrido foram cruzadas com acessos de *B. brizantha*, o que permitiu a seleção de um clone apomítico que se converteu na cv. Mulato II, a qual foi caracterizada como uma gramínea de alta qualidade e produção forrageira, resistente às cigarrinhas e adaptada aos solos tropicais ácidos e bem drenados (ARGEL et al., 2007).

O melhoramento via hibridação depende do desenvolvimento de métodos seguros para certificação dos cruzamentos e identificação de

híbridos obtidos, uma vez que, em *Brachiaria*, não se faz emasculação prévia ao cruzamento e, portanto, algumas plantas da progênie podem ser fruto de autofecundação. Entre as possibilidades, há os descritores morfológicos, no entanto, estes podem sofrer influência do ambiente além de só poderem ser aplicados na planta adulta, após o florescimento (PEREIRA et al., 2001).

Outra possibilidade são os marcadores moleculares, considerados como ferramenta segura e precoce para identificação de híbridos. Além de acessarem diretamente o genótipo da planta, os marcadores não sofrem influência do ambiente e podem ser utilizados em qualquer estágio de desenvolvimento (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; SILVA et al., 2005). Atualmente, a Embrapa Gado de Leite vem testando marcadores do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites específicos para *Brachiaria*. Estes marcadores são codominantes, por isso são considerados ideais para a certificação de híbridos (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Esta avaliação também pode ser realizada através da análise citogenética convencional, no entanto, o híbrido apresenta o mesmo número cromossômico dos parentais ( $2n = 4x = 36$ ) e esta avaliação deverá ser feita com base em diferenças na morfologia cariotípica, conforme estudos realizados por Bernini e Marin-Morales (2001).

Alternativamente, a identificação de híbridos pode ser realizada por meio da Hibridização *in situ* genômica (GISH). Esta técnica permite que os cromossomos de diferentes genitores em plantas híbridas sejam diferencialmente identificados (GUERRA, 2004; RAINA; RANI, 2001), além de possibilitar o entendimento de outros fenômenos decorrentes do evento de hibridização e poliploidização, como os rearranjos genômicos e eliminação cromossômica, bem como para entender as relações genômicas entre as espécies do gênero. No entanto, não há relatos sobre a utilização dessa técnica em espécies e híbridos de *Brachiaria*.

Em alguns grupos de plantas, tais como, *Pennisetum* (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013; REIS et al., 2014), *Lolium* e *Festuca* (CAO et al., 2000; KOPECKÝ et al., 2006; KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKA, 2010) e trigo (GERMAND et al., 2005) tem-se utilizado sondas genômicas que são formadas pelo DNA genômico total de uma espécie, para distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploidoides (GUERRA, 2004; RAINA; RANI, 2001).

A técnica de GISH foi desenvolvida originalmente para demonstrar que os genomas parentais de um híbrido entre *Hordeum chilense* e *Secale africanum* podiam ser reconhecidos durante todo o ciclo celular e que ocupavam diferentes domínios no núcleo interfásico (SCHWARZACHER et al., 1989). Peñalosa e Pozzobon (2007) destacam as aplicações de GISH na caracterização de genomas e cromossomos em poliploides híbridos, plantas híbridas, aloploidoides parciais, assim como na identificação de translocações e inversões, contribuindo desta forma para o entendimento dos processos que levaram à especiação.

Vários estudos já utilizaram as técnicas de hibridização fluorescente e genômica *in situ* (FISH e GISH) para melhorar o conhecimento e diferenciação do genoma da planta (WOLNY et al., 2011; ZWIERZYKOWSKI et al., 2008), solucionar alguns processos de evolução cromossômica, incluindo rearranjos estruturais (KOPECKÝ et al., 2006; KSIAZCZYK et al., 2014) e estudos sobre relações filogenéticas e genômicas (KOPECKÝ et al., 2006; REIS et al., 2014). A GISH fornece um resultado visual e direto para investigação da composição e relação genômica entre espécies.

### **2.3 Organização da cromatina e epigenética**

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). Os nucleossomos adjacentes são interligados por uma dupla fita de DNA livre, denominado DNA de ligação, com comprimento que varia de 15 a 55 pb (HESLOP-HARRISON, 2000).

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 por modificações pós-síntese de histonas e DNA metilado. Estes eventos estão relacionados com o controle da expressão gênica e comportamento dos cromossomos durante a divisão celular (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; FUCHS et al., 2006). Segundo Lodish et al. (2014) a cromatina em regiões cromossômicas que não estão sendo transcritas encontra-se sob a forma condensada, em fibra de 30 nm ou em uma estrutura mais condensada, enquanto que as regiões da cromatina transcricionalmente ativas encontra-se na forma distendida de fibra de 10 nm.

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).

O termo heterocromatina, proposto por Heitz em 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 (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; SUMNER, 2003).

A heterocromatina desempenha um papel importante na manutenção de milhares de genes e elementos de DNA seletivamente reprimidos. Várias interações moleculares, tais como metilação de DNA e modificações de histonas, bem como o recrutamento de complexos de proteínas, são necessárias para iniciar e manter o estado reprimido da heterocromatina ao longo das divisões celulares (FRANSZ; HOOPEN; TESSADORI, 2006).

A eucromatina, em contraste com a heterocromatina, é uma região do cromossomo menos condensada, 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 passadas 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; SHAOLEI; MENG, 2010).

Além das histonas, a cromatina durante a intérfase é composta por um complexo de proteínas incluindo fatores de transcrição, grupos de proteínas de alta mobilidade, topoisomerasas e polimerases de RNA e DNA (KOSHLAND; STRUNNIKOV, 1996).

Uma característica 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, deaminação e isomerização de prolina, que geralmente estão associadas com funções distintas (CHEN; SHAOLEI; MENG, 2010; KOUZARIDES, 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.

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, como a topoisomerase II, o complexo condensina e a coesina (MOSER; SWEDLOW, 2011).

A metilação do DNA que ocorre diretamente sobre a cadeia de nucleotídeos, é o tipo mais estável de modificação epigenética. Normalmente está relacionado com o silenciamento gênico e também pode alterar o padrão de modificação de histonas, resultando na condensação da cromatina. A metilação do DNA é estabelecida, mantida e modificada por uma série de enzimas específicas e geralmente é transferida para a próxima geração durante a mitose ou meiose (HE; ELLING; DENG, 2011).

#### **2.4 Modificações pós-traducionais das histonas e metilação do DNA**

As modificações pós-traducionais nas histonas ou a combinação de modificações (JIN et al., 2008) e a metilação do DNA (LAW; JACOBSEN, 2010), implicam em diferentes efeitos na estrutura e função da cromatina e são correlacionadas com funções biológicas particulares, tais como a ativação ou silenciamento gênico. 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 histonas e o DNA são modificados por enzimas específicas modificadoras de histonas (EMH) e de DNA, respectivamente. As enzimas modificadoras de histonas juntamente com os complexos remodeladores de cromatina e a metilação de DNA são componentes que ajudam a compactar e organizar o genoma em diferentes domínios de cromatina. Esta organização interfere em muitos aspectos do comportamento cromossômico, como a transcrição, a recombinação e o reparo do DNA (KUO; ALLIS, 1998).

Em contraste com o DNA, onde a metilação das citosinas é a única marca covalente identificada, as caudas N-terminal das histonas estão sujeitas a uma variedade de modificações pós-síntese, sendo assim, o efeito de cada modificação de histonas (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, deaminação 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.

Embora as histonas e suas modificações por enzimas sejam conservadas, vários estudos têm demonstrado que a distribuição cromossômica das modificações individuais ou conjuntas (acetilação, metilação e fosforilação) pode diferir ao longo do ciclo celular, bem como entre grupos de eucariotos (FUCHS et al., 2006; HOUBEN et al., 2003).

As modificações de histonas, assim como a modificação no DNA (metilação das citosinas) podem constituir marcas características de determinadas regiões cromossômicas. Por exemplo, a acetilação das lisinas 5 e 8 da histona H4 e a metilação da histona H3 na lisina 4 são encontradas nas regiões eucromáticas dos cromossomos de insetos e plantas (DHAR; FUCHS; HOUBEN, 2009; TURNER, 1992). Por outro lado, a mono e dimetilação da histona 3 na lisina 9 são marcas que ocorrem na heterocromatina em plantas (DHAR; FUCHS; HOUBEN, 2009). Já modificações no próprio DNA (metilação das citosinas) em cromossomos de plantas e animais estão associadas na maioria das vezes com a heterocromatina (LAW; JACOBSEN, 2010).

### 2.4.1 Metilação de histonas

A metilação das histonas é catalisada pela enzima histona metiltransferase (HMT), ocorre principalmente sobre as cadeias laterais da lisina (posições 4, 9, 17, 27, 36 e 79 da histona H3 e 20 e 59 da histona H4) e arginina (posições 2, 17 e 26 da histona H3 e 3 da histona H4), 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 di-metilada assimetricamente (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; FUCHS et al., 2006).

A metilação de algumas isoformas da H3K4, H3K36 e H3K79 potencializa a transcrição e são consideradas marcas de cromatina aberta, enquanto que a metilação de isoformas de H3K9, H3K27 e H4K20 marcam a estrutura da cromatina reprimida (ou da repressão gênica) (FUCHS et al., 2006). Entretanto, a ocorrência da maioria das histonas metiladas e sua distribuição nuclear podem variar entre diferentes organismos (FUCHS et al., 2006; HOUBEN et al., 2003).

Em *Drosophila* e algumas espécies de plantas, H3K9me1/me2 e H3K27me1/me2 são enriquecidas nas regiões cromossômicas mais condensadas (FUCHS et al., 2006). Em mamíferos, as histonas H3K9me3 e H4K20me3 marcam preferencialmente a heterocromatina constitutiva (SCHOTTA et al., 2004), enquanto a heterocromatina facultativa representada pelo cromossomo X é marcada com H3K9/me2 e H3K27/me3 (ROUGEULLE et al., 2004). Nas espécies vegetais *Costus spiralis* e *Eleutherine bulbosa* a marcação com o anticorpo contra H3K4me2 foi observada nas regiões de condensação tardia, enquanto a marcação com H3K9me2 foi mais intensa na cromatina de condensação precoce (FEITOZA; GUERRA, 2011).

Embora algumas isoformas de histonas estejam associadas a eucromatina ou heterocromatina, alguns autores tem observado que sua distribuição pode estar relacionada ao tamanho e organização do genoma (HOUBEN et al., 2003). Houben et al. (2003) observaram que a metilação da histona H3K9 restrita à heterocromatina teve sua distribuição influenciada pelo tamanho genômico, diferente de H3K4, que não depende do tamanho do genoma e é restrita citologicamente à eucromatina. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, com tamanho genômico em torno de ~170 Mpb, observou-se que os pontos de metilação das histonas H3K9me1,2 H3K27me1,2 e H4K20me1 foram restritos à heterocromatina organizada em cromocêntricos nos núcleos interfásicos, enquanto que metilação da H3K4 ocorria apenas na eucromatina, associada a atividade transcricional. Ao contrário, em *Vicia faba* (~12.810 Mpb), a metilação da H3K9 foi uniforme ao longo de todo o cromossomo, não apresentando relação direta com a heterocromatina.

Em um estudo de comparação entre cromossomos A e cromossomos B do complemento cromossômico da espécie *Brachycome dichromosomatica*, Marschner, Kumke e Houben (2007) verificaram que os cromossomos B apresentam uma redução no nível de metilação na histona H3K4, indicando baixa atividade transcricional em relação aos cromossomos tipo A. Os cromossomos B também apresentaram quantidade de heterocromatina semelhante aos cromossomos A confirmado pela imunocoloração das histonas H3K9 e H3K27. A redução no nível de H3K4, uma modificação ligada à atividade transcricional da cromatina ativa, justifica em parte a observação de que os cromossomos B são geralmente transcricionalmente inativos.

Vale ressaltar que, a metilação de histonas não apresenta uma regra simples, pois há exceções como, por exemplo, a metilação nas lisinas 4 e 9 da histona H3, que podem apresentar tanto a atividade como o silenciamento transcricional (FUCHS et al., 2006).

### 2.4.2 Metilação de DNA

A metilação do DNA envolve a adição (ligação covalente) de um grupo metil ao carbono-5 da citosina, pela enzima DNA metiltransferase (Mtases). Ocorre em sítios simétricos CpG (citosina seguida de uma guanina) e CpNpG (N= A, C ou T) e em sítios assimétricos CpHpH (H= C, A ou T) (FENG et al., 2010; TSAFTASRIS et al., 2005). A metilação nesses sítios pode promover o silenciamento gênico e também alterar o padrão de modificação de histonas, resultando na condensação da cromatina (JACKSON et al., 2004). O processo de desmetilação ocorre por ação de proteínas DNA glicosilases (PROBST; DUNLEAVY; ALMOUZNI, 2009) e pode ocorrer como resultado de uma deficiência na manutenção enzimática após a replicação do DNA ou um processo enzimático ativo envolvendo glicosilases para proteger os genes de uma metilação potencialmente deletéria (PENTERMAN et al., 2007).

A metilação do DNA exerce os seus efeitos através da repressão da expressão gênica. Estudos de numerosos genes tecido-específicos utilizando diferentes técnicas mostraram uma clara correlação entre o estado de metilação e atividade do gene. Em plantas, as evidências do papel da metilação na supressão da expressão do gene, surgiu a partir de estudos sobre a regulação de elementos transponíveis (FEDOROFF, 1996) e silenciamento de transgene em plantas geneticamente modificadas (PASZKOWSKI; WHITHAM, 2001).

Sequências de DNA repetidas em *tandem*, incluindo DNAs satélites e DNA multicópias, geralmente são encontradas fortemente metiladas, resultando em um alto nível de condensação da cromatina, enquanto que o processo de desmetilação leva a descondensação da cromatina (COLOT; ROSSIGNOL, 1999).

Experimentos utilizando inibidores de metiltransferases demonstraram a relação positiva entre a metilação das citosinas e o silenciamento gênico, através de dois principais mecanismos (BIRD;

WOLFFE, 1999; LEWIN, 2004). Sendo assim, a alteração na transcrição gênica, como consequência da metilação do DNA pode ocorrer de duas maneiras: impedindo fisicamente a ligação das proteínas transcricionais às suas sequências regulatórias, afetando a expressão gênica ou o DNA metilado em associação com outras proteínas recrutam histonas-desacetilases e outras proteínas de remodelamento, que modificam as histonas, inativando e silenciando determinadas regiões da cromatina (BIRD; WOLFFE, 1999).

Embora na maioria dos casos, a metilação do DNA seja uma marca epigenética estável, níveis reduzidos de metilação podem ser observados durante o desenvolvimento de plantas e mamíferos. Esta perda da metilação pode ocorrer de forma passiva, através da replicação na ausência de vias de metilação de manutenção funcional, ou ativamente, removendo citocinas metiladas (LAW; JACOBSEN, 2010).

A metilação do DNA em plantas e animais, normalmente coincide com a heterocromatina detectada pelo bandeamento-C, no entanto, existem algumas exceções. Em *Allium cepa*, a metilação ocorre preferencialmente nas regiões terminais detectadas com o bandeamento-C, mas foi detectada também em alguns sítios proximais e intersticiais (RUFFINI-CASTIGLIONE; GIRALDI; FREDIANI, 1995). Em *Arabidopsis thaliana* a heterocromatina pericentromérica, composta de DNA repetido em *tandem* e sequências dispersas é metilada em todos os cromossomos (FRANSZ; HOOPEN; TESSADORI, 2006). Em *Triticale* a metilação do DNA não apresentou uma posição preferencial em regiões cromossômicas específicas, sendo observada uma distribuição não uniforme ao longo dos cromossomos. (CASTILHO et al., 1999).

Resultados obtidos em estudos com diferentes espécies de plantas apoiam fortemente o conceito de que a metilação do DNA desempenha um papel fundamental no controle da estrutura da cromatina. Em geral, a metilação do DNA foi observada nas regiões de heterocromatina pericentromérica, os quais estão associados com elementos transponíveis e outras sequências repetitivas (HE; ELLING; DENG, 2011). Isto sugere que

uma das funções mais importantes da metilação do DNA é a supressão da atividade de transposons e a manutenção da estabilidade do genoma (GOLL; BESTOR, 2005).

Entretanto, a metilação do DNA também foi encontrada em regiões totalmente eucromáticas, um grande número de proteínas que codificam para genes são metiladas nas regiões transcritas, em contraste com a baixa frequência de metilação dentro das regiões promotoras. Em síntese, o que é consistente em todos os estudos é que há em todo o genoma significativa metilação de DNA em transposons ou genes relacionados à transposons (genes TE), pseudogenes e outras sequências repetitivas (HE; ELLING; DENG, 2011).

O padrão de variação na metilação do DNA entre espécies já foi investigado. Vaughn et al. (2007) realizaram uma comparação do padrão de metilação do DNA em um único cromossomo entre dois ecótipos distintos de *Arabidopsis*. Os autores encontraram um conservado padrão de metilação de transposons e um diversificado padrão de metilação gênica entre os dois ecótipos. Feng et al. (2010) realizaram a comparação do padrão de metilação de DNA do genoma entre oito espécies, incluindo três de plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa*). Um padrão de metilação de DNA semelhante entre as espécies de plantas foi observado. Todos os três tipos de metilação de DNA (CG, CHG e CHH) foram detectados. A metilação CHH foi distribuída amplamente no genoma de *O. sativa*, já em *A. thaliana* e *P. trichocarpa* foi enriquecida na heterocromatina pericentromérica. Um maior nível de metilação CHG em sequências repetitivas e elementos transponíveis foram observados em plantas lenhosas (*P. trichocarpa*) em comparação com plantas herbáceas (*O. sativa* e *A. thaliana*). Os autores sugerem que a divergência na metilação de DNA ocorreu durante a evolução das espécies.

Pesquisa sobre respostas epigenéticas envolvendo a hibridação e a formação de poliploides foi realizada no gênero *Spartina*. A hibridação entre o europeu hexaploide *Spartina maritima* e o americano hexaploide *Spartina*

*alterniflora* ocorreu duas vezes no passado, o que resultou em dois híbridos que são geneticamente uniformes. O estudo demonstrou que o genoma dos híbridos tem sofrido uma intensa repadronização da metilação quando comparados a seus ancestrais. Além disso, uma porcentagem alta de fragmentos recém metilados foram observados nos dois híbridos (SALMON; AINOUCHE; WENDEL, 2005).

## REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 87, n. 1, p. 33-38, Apr. 2008.
- AKIYAMA, Y.; YAMADA-AKIYAMA, H.; EBINA, M. Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. **Grassland Science**, Hoboken, v. 56, n. 4, p. 217-223, 2010.
- AMBIEL, A. C. et al. *Brachiaria* germplasm dissimilarity as shown by RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 1, p. 55-64, Jan. 2010.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Crop Science**, Madison, v. 53, n. 5, p. 1917-1924, 2013.
- ASSIS, G. M. L. et al. Genetic divergence in *Brachiaria* species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 2, n. 3, p. 331-338, 2002.
- ARAÚJO, A. C. G. Evidence of sexuality in induced tetraploids of *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 144, n. 1, p. 39-50, Jul. 2005.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, n. 1, p. 61-76, feb. 2008.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato II (Brachiaria híbrida CIAT 36087)**. Cali: CIAT, 2007. 22 p.
- AZEVEDO, A. L. S. et al. High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 3530-3538, 2011.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, Cambridge, v. 104, n. 407, p. 157-171, Jan. 2001.

BIRD, A. P.; WOLFEE, A. P. Methylation-induced repression-belts, braces and chromatin. **Cell**, Cambridge, v. 99, n. 5, p. 451-454, Nov. 1999.

BRADBURY, E. M. Reversible histone modification on the chromosome cell cycle. **Bioessays**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 9-16, Apr. 1992.

CAO, M. et al. Genomic in situ hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. **Genome**, Ottawa, v. 43, n. 2, p. 398-403, Apr. 2000.

CASTILHO, A. et al. 5-Methylcytosine distribution and genome organization in Triticale before and after treatment with 5-azacytidine. **Journal of Cell Science**, London, v. 112, n. 23, p. 4397-4404, Dec. 1999.

CHEN, M.; SHAOLEI, L. V.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. **Development Growth & Differentiation**, Nagoya, v. 52, n. 7, p. 555-566, Sept. 2010.

COLOT, V.; ROSSIGNOL, J. L. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. **Bioessays**, Cambridge, v. 21, n. 5, p. 402-411, May 1999.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 1955. 519 p.

DHAR, M. K.; FUCHS, J.; HOUBEN, A. Distribution of eu- and heterochromatin in *Plantago ovate*. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 125, n. 3, p. 235-240, Sept. 2009.

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.

FEDOROFF, N. Epigenetic regulation of *Spm*. In: RIGGS, A.; MARTIENSSEN, R.; RUSSO, V. (Ed.). **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. p. 575-592.

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, 2011.

FELISMINO, M. F. et al. Mitotic behavior in root tips of *Brachiaria* genotypes with meiotic chromosome elimination during microsporogenesis.

**Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 336-341, 2008.

FELISMINO, M. F.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. A differential phenotypic expression of a divergent spindle mutation in interspecific *Brachiaria* hybrids. **Cell Biology International**, Aberdeen, v. 32, n. 11, p. 1459-1463, 2008.

FENG, S. et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 19, p. 8689-8694, Apr. 2010.

FENG, S.; JACOBSEN, S. E. Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 179-186, Apr. 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p. (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

FRANSZ, P.; HOOPEN, R. ten; TESSADORI, F. Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 71-82, Feb. 2006.

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

FUZINATTO, V. A.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Evaluation of microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* hybrid (Poaceae) collected in distinct years. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 424-432, 2008.

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, 2007.

GERMAND, 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.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 74, p. 481-514, 2005.

GUERRA, M. **FISH**: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176 p.

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

HE, G.; ELLING, A. A.; DENG, X. W. The epigenome and plant development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 411-435, 2011.

HE, G. et al. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 31, p. 17-33, 2010.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 617-635, May 2000.

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

HOUBEN, A. et al. Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 967-973, Mar. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo agropecuário 2006**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, 2006. 777 p.

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

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of *in vitro* multiple-shoot clumps and seedlings. **Japanese Society of Grassland Science**, Tokyo, v. 55, n. 3, p. 164-170, 2009.

JACKSON, J. et al. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. **Chromosoma**, Berlin, v. 12, n. 6, p. 308-315, Mar. 2004.

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, Nov. 2008.

- KOPECKÝ, D. et al. Chromosome pairing of individual genomes in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), its progenitors, and hybrids with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 124, n. 2, p. 170-178, May 2009.
- KOPECKÝ, D. et al. Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 113, n. 4, p. 731-742, Aug. 2006.
- KOSHLAND, D.; STRUNNIKOV, A. Mitotic chromosome condensation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 12, p. 305-33, 1996.
- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.
- KSIAŻCZYK, T. et al. Genome-dependent chromosome dynamics in three successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrid. **Protoplasma**, Vienna, v. 252, n. 4, p. 985-996, 2014.
- KSIAŻCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKA, E. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 51, n. 4, p. 449-460, Dec. 2010.
- KUO, M. H.; ALLIS, C. D. Roles of histone acetyltransferases and desacetylases in gene regulation. **Bioessays**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 615-626, Aug. 1998.
- LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Review Genetics**, London, v. 11, n. 3, p. 204-220, Mar. 2010.
- LEWIN, B. **Genes VIII**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004. 1027 p.
- LODISH, H. F. et al. **Molecular cell biology**. 7<sup>th</sup> ed. New York: W. H. Freeman, 2014. 1054 p.
- LUTTS, S.; NDIKUMANA, J.; LOUANT, B. P. Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: meiotic behavior, pollen viability and seed set. **Euphytica**, Wageningen, v. 57, n. 3, p. 267-274, Sept. 1991.

MAASS, B. L. Identifying and naming *Brachiaria* species. In: MILES, J. W. et al. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 9-13.

MACEDO, M. C. M. Aspectos edáficos relacionados com a de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu. In: BARBOSA, R. A. (Ed.). **Morte de pastos de braquiárias**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2006. p. 35-65.

MACHADO, L. A. Z.; BALBINO, L. C.; CECCON, G. **Integração lavoura-pecuária-floresta: 1.**, estruturação dos sistemas de integração lavoura-pecuária. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2011. 46 p.

MARSCHNER, S.; KUMKE, K.; HOUBEN, A. B chromosomes of *B. dichromosomatica* show a reduced level of euchromatic histone H3 methylation marks. **Chromosome Research**, Hudson, v. 15, n. 2, p. 215-222, Feb. 2007.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Abnormal pollen mitoses (PM I and PM II) in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria decumbens* (Gramineae). **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 83, n. 3, p. 279-283, 2004.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 4, p. 711-714, 2006.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 122-125, 2006.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 831-837, 2007.

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. 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, 2011.

- 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.
- PASZKOWSKI, J.; WHITHAM, S. A. Gene silencing and DNA methylation processes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 2, p. 123-129, Apr. 2001.
- PEÑALOZA, A. D. P. S.; POZZOBON, M. T. Caracterização citogenética de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 308-342.
- 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).
- PENTERMAN, J. et al. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 104, n. 16, p. 6752-6757, Feb. 2007.
- 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.
- PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, 2012.
- PINHEIRO, A. A. et al. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicines. **Plant Cell Reports**, Hudson, v. 19, n. 3, p. 274-278, 2000.
- PROBST, A. V.; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 10, n. 3, p. 192-206, 2009.
- RAINA, S. N.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. **Methods in Cell Science**, Dordrecht, v. 23, n. 1/3, p. 83-104, 2001.
- REIS, G. B. et al. Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 3, n. 3, p. 31-41, 2014.

- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Org.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Colombia: CIAT, 1996. p. 1-15.
- RISSO-PASCOTTO, C. et al. Asynchronous meiosis in an interspecific hybrid of *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha*. **Plant Cell Reports**, Hudson, v. 23, n. 5, p. 304-310, 2004a.
- RISSO-PASCOTTO, C. et al. Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. **Plant Cell Reports**, Hudson, v. 22, n. 12, p. 945-950, 2004b.
- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Meiotic behavior in interspecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 145, n. 1/2, p. 155-159, 2005.
- RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Research and Crop Evolution**, Gatersleben, v. 53, n. 1, p. 7-10, Feb. 2006.
- ROUGEULLE, C. et al. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. **Molecular and Cell Biology**, Washington, v. 24, n. 12, p. 5475-5484, June 2004.
- RUFFINI CASTIGLIONE, M.; GIRALDI, E.; FREDIANI, M. The DNA methylation pattern of *Allium cepa* metaphase chromosomes. **Biologisches Zentralblatt**, Leipzig, v. 114, n. 1, p. 57-66, Apr. 1995.
- SALMON, A.; AINOUCHE, M. L.; WENDEL, J. F. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1163-1175, Apr. 2005.
- SCHOTTA, G. et al. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. **Genes & Development**, New York, v. 18, n. 11, p. 1251-1262, May 2004.
- SCHWARZACHER, T. et al. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, London, v. 64, n. 3, p. 315-324, 1989.
- SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero Brachiaria**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1984. 83 p.

- SILVA, M. P. et al. Diversidade genética e identificação de híbridos por marcadores RAPD em feijão-de-vagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 3, p. 531-539, 2005.
- SIMIONI, C.; VALLE, C. B. do. Chromosome duplication in *Brachiaria* (A. rich.) Stapf allows intraspecific crosses. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 9, n. 4, p. 328-334, 2009.
- SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: \_\_\_\_\_. **Forragicultura e pastagens: temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2005. p. 65-120.
- SOUZA SOBRINHO, F.; AUAD, A. M.; LÉDO, F. J. S. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v. 10, n. 1, p. 83-88, Jan. 2010.
- SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Berlin: Blackwell, 2003. 287 p.
- SWENNE, A.; LOUANT, B.; DURJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotetraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrad (Graminée). **Agronomie Tropicale**, Paris, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.
- TIMBÓ, A. L. O. et al. Nuclear DNA content and chromosome number in *Brachiaria* spp. genotypes. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 1, p. 62-67, 2014.
- TOHME, J. et al. Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 196-204.
- TORRES GONZÁLEZ, A. M.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 37, n. 1, p. 36-44, Oct. 2005.
- TSAFTARIS, A. S. et al. Epigenetic mechanisms in plants and their implications in plant breeding. In: INTERNATIONAL CONGRESS “IN THE WAKE OF THE DOUBLE HELIX: FROM THE GREEN REVOLUTION TO THE GENE REVOLUTION”, 2005, Bologna. **Proceedings...** Bologna, 2005. p. 157-171.
- TURNER, B. M. Histones H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. **Cell**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 375-384, Apr. 1992.

VALLE, C. B. et al. Apomixia e sua utilização no melhoramento de *Brachiaria*. In: CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. (Ed.). **Clonagem de plantas por sementes: estratégias de estudo da apomixia**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 47-65.

VALLE, C. B.; 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.; 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.; PAGLIARINI, M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement, volume 5 forage crops**. Boca Raton: CRC, 2009. p. 103-151.

VALLE, C. B.; 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. (CIAT. Publication, 259).

VAUGHN, M. W. et al. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 7, p. 174, July 2007.

WOLNY, E. et al. Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. **Chromosoma**, Berlin, v. 120, n. 2, p. 199-212, 2011.

ZAO, M. et al. Novel genomes and genome constitutions identified by GISH and 5S rDNA and knotted1 genomic sequences in the genus *Setaria*. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 9, p. 1-12, Dec. 2013.

ZWIERZYKOWSKI, Z. et al. Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* revealed by genomic in situ hybridization (GISH). **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 575-585, Apr. 2008.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**Constituição e relação genômica em espécies e híbridos de *Brachiaria*  
(Poaceae)**

## RESUMO

*Brachiaria* pertence à família Poaceae e compreende espécies com diferentes níveis de ploidia e modo de reprodução. Apesar da grande importância econômica e agrônômica das espécies forrageiras e elevada frequência de poliploides, estudos específicos sobre a constituição e relação genômica dentro do gênero *Brachiaria* são restritos. Nesse sentido, análises de citogenética molecular podem auxiliar no conhecimento e diferenciação dos genomas, uma vez que fornecem um resultado visual e direto para investigação das relações filogenéticas das espécies. O objetivo do presente estudo foi investigar as relações genômicas entre *B. ruziziensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* e híbridos interespecíficos por meio da técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH) com DNA genômico total, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sequência de DNA repetitivo rDNA 45S e 5S e a quantificação do tamanho do genoma nuclear por citometria de fluxo. O híbrido 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*) apresentou número cromossômico ( $2n = 4x = 36$ ), quantidade de DNA (3,24 pg) e sítios de rDNA (quatro sinais de 45S e sete sinais de 5S) conforme o esperado a partir do cruzamento de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*. O híbrido cv. Mulato II [(*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) x *B. brizantha*] também apresentou  $2n = 36$  cromossomos, sete sinais de rDNA 5S, quatro sinais de 45S e um aumento no conteúdo de DNA (3,83 pg) em relação à média dos genitores (3,43 pg). No híbrido 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*), todas as metáfases apresentaram  $2n = 38$  cromossomos, excedendo 2 cromossomos do esperado que representou um aumento de cerca de 0,29 pg (9%) de DNA, considerando a média do conteúdo de DNA dos genitores (3,33 pg) e a presença de cinco sinais de rDNA 45S e sete sinais de 5S. A análise da GISH nos híbridos permitiu identificar a ocorrência de rearranjos e diferenças da contribuição dos genomas genitores na constituição do híbrido. Com base nos resultados da GISH foi proposta a constituição genômica de *B. brizantha* ( $BBB^1B^1$ ), *B. decumbens* ( $B^1B^1B^2B^2$ ) e *B. ruziziensis* ( $B^2B^2$ ). Os genomas B,  $B^1$  e  $B^2$  foram considerados homeólogos, com menor afinidade entre os genomas B e  $B^2$ .

**Palavras chave:** FISH. GISH. Citometria de fluxo. rDNA 5S. rDNA 45S.

## ABSTRACT

*Brachiaria* belongs to Poaceae family and comprises species with different ploidy levels and reproduction mode. Despite the great economic and agronomic importance of the forage species and high frequency of polyploid, specific studies about genomic constitution and relationship within of the *Brachiaria* genus are restricted. Accordingly, molecular cytogenetic analysis can aid the understanding and differentiation of genomes, since they provide a visual and direct result for investigation of the phylogenetic relationships of species. The aim of this study was to investigate the genomic relationship among *B. ruziziensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* and interspecific hybrids by means of Genomic in situ Hybridization (GISH) with total genomic DNA, Fluorescence in situ Hybridization (FISH) with repetitive sequences of rDNA of 45S and 5S and quantification of the nuclear genome size by means of flow cytometry. The hybrid 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*) presented chromosome number ( $2n = 4x = 36$ ), DNA amount (3.24 pg) and rDNA sites (four signals of 45S and seven signals 5S) as expected, from the crossing between *B. ruziziensis* and *B. brizantha*. The hybrid cv. Mulato II [(*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) x *B. brizantha*] also presented  $2n = 36$  chromosomes, seven signals of 5S rDNA, four signals of 45S and an increase in DNA content (3.83 pg) compared to the average of the parents (3.43 pg). The hybrid 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) presented all metaphases with  $2n = 38$  chromosomes, exceeding 2 chromosomes comparing to the expected number and an increase of 0.29 pg (9%) of DNA, considering the average DNA content of the parents (3.33 pg ) and the presence of five signals of 45S rDNA and seven signals of 5S. The analysis of GISH in the hybrid indicated the occurrence of rearrangements and difference of the contribution of genome parent in the constitution of hybrid. Based on GISH results, was proposed the genomic constitution of *B. brizantha* ( $BBB^1B^1$ ), *B. decumbens* ( $B^1B^1B^2B^2$ ) and *B. ruziziensis* ( $B^2B^2$ ). The genomes B,  $B^1$  and  $B^2$  were considered homeologous, with lower affinity between the genomes B e  $B^2$ .

**Keywords:** FISH. Flow cytometry. GISH. 5S rDNA. 45S rDNA.

## 1 INTRODUÇÃO

Gramíneas do gênero *Brachiaria* (Trinius) Grisebach [(syn. *Urochloa* Hochst. ex A.Rich.) R.D.Webster], são membros da tribo Paniceae, subfamília Panicoideae e família Poaceae, reúnem cerca de 100 espécies (Renvoize *et al.*, 1996), distribuídas por toda região tropical e subtropical, com grande concentração no continente Africano, incluindo espécies com diferentes níveis de ploidia e modo de reprodução, algumas de grande importância econômica sendo utilizadas como forrageiras (Souza Sobrinho, 2005; Valle e Pagliarini, 2009).

Atualmente, as espécies de *Brachiaria* que apresentam maior valor agrônomo são as apomíticas e, geralmente, poliploides *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.), *B. decumbens* Stapf, *B. humidicola* (Rendle) Schweick e a diploide e sexual *B. ruziziensis* (R. Germ & Evrard). Por sua ampla variabilidade, distribuição e adaptação, algumas espécies de *Brachiaria* tem despertado interesse para o melhoramento genético (Valle e Pagliarini, 2009).

As espécies de *Brachiaria* caracterizam-se por apresentar número básico de cromossomos  $x = 6, 7, \text{ e } 9$ , com predominância de  $x=9$  (Darlington e Wylie, 1955; Dujardin, 1979; Morrone e Zuloaga, 1992; Valle e Savidan, 1996; Risso-Pascotto *et al.*, 2006). A caracterização cromossômica de 12 acessos e cinco espécies demonstrou haver variação na morfologia cromossômica entre espécies e dentro de acessos de uma mesma espécie, com o mesmo nível de ploidia (Bernini e Marin-Morales, 2001).

Estudos específicos sobre a relação genômica dentro do gênero *Brachiaria* são restritos. Análises citológicas, morfológicas e moleculares têm contribuído para o estabelecimento de uma relação entre as espécies. Análise de divergência genética baseada em caracteres morfológicos (Renvoize *et al.*, 1996; Assis *et al.*, 2002), marcadores moleculares RAPD

(Tohme *et al.*, 1996; Ambiel *et al.*, 2010) e ISSR (Azevedo *et al.*, 2011) classificaram *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* em um mesmo grupo. A proximidade filogenética entre essas espécies foi confirmada por estudos sobre a filogenia no gênero baseado em dados moleculares (espaçador transcrito interno ITS1, 5.8s e ITS2 do rDNA nuclear) e morfológicos (Torres González e Morton, 2005). No entanto, ainda não há clareza com relação à caracterização/composição dos genomas, que foram a princípio designados, a partir de estudos com meiose, com as iniciais dos nomes científicos das espécies, sendo genoma R para *B. ruziziensis* e B para *B. brizantha*.

Além dessas informações, o pareamento cromossômico na meiose em híbridos interespecíficos é um bom método para avaliar as relações genômicas entre espécies e auxiliar no estabelecimento da filogenia no gênero. Apesar de existir grande semelhança entre as espécies de *Brachiaria* e haver a possibilidade de cruzamentos interespecíficos, em análise meiótica Mendes-Bonato *et al.* (2006b) relataram uma reduzida afinidade entre os genomas parentais em híbridos de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, o qual frequentemente formou bivalentes distribuídos em duas placas metafásicas, sugerindo assim, a ocorrência do pareamento cromossômico intragenoma, denominados genoma R (*B. ruziziensis*) e genoma B (*B. brizantha*). A assincronia entre os genomas parentais foi também relatado em um híbrido triploide ( $2n = 3x = 27$ ) de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, onde os cromossomos do genoma R (genitor feminino) permaneceram atrasados em relação aos do genoma B (genitor masculino) e foram eliminados em micrósporos na tétrade (Risso-Pascotto *et al.*, 2004).

No entanto, o comportamento meiótico em híbridos interespecíficos não é sempre idêntico, análises meióticas do pareamento cromossômico na diacinese em híbridos demonstraram comportamento genótipo-específico, ou seja, a afinidade genômica está relacionada com a base genética dos genótipos envolvidos no cruzamento, o que tende a dificultar a definição das relações genômicas (Valle e Pagliarini, 2009). Adamowski *et al.* (2008), por

exemplo, observaram uma alta frequência de multivalentes na diacinese em híbridos de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*, demonstrando que as espécies são relacionadas e a introgressão gênica entre elas é possível por meio da recombinação.

Análises de citogenética molecular, tais como, as técnicas de FISH e GISH tem sido amplamente utilizadas para melhorar o conhecimento e diferenciação dos genomas de plantas (Zwierzykowski *et al.*, 2008; Wolny *et al.*, 2011), solucionar alguns processos de evolução cromossômica, incluindo rearranjos estruturais (Kopecký *et al.*, 2006; Książczyk *et al.*, 2014) e estudos sobre relações filogenéticas e genômicas (Kopecký *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2014). A GISH fornece um resultado visual e direto para investigação da composição e relação genômica entre espécies. Essa técnica ainda não foi usada para discriminar os genomas das espécies e híbridos de *Brachiaria*, mas tem sido aplicada com essa finalidade em alguns grupos importantes de gramíneas, tais como, *Pennisetum* (Andrade-Vieira *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2014), *Lolium* e *Festuca* (Cao *et al.*, 2000; Kopecký *et al.*, 2009), *Triticeae* (Anamthawat-Jónsson *et al.*, 1990), *Brachypodium* (Wolny e Hasterok, 2009) e *Setaria* (Benabdelmouna *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar as relações genômicas entre *B. ruziziensis*, *B. decumbens*, *B. brizantha* e híbridos interespecíficos por meio da técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH) com DNA genômico total. Adicionalmente, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sequência de DNA repetitivo 45S e 5S rDNA e a quantificação do tamanho do genoma nuclear por citometria de fluxo foram realizadas nos híbridos interespecíficos para auxiliar no estabelecimento das relações genômicas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

As avaliações foram feitas em plantas sexuais de *Brachiaria ruziziensis* (cultivar Kennedy e genótipo tetraploidizado obtido por Timbó et al. (2014b) na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil), nas apomíticas *Brachiaria brizantha* (cultivar Marandu) e *Brachiaria decumbens* (cultivar Basilisk) e em híbridos interespecíficos experimentais oriundos do cruzamento entre *B. ruziziensis* x *B. decumbens* (identificação: H963), *B. ruziziensis* x *B. brizantha* (identificação: H1863) e o híbrido triespecífico comercial entre *B. ruziziensis* x *B. decumbens* x *B. brizantha* (cultivar Mulato II/Convert HD364). Este último híbrido é o resultado de três gerações de cruzamento e seleção, iniciados com o cruzamento de *B. ruziziensis* x *B. decumbens*. As progênies sexuais deste primeiro híbrido foram cruzadas com acessos de *B. brizantha*, o que permitiu a seleção de um clone apomítico que se converteu posteriormente na cv. Mulato II (Argel et al., 2007).

### 2.2 Preparação das lâminas/obtenção de metáfases

As raízes foram coletadas e submetidas à pré-tratamento com ciclohexamida ( $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas em água destilada e fixadas em solução de etanol: ácido acético (3:1). As raízes foram submetidas à digestão enzimática em um mix de enzima contendo celulase “Onozuka R10” (0,7%), celulase Sigma (0,7%), pectoliase Sigma (1%) e citohelicase Sigma (1%) por 90 minutos a 37°C. As lâminas foram preparadas pelo método de secagem a chama (Dong et al., 2001).

A avaliação e seleção das lâminas foi realizada em microscópio de luz sob contraste de fase e as melhores metáfases, com cromossomos espalhados e sem citoplasma, foram marcadas. As lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até o emprego da técnica de hibridização *in situ*.

### 2.3 Hibridização *in situ* – GISH e FISH

Para a GISH, foi utilizado o DNA genômico de *B. ruziziensis* (diploide), *B. brizantha* e *B. decumbens* (tetraploides) como sonda. Para FISH foram utilizados os rDNAs 45S e 5s (pTa71) e sequência telomérica provenientes do genoma de *Triticum aestivum* L. As sondas foram marcadas com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-12-dUTP através de reação de *Nick translation*. A FISH foi realizada nos híbridos e na espécie *B. ruziziensis* 4x. Para as demais espécies foram utilizados os dados de Nani (2015).

A preparação cromossômica foi desnaturada em formamida 70% a 85°C por 1 min e 25 seg, seguido de desidratação em série alcoólica 70%, 90% e 100%. A mistura de hibridização contendo formamida (50%), sulfato de dextran (10%), SSC 2x pH 7.0, 50-100ng de sonda marcada com biotina/digoxigenina foi desnaturada a 95°C por 8 minutos, seguida de 5 minutos no gelo. A mistura de hibridização foi aplicada sobre a preparação cromossômica, coberta com lamínula 24x40 mm e vedada com cola vinil. A hibridização ocorreu a 37°C em câmara úmida por, no mínimo, 24 horas.

A detecção das sondas foi feita com o uso dos anticorpos estreptavidina conjugada com alexafluor 488 e antidigoxigenina conjugada com rodamina após lavagens estringentes com tampão SSC 2x e TNT. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (2µg/mL)/Vectashield. As imagens foram capturadas usando uma câmera QImaging Retiga EXi CCD acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60 e o contraste final feito com o software Photoshop CS3.

Para avaliar a proporção dos genomas utilizados como sonda nas metáfases, os cromossomos e os segmentos cromossômicos marcados pela sonda genômica (sinais em vermelho/rosa) foram medidos utilizando o programa MicroMeasure 3.3.

Para definir o posicionamento dos sinais de hibridização nos cromossomos, associada ao tamanho ( $\mu\text{m}$ ) da região hibridizada, foi utilizada a classificação das regiões cromossômicas proposta por Roa e Guerra (2012), com algumas adaptações (Figura 1), as quais foram caracterizadas como regiões centromérica/pericentromérica - cen/per (0,01-1,49 $\mu\text{m}$ ), proximal e intersticial-proximal - p/ip (1,50-1,99 $\mu\text{m}$ ), intersticial-terminal - it e terminal - t (>2,00 $\mu\text{m}$ ) e todo o cromossomo - wc (hibridização completa).

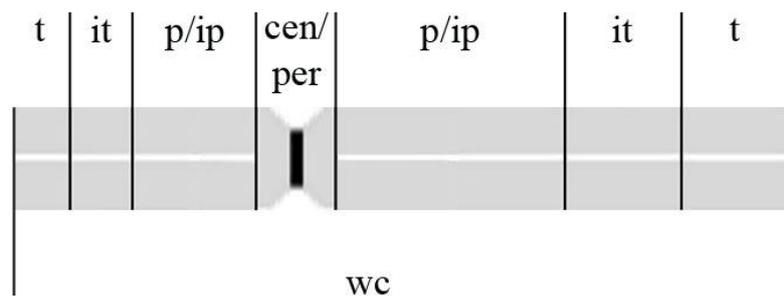


Figura 1 Divisão das regiões cromossômicas: região centromérica e pericentromérica (cen/per), proximal e intersticial-proximal (p/ip), intersticial-terminal (it), terminal (t) e todo o cromossomo (wc). Fonte: Adaptado de Roa e Guerra (2012).

#### 2.4 Quantificação do DNA nuclear por citometria de fluxo

Para estimativa do conteúdo de DNA, três amostras de cada híbrido (H1863, cv. Mulato II e H963) foram quantificadas. Tecido foliar jovem (20-30 mg) dos híbridos de *Brachiaria* foi macerado juntamente com a mesma quantidade de *Pisum sativum* (padrão interno de referência – Quantidade de DNA 2C = 9,09pg) em placa de petri contendo 1mL de tampão MgSO<sub>4</sub>

gelado, para obtenção da suspensão nuclear (Dolezel, 1997). À suspensão nuclear foi adicionado 1µL de iodeto de propídeo. Para cada amostra foi quantificado pelo menos dez mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas foram obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.9. O conteúdo de DNA nuclear das plantas foi estimado em picogramas (pg) por comparação (regra de três) com a posição do pico G1 do padrão interno de referência.

Para as demais espécies (*B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. ruziziensis* diploide e tetraploide) inferências foram realizadas a partir dos dados de citometria de Timbó et al. (2014a e 2014b).

### **3 RESULTADOS**

#### **Número cromossômico, tamanho do genoma e sítios de DNA ribossomal em espécies e híbridos interespecíficos de *Brachiaria***

Os híbridos 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*) e cv. Mulato II [(*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) x *B. brizantha*] apresentaram 36 cromossomos e 3.24 e 3.83 pg de DNA, respectivamente (Tabela 1 e Figura 2). Resultado inesperado foi obtido para o híbrido entre *B. ruziziensis* e *B. decumbens* (963), o qual apresentou 38 cromossomos, confirmados por meio da sonda telomérica, em todas as metáfases avaliadas. A estimativa para o conteúdo de DNA (3.62pg) mostrou que os dois cromossomos adicionais contribuíram para um aumento de cerca de 0,4 pg de DNA (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1 Número cromossômico, nível de ploidia, quantidade de DNA e número total de sinais de rDNA 45S e 5S em espécies e híbridos de *Brachiaria*.

Espécies/Híbridos	2n	Nível de ploidia	Número de sítios de rDNA		
			5S	45S	DNA (pg)
<i>B. decumbens</i> (cv. Basilisk)	36	4x	7 <sup>3</sup>	4 <sup>3</sup>	3,74 <sup>1</sup>
<i>B. brizantha</i> (cv. Marandu)	36	4x	3, 5 e 6 <sup>3</sup>	2, 3 e 4 <sup>3</sup>	3,52 <sup>1</sup>
<i>B. ruziziensis</i> (cv. Kennedy)	18	2x	4 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	1,74 <sup>1</sup>
<i>B. ruziziensis</i> (“Iracema”)	36	4x	6	4	2,92 <sup>2</sup>
H963 ( <i>B. decumbens</i> x <i>B. ruziziensis</i> )	38	4x+2	7	5	3,62
H1863 ( <i>B. brizantha</i> x <i>B. ruziziensis</i> )	36	4x	7	4	3,24
cv. Mulato II [( <i>B. ruziziensis</i> x <i>B. decumbens</i> ) x <i>B. brizantha</i> ]	36	4x	7	4	3,83

Referências: <sup>1</sup>Timbó et al., 2014a. <sup>2</sup>Timbó et al., 2014b. <sup>3</sup>Nani (2015).

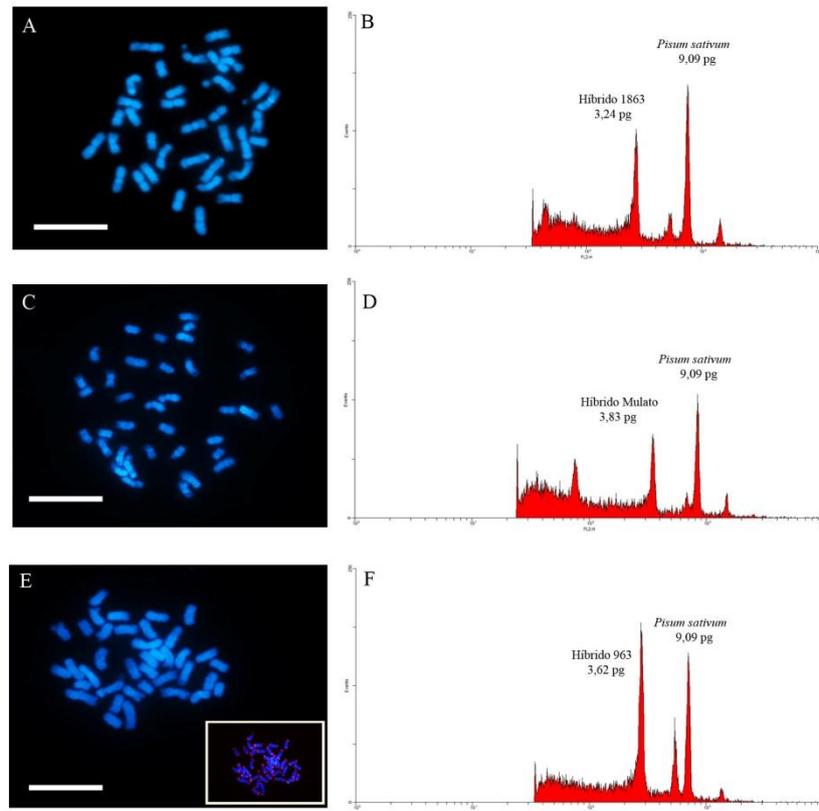


Figura 2 Metáfases com cromossomos contrastados com DAPI (azul) e histogramas de citometria de fluxo para quantificação do DNA nos híbridos 1863 (A e B), cv. Mulato II (C e D) e 963 (E e F). Em destaque, metáfase com sonda telomérica em vermelho no híbrido 963, confirmando a presença de 38 cromossomos. A barra representa 10 $\mu$ m.

A FISH simultânea com sondas de genes de rDNA identificou quatro cromossomos com a sequência de rDNA 45S, em posição terminal, em *B. ruziziensis* 4x (Figura 3A), nos híbridos 1863 (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*, Figura 3C) e na cv. Mulato II (*B. ruziziensis* x *B. decumbens* x *B. brizantha*, Figura 3D). O híbrido 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) apresentou cinco sinais de rDNA 45S em posição terminal (Figura 3B). Em relação ao sítio de rDNA 5S, foram observados sete sinais nos três híbridos e seis em *B. ruziziensis* 4x, todos localizados em posição intersticial-proximal no cromossomo.

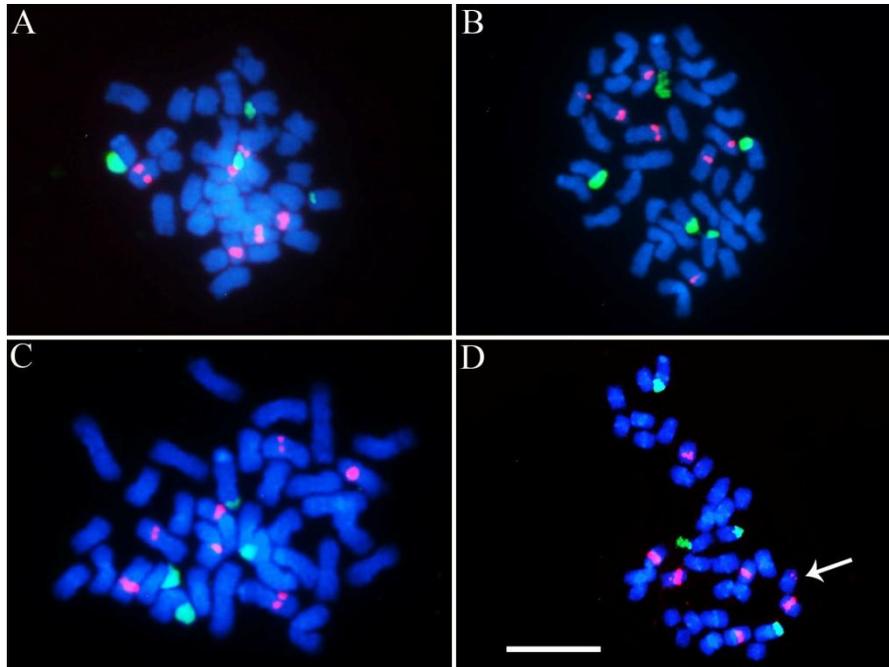


Figura 3 Distribuição dos sítios de DNA ribossomal 5S (vermelho) e 45S (verde) detectado pela FISH em cromossomos metafásicos contrastados com DAPI (azul) de *Brachiaria ruziziensis* 4x (A), híbrido 963 (B), Híbrido 1863 (C) e híbrido cv. Mulato II (D), seta indica um sinal de rDNA 5S fraco. A barra representa 10 $\mu$ m.

#### Análise da hibridização genômica *in situ* (GISH)

Os resultados da GISH realizada reciprocamente entre *B. ruziziensis* (diploide), *B. decumbens* e *B. brizantha* (tetraploides) estão apresentados na tabela 2 e figura 4. Em *B. brizantha*, quando utilizada a sonda do DNA genômico de *B. ruziziensis* a proporção do genoma hibridizado foi de 49.55%. Sinais de hibridização foram visualizados em 18 cromossomos nas regiões centromérica/pericentromérica e em 18 cromossomos até a região proximal/intersticial-proximal (Figura 4A, Tabela 2). A sonda de *B. decumbens* hibridizou com 59.66% do genoma de *B. brizantha* e marcou nove cromossomos na região centromérica/pericentromérica, 20

cromossomos até a região proximal/intersticial-proximal e sete cromossomos hibridizaram inteiramente (Figura 4B, Tabela 2).

Em *B. decumbens*, a proporção do genoma hibridizado foi de 35.24% com o DNA genômico total de *B. ruziziensis*. Houve uma marcação intensa na região centromérica/pericentromérica de 18 cromossomos; 14 cromossomos apresentaram sinal de hibridização que se estenderam até a região proximal/intersticial-proximal e quatro estavam quase completamente hibridizados com sinais até a região terminal (Figura 4C, Tabela 2). A sonda de *B. brizantha* hibridizou com 61.04% dos cromossomos de *B. decumbens*, os quais apresentaram sete cromossomos inteiramente hibridizados. Os demais apresentaram intensa marcação no centrômero/pericentrômero (14) e até região proximal/intersticial-proximal (15) (Figura 4D, Tabela 2).

Em *B. ruziziensis* diploide, a sonda de DNA genômico de *B. decumbens* hibridizou com 63.54% dos cromossomos. Dez cromossomos apresentaram sinais intensos proximais/intersticiais-proximais e em oito cromossomos os sinais se estenderam até a região intersticial-terminal (Figura 4E, Tabela 2). A sonda genômica de *B. brizantha* hibridizou com 32.69% do genoma de *B. ruziziensis*. Os sinais foram observados em 14 cromossomos na região centromérica/pericentromérica, em dois cromossomos sinais se estenderam até a região proximal/intersticial-proximal e dois cromossomos apresentaram um sinal fraco e localizado na região centromérica/pericentromérica (Figura 4F, Tabela 2).

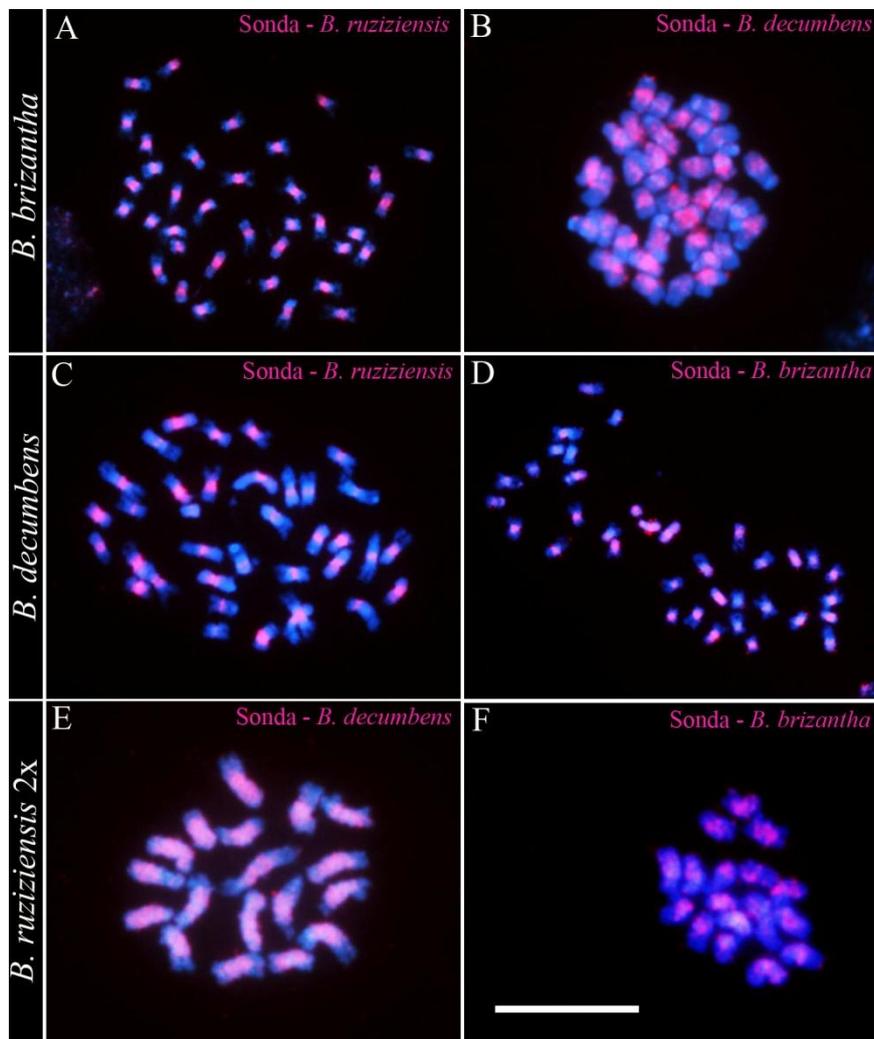


Figura 4 Metáfases de *B. brizantha* ( $2n = 4x = 36$ ) com sonda de *B. ruziziensis* (A) e *B. decumbens* (B). Metáfases de *B. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ) com sonda de *B. ruziziensis* (C) e *B. brizantha* (D). Metáfases de *B. ruziziensis* ( $2n = 2x = 18$ ) com sonda de *B. decumbens* (E) e *B. brizantha* (F). Cromossomos contrastados com DAPI (azul) e marcação da sonda nos cromossomos indicada pela fluorescência (vermelho/rosa). A barra representa  $10\mu\text{m}$ .

Tabela 2 Média (%) e desvio padrão da hibridização entre os genomas das espécies e híbridos de *Brachiaria*.

Sonda	<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>
<b>Metáfase</b>			
<b><i>B. ruziziensis</i> 2x</b>	100%	32.69 ± 2.45	63.54 ± 1.05
<b><i>B. brizantha</i></b>	49.55 ± 2.31	100%	59.66 ± 0.51
<b><i>B. decumbens</i></b>	35.24 ± 1.65	61.04 ± 2.01	100%
<b>Híbrido 963</b>	48.86 ± 1.06	-	69.46 ± 1.43
<b>Híbrido 1863</b>	34.67 ± 1.53	70.57 ± 1.84	-
<b>Híbrido cv. Mulato II</b>	49.26 ± 1.07	51.63 ± 1.91	67.64 ± 0.53

(-): Não foi realizada a hibridização da sonda de *B. brizantha* no híbrido 963 e sonda de *B. decumbens* no híbrido 1863.

Nos híbridos interespecíficos, a GISH realizada com sonda dos genitores envolvidos nos cruzamentos, sem utilizar DNA de bloqueio, mostra a marcação de todos os cromossomos das metáfases avaliadas (Tabela 2 e Figura 5A, B, C, D, E e F).

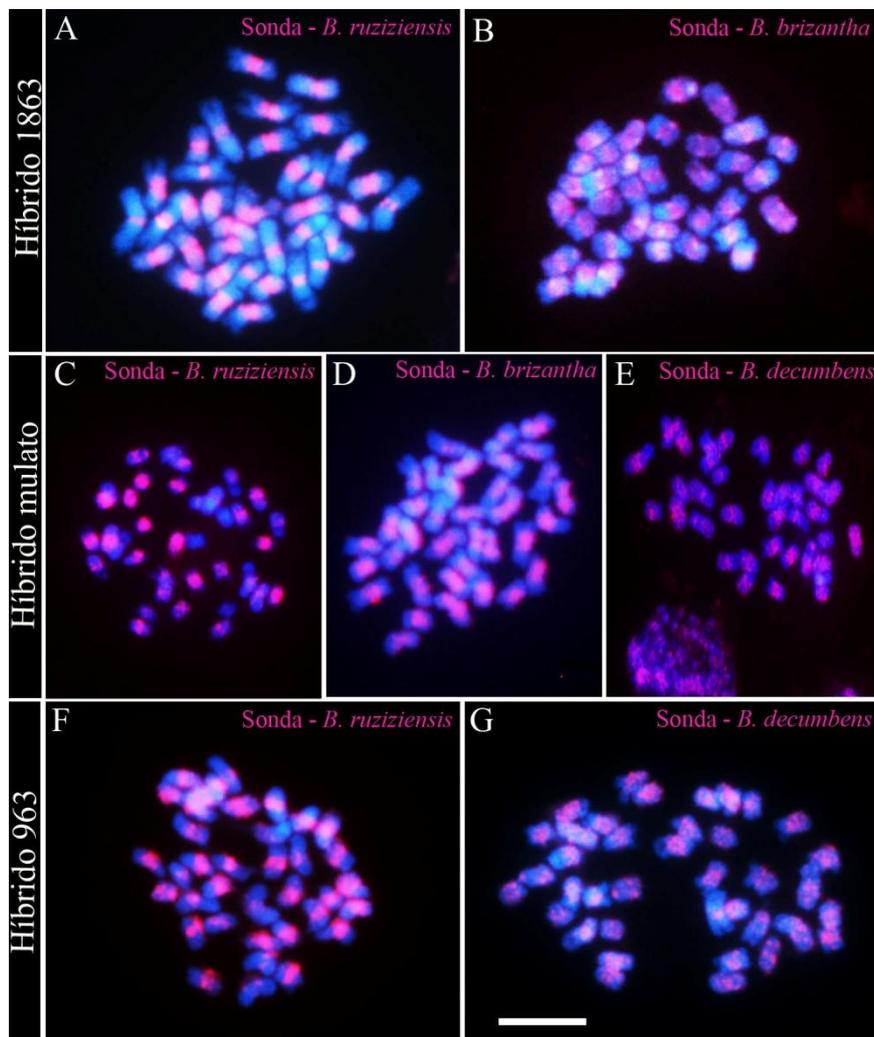


Figura 5 Metáfases do híbrido 1863 com sonda de *B. ruziziensis* (A) e *B. brizantha* (B). Metáfases do híbrido cv. Mulato II com sonda de *B. ruziziensis* (C), *B. brizantha* (D) e *B. decumbens* (E). Metáfases do híbrido 963 com sonda de *B. ruziziensis* (F) e *B. decumbens* (G). Cromossomos contrastados com DAPI (azul) e marcação da sonda nos cromossomos indicada pela fluorescência (vermelho/rosa). A barra representa 10 $\mu$ m.

O DNA genômico de *B. ruziziensis* hibridizou com 34.67% do genoma do híbrido 1863 e marcou intensamente nove cromossomos no centrômero/pericentrômero, 23 até a região proximal/intersticial-proximal e quatro até a região intersticial-terminal (Figura 5A, Tabela 2). No híbrido cv. Mulato II, esta mesma sonda hibridizou com 49.26% do genoma, em que,

oito cromossomos hibridizaram completamente, oito cromossomos não apresentaram sinais de hibridização e os demais apresentaram sinais centroméricos/pericentroméricos (nove) e proximais/intersticiais-proximais (11) (Figura 5C, Tabela 2). Para a sonda obtida do DNA genômico de *B. brizantha* ocorreu uma hibridização com 70.57% do genoma do híbrido 1863 e em 51.63% do híbrido Mulato II. No híbrido 1863, foram observados sete cromossomos inteiramente marcados, 20 cromossomos os sinais se estenderam até a região proximal/intersticial-proximal e nove até a região intersticial-terminal (Figura 5B, Tabela 2). A hibridização nos cromossomos híbrido Mulato II mostrou dois com sinais centroméricos/pericentroméricos, 27 sinais até a região proximal/intersticial-proximal e sete sinais até a região intersticial-terminal (Figura 5D, Tabela 2). A sonda do DNA genômico de *B. decumbens* hibridizou com 67.64% do genoma do híbrido cv. Mulato II, foram observados seis cromossomos com hibridização na região centromérica/pericentromérica, 12 cromossomos com a hibridização se estendendo até região proximal/intersticial-proximal, 11 até a região intersticial-terminal e sete com hibridização total (Figura 5E, Tabela 2).

Para o terceiro híbrido (963) entre *B. ruziziensis* e *B. decumbens*, que apresenta  $2n = 38$  cromossomos, a sonda de *B. ruziziensis* hibridizou com 48.86% do genoma e marcou inteiramente dois cromossomos, nove cromossomos no centrômero/pericentrômero e em 27 cromossomos os sinais de hibridização que se estenderam até a região proximal/intersticial-proximal (Figura 5F, Tabela 2). Com o DNA genômico de *B. decumbens*, houve hibridização com 69.46% no genoma do híbrido 963. Oito cromossomos foram completamente hibridizados, um apresentou sinal centromérico/pericentromérico e 29 apresentaram marcação estendida para a região intersticial-terminal (Figura 5G, Tabela 2).

## 4 DISCUSSÃO

### Número cromossômico, tamanho do genoma e FISH (rDNA 45 e 5S)

O híbrido 1863 apresentou  $2n = 36$  cromossomos, conforme o esperado a partir do cruzamento de *B. ruziziensis* ( $2n = 4x = 36$ ) e *B. brizantha* ( $2n = 4x = 36$ ). A quantidade de DNA foi de 3,24 pg. Essa estimativa se aproxima dos valores médios esperados (3,22pg), tendo por base as estimativas do conteúdo de DNA dos genitores *B. brizantha* e *B. ruziziensis* duplicada que são 3,52 e 2,92 pg, respectivamente, descritas por Timbó *et al.* (2014a, 2014b).

O híbrido cv. Mulato II também apresentou  $2n = 36$  cromossomos e um aumento no conteúdo de DNA (3,83 pg) em relação à média estimada dos genitores (3,43 pg). Esse aumento corresponde a cerca de 0,40 pg (12%) de DNA. Esta situação é oposta ao que normalmente é observado em outros híbridos, como por exemplo, em híbridos de *Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum*, no qual foi observada uma redução de até 3,17 pg na quantidade de DNA, 30 dias após a hibridação (Nunes *et al.*, 2013). De acordo com Leitch e Bennett (2004), uma resposta esperada para alopoliploidização é a ativação de transposons no novo ambiente genético do núcleo poliploide, o que pode causar um aumento do conteúdo de DNA. Os elementos transponíveis quando são replicativos (TEs de classe II, subclasse II), geram como consequência do seu modo de transposição alteração na composição molecular e/ou a quantidade de DNA no genoma do hospedeiro (Ferdoroff, 2000; Wicker *et al.*, 2007; Raskina *et al.*, 2008). No entanto, o efeito preciso da poliploidização no conteúdo de DNA, como por exemplo, um aumento, uma redução ou nenhuma mudança, depende da natureza do transposon e o modo e frequência de transposição (Leitch e Bennett, 2004). Essa diferença na quantidade de DNA também pode ser atribuída a variações intraespecíficas nas espécies utilizadas como genitores. Há que se considerar também que, segundo Dolezel (1997), são observadas variações na

quantidade de DNA entre genótipos, populações, linhagens ou cultivares dentro de uma espécie.

No híbrido 963, todas as metáfases avaliadas apresentaram  $2n = 38$  cromossomos, excedendo 2 cromossomos do esperado, considerando os genitores de *B. ruziziensis* ( $2n = 4x = 36$ ) e *B. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ). Esse acréscimo de dois cromossomos representou um aumento de cerca de 0,29 pg (9%) de DNA, considerando a média do conteúdo de DNA dos genitores (3,33 pg). Um fator importante a ser considerado é que o genótipo de *B. ruziziensis* utilizado como genitor feminino nos cruzamentos, passou por um processo de indução de duplicação cromossômica com colchicina. Em geral, a eficácia na obtenção de poliploides depende de uma série de fatores exógenos, e o processo de poliploidização com colchicina acarreta em efeitos secundários, tais como a mixoploidia. Plantas mixoploides, apresentam células com variação no número cromossômico, na ploidia de um mesmo tecido ou entre órgãos de uma mesma planta (Pereira *et al.*, 2012). Portanto, o genitor do híbrido 963 pode ter gerado gametas não balanceados que resultaram na obtenção de plantas híbridas com 38 cromossomos. Essa pressuposição é ratificada pela marcação completa de dois cromossomos nesse híbrido com a sonda de DNA genômico de *B. ruziziensis*, que podem representar os cromossomos excedentes.

Outro aspecto a ser considerado é que anormalidades meióticas são frequentemente relatadas no gênero *Brachiaria* e podem também explicar a ocorrência de 38 cromossomos observados no híbrido 963. Em acessos tetraploidizados de *B. ruziziensis* foram detectadas anormalidades principalmente relacionadas à segregação cromossômica irregular em mais de 50% dos meiócitos (Risso-Pascotto *et al.*, 2005a ; Pagliarini *et al.*, 2008). Essas anormalidades típicas de poliploides também foram relatadas em *B. decumbens* (Mendes-Bonato *et al.* 2002a), as quais frequentemente resultam em formação de gametas não balanceados, que podem gerar progênies ou híbridos com adição ou perda de cromossomos.

A ocorrência de dois cromossomos adicionais pode ser importante para aumentar a variabilidade e a base genética no programa de melhoramento, uma vez que podem ser usadas como linhas de adição, ou seja, o genótipo no qual se encontra um (linha de adição monossômica) ou dois (linha de adição dissômica) cromossomos extras (Pagliarini, 2001). Linhas de adição têm sido estudadas em várias espécies de importância econômica, tais como trigo (Fu *et al.*, 2013) e aveia (Baptista-Giacomelli *et al.*, 2000) e podem ser mostradas em *Brachiaria*, tendo em vista os resultados explorados neste estudo.

Na hibridização *in situ* com sonda de rDNA em plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizada, foi observado um número menor de sítios rDNA 5S (seis sinais) do que o esperado (oito sinais) a partir da duplicação da *B. ruziziensis* diploide que apresenta quatro sítios (Akiyama *et al.*, 2010; Nani, 2015). Isso pode ser devido à perda de genes ou de sequências gênicas que ocorrem após o processo de poliploidização (Winterfeld e Röser, 2007). Outra possível hipótese para a variação do rDNA 5S é que este sítio está frequentemente localizado na heterocromatina pericentromérica que é rica em elementos transponíveis, assim, um rearranjo por meio de transposons pode favorecer a perda ou a transposição dessas sequências (Książczyk *et al.*, 2010). Além disso, a maioria das espécies de plantas possuem mais cópias do que o necessário para a síntese de ribossomos, assim como demonstrado em *Pisum sativum*, onde apenas cerca de 5% das unidades são transcritas (González-Melendi *et al.*, 2001). Com relação aos sítios de rDNA 45S em *B. ruziziensis* tetraploidizada foram observados quatro sinais, os quais correspondem a exata duplicação do observado na espécie diploide (Akiyama *et al.*, 2010; Nani, 2015).

O mapeamento físico de genes de rDNA 45S e 5S já foi realizado em algumas espécies de *Brachiaria*. Em um acesso diploide sexual de *B. brizantha* foram observados dois sítios de rDNA 5S e dois sítios de 45S, enquanto que no tetraploide apomítico foram observados seis sítios de rDNA 5S e quatro de 45S (Nielen *et al.*, 2010). Em *B. ruziziensis* diploide foram

quantificados quatro sinais de rDNA 5S e dois sinais de 45S (Akiyama *et al.*, 2010; Nani, 2015).

A análise de FISH nos híbridos 1863 e cv. Mulato II revelou sete sinais de rDNA 5S e quatro sinais de 45S. Os sinais de 45S estão de acordo com o esperado a partir dos genitores. No entanto a assimetria nos sinais de 5S (sete sinais) pode ser oriunda da grande variação observada em *B. brizantha*, utilizada como genitor masculino nos cruzamentos. Akiyama *et al.* (2010) quantificaram quatro e seis sinais de rDNA 5S em dois acessos de *B. brizantha* (CIAT 6294 e 16306), já Nani (2015) quantificou três, cinco e seis sinais em plantas de *B. brizantha* cv. comercial Marandu. A assimetria entre diferentes genomas foi observada em *Trifolium pratense*, onde um cromossomo do par teve o locus rDNA 28S, enquanto o homólogo não (Sato *et al.*, 2005). A FISH no híbrido mulato I, oriundo do cruzamento de *B. ruziziensis* x *B. brizantha* foi realizada por Akiyama *et al.* (2010), no qual os autores quantificaram quatro sinais de rDNA 5S e 45S e consideraram que os cromossomos com rDNA foram transmitidos dos genitores para os híbridos sem ocorrer uma reconstrução por hibridação.

O híbrido 963 apresentou sete sinais de rDNA 5S e cinco sinais de 45S. Neste híbrido, a variação além do esperado ocorreu para o sítio de 45S e possivelmente está associado ao maior número de cromossomos observados (38 cromossomos). A assimetria dos sinais de 5S pode ter sido herdada de *B. decumbens*, utilizado como genitor masculino nos cruzamentos, que segundo Nani (2015) apresentou sete sinais de rDNA 5S.

### **Constituição e relação genômica entre espécies e híbridos de *Brachiaria***

A GISH utilizando DNA nuclear total realizada reciprocamente entre *B. decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruziziensis* revelou sinais em todas as metáfases, variando na porcentagem do genoma hibridizado e região cromossômica dessa hibridização, embora com maior predominância da região centromérica. Esse resultado indica que há muitas sequências

repetitivas em homologia entre as espécies. A alta homologia de *repeats* indica uma relação filogenética próxima entre as espécies e está de acordo com as análises moleculares descritas anteriormente (Tohme *et al.*, 1996; Torres González e Morton 2005; Ambiel *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011).

A hibridização do DNA genômico total de *B. brizantha* em *B. ruziziensis* e a recíproca produziram sinais que foram predominantemente concentrados nas regiões proximais/intersticiais-proximais e incluem o centrômero e pericentrômero, regiões notadamente delimitadas por DNA repetitivo. A predominância de sinais da GISH centroméricos e pericentroméricos como observado em *Brachiaria*, já foi relatada por Belyayev *et al.* (2001) ao demonstrar que o DNA total isolado de outras espécies de Poaceae (*Secale sylvestre*, *Hordeum spontaneum*, *Festuca pratensis*, *Semiarun-dinaria fastuosa*, *Arundo donax* e *Zea mays*) revelou extensiva conservação, especialmente em regiões pericentroméricas e Regiões organizadoras do nucléolo (RONs), quando hibridizadas com cromossomos de *Aegilops speltoides*.

O DNA genômico de *B. decumbens* hibridizado com *B. brizantha* e *B. ruziziensis* produziu resultados similares de marcação em regiões repetitivas do genoma. Entretanto, é interessante notar que a hibridização com o DNA genômico de *B. decumbens* discriminou sete cromossomos completamente marcados dentre os 36 de *B. brizantha* e oito, com marcações até a região terminal entre os 18 cromossomos de *B. ruziziensis*. A hibridização inversa do DNA genômico de *B. brizantha* em *B. decumbens* também discriminou sete cromossomos.

Os resultados observados para *B. Brizantha* e *B. decumbens* confirmam que estas espécies são estreitamente relacionadas, compartilham genomas similares e podem suportar a proposta de origem aloploiploide de *B. brizantha* e *B. decumbens* já sugerido com base no comportamento meiótico (Mendes-Bonato *et al.*, 2001; 2002a; 2002b) e mapeamento físico de rDNA (Nielen *et al.*, 2010; Akiyama *et al.*, 2010; Nani, 2015). Há indicativos da GISH de maior similaridade entre cromossomos de *B.*

*decumbens* e *B. ruzizensis*.

Os resultados da GISH ratificam a indicação de Mendes-Bonato *et al.* (2002b) para a ocorrência de alopoliploidia segmental em *Brachiaria* e, associando com os dados de pareamento meiótico, a proposta de composição e relação genômica está apresentada na figura 6, utilizando-se a designação dos genomas B já proposta para o gênero (Risso-Pascotto *et al.*, 2004; Mendes-Bonato *et al.*, 2006b; Mendes *et al.*, 2006) e as diferentes sondas testadas que possibilitaram discriminar cromossomos e genomas.

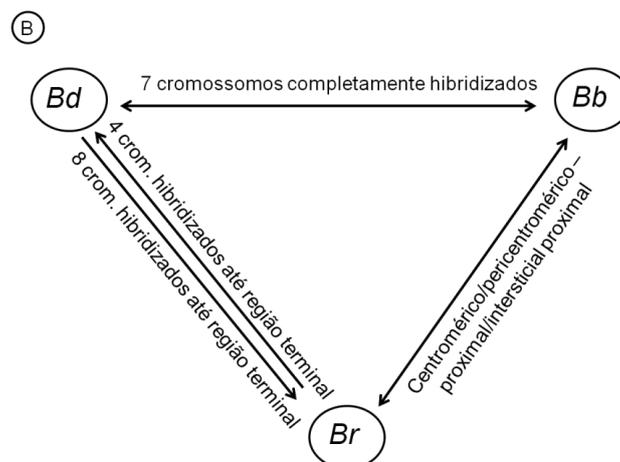
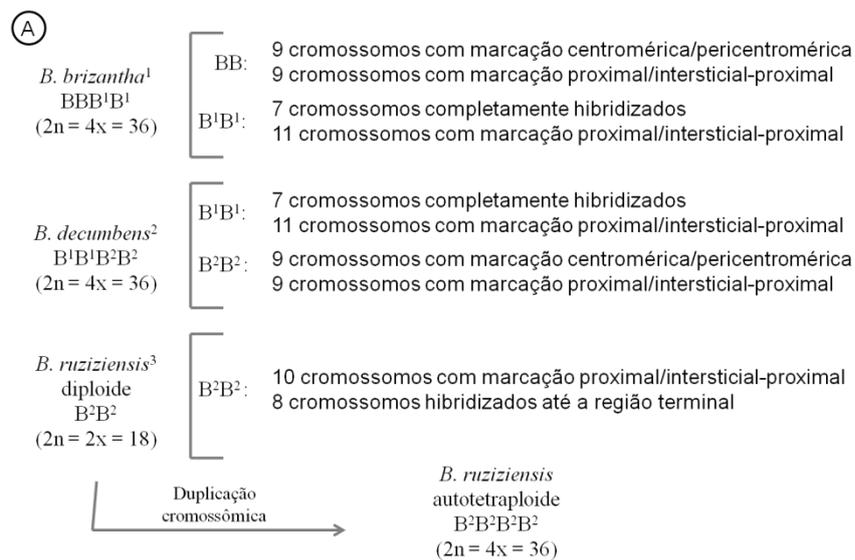


Figura 6 A) Composição e relação genômica em *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* com base nos resultados da GISH. Discriminação dos cromossomos/genomas empregando sondas de DNA genômico de *B. decumbens* (1), *B. brizantha* (2) e *B. decumbens* (3). B) Diagrama com os principais resultados da GISH que fornecem suporte à proposta da relação genômica entre *B. decumbens* (Bd), *B. brizantha* (Bb) e *B. ruziziensis* (Br).

Baseando-se nessa proposta, os genomas B, B<sup>1</sup> e B<sup>2</sup> são considerados homeólogos, com menor afinidade entre os genomas B e B<sup>2</sup>. Uma sustentação para essa premissa são as regiões cromossômicas de hibridização, em que a sonda genômica de *B. decumbens* (B<sup>1</sup>B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>) marcou os cromossomos de *B. ruziziensis* (B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>) até a região terminal, enquanto que a sonda genômica de *B. brizantha* (BBB<sup>1</sup>B<sup>1</sup>) marcou principalmente as regiões repetitivas dos cromossomos de *B. ruziziensis*, sobretudo regiões centroméricas e pericentrométicas, que tendem a ser mais conservadas.

Além da região cromossômica de hibridização, a porcentagem de hibridização entre as espécies é consistente com a proposta de que *B. brizantha* e *B. decumbens* compartilham cromossomos do genoma B<sup>1</sup> e que *B. ruziziensis* e *B. decumbens* compartilham cromossomos do genoma B<sup>2</sup>. A sonda de *B. decumbens* hibridizou com 63.54% do genoma de *B. ruziziensis*, enquanto que a sonda de *B. brizantha* hibridizou com 32.69%. De forma semelhante, a sonda de *B. brizantha* hibridizou com 61.04% do genoma de *B. decumbens*, enquanto que a sonda de *B. ruziziensis* hibridizou com 35.24%.

Outra confirmação para a maior afinidade entre B e B<sup>1</sup> e entre B<sup>1</sup> e B<sup>2</sup> são as associações cromossômicas avaliadas na diacinese em *B. brizantha* e *B. decumbens*, no qual foram observados univalentes, bivalentes e tetravalentes (Mendes-Bonato *et al.*, 2002a; 2002b). A presença de algumas associações multivalentes em gramíneas tetraploides, tais como em *Brachiaria* (Mende-Bonato *et al.*, 2001) e *Paspalum* (Takayama *et al.*, 1998) tem sido interpretada como alopoliploidia segmental, situação em que os genomas parentais são parcialmente homólogos (homeólogos).

A maior variação na constituição genômica de *B. brizantha*, cujo

genoma B não é encontrado nas outras duas espécies, pode ser evidenciada também pela variabilidade intraespecífica de sítios rDNA, tanto em número quanto em posição. Em *B. ruziziensis* e *B. decumbens* não foi observado polimorfismo para estes sítios (Nani, 2015).

A menor homologia/homeologia entre os genomas B e B<sup>2</sup> é também suportada por estudos de meiose. Mendes *et al.* (2006) ao avaliar o comportamento meiótico em dois acessos pentaploides ( $2n = 5x = 45$ ), oriundos da hibridação natural entre um apomítico tetraploide (*B. brizantha*) e um diploide sexual (provavelmente *B. ruziziensis*), observaram uma falta de afinidade do genoma haploide ( $n = 9$ ) com o genoma B, devido a uma assincronia durante a meiose, como consequência do não pareamento entre os genomas e variação no ritmo meiótico. Em 50% dos meiócitos, os genomas não ocuparam o mesmo território na placa metafásica. Um híbrido interespecífico triploide entre *B. brizantha* e *B. ruziziensis* apresentou comportamento citológico similar ao acesso pentaploide. Nesse híbrido, o genoma de *B. ruziziensis* (Genoma R) permaneceu atrasado em relação ao de *B. brizantha* (Genoma B) (Risso-Pascotto *et al.*, 2004).

Por outro lado, a maior relação de afinidade entre *B. decumbens* e *B. ruziziensis* em comparação com *B. brizantha* também foi relatada por Ndikumana (1985), a partir da análise do pareamento cromossômico na meiose e devido a uma maior recuperação de híbridos em cruzamentos de *B. ruziziensis* x *B. decumbens* do que em *B. ruziziensis* x *B. brizantha*.

A relação genética entre espécies de *Brachiaria* baseada em caracteres morfológicos e moleculares (Tohme *et al.*, 1996; Torres González e Morton 2005; Ambiel *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011) agrupam *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. ruziziensis* em um mesmo grupo taxonômico e complexo agâmico. Entretanto, com base em análise de um conjunto de sementes, viabilidade de mudas e pareamento cromossômico em híbridos, Lutts *et al.* (1991) constataram que *B. ruziziensis* é mais estreitamente relacionada com *B. decumbens* do que *B. brizantha*. Esses dados condizem com os resultados obtidos a partir da GISH aqui apresentados.

Os resultados da GISH nos híbridos interespecíficos demonstraram que houve intensa recombinação entre os genomas homeólogos, uma vez que não foi possível separar todos os cromossomos pertencentes aos diferentes genomas, ou seja, a maioria dos cromossomos analisados estavam compostos por segmentos de cromatina de ambos os genitores. As regiões de alta homeologia demonstrada pela GISH podem promover a base física para a recombinação nos híbridos, podendo assim produzir diferentes constituições cromossômicas (Zwierzykowski *et al.*, 1998). A recombinação de genomas homeólogos tem sido frequentemente relatada em híbridos entre *Festuca* e *Lolium* (Cao *et al.*, 2000; Pasakinskiene e Jones, 2005; Kopecký *et al.*, 2009).

Também foi possível observar que houve hibridização de regiões repetitivas que são conservadas entre as espécies, uma vez que a porcentagem de hibridização quando utilizada sonda dos genitores ultrapassa 100%. Várias frações de *repeats* em *tandem* e dispersos são os principais componentes do DNA que são detectados pela GISH (Wolny e Hasterok, 2009).

Alterações no equilíbrio genômico, tanto relacionado às regiões cromossômicas, quanto em termos de quantidade de cromatina hibridizadas foram observadas nos híbridos de *Brachiaria*. No híbrido 1863 (BB<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>), a proporção de hibridização foi de 34.67% com a sonda de *B. ruziziensis* e 70.57% com a sonda de *B. brizantha*. O DNA genômico de *B. brizantha* discriminou sete cromossomos que foram completamente hibridizados e nove com marcações até a região terminal, com esta sonda, revelando que estes pertencem aos genomas B ou B<sup>1</sup>.

No híbrido 963 (B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>), a sonda de *B. ruziziensis* hibridizou com 48.86% e a sonda de *B. decumbens* com 69.46% do genoma. Dentre os 38 cromossomos, oito devem integrar o genoma B<sup>1</sup>, pois foram hibridizados e diferencialmente marcados somente com a sonda de DNA genômico de *B. decumbens*.

No híbrido cv. Mulato II (BB<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup> ou BB<sup>1</sup>B<sup>1</sup>B<sup>2</sup>) as sondas de *B.*

*ruzizensis*, *B. decumbens* e *B. brizantha* hibridizaram com 49.26%, 67.64% e 51.63% do genoma híbrido, respectivamente. Quando utilizada a sonda obtida de *B. ruzizensis*, oito cromossomos apresentaram sinais fracos de hibridização, indicando que estes devem pertencer ao genoma B.

Os dados da GISH evidenciam que o conflito genômico gerado pela reunião de diferentes genomas em um mesmo núcleo, pode ter sido ajustado por meio da alteração no equilíbrio dos genomas, provavelmente favorecendo o genoma dominante, nos híbridos 963 e cv. Mulato II seria da *B. decumbens* e no híbrido 1863 da *B. brizantha*. Alterações na proporção de participação dos genomas também foram observadas em híbridos alotetraploides de *Festulolium loliaceum* ( $2n = 4x = 28$ ), no qual, a porcentagem de cromatina de *Lolium* foi de 62.1%, enquanto que a porcentagem de *Festuca* foi de 37.9% (Canter *et al.*, 1999). De forma semelhante, em híbridos de *Festulolium braunii* o genoma de *Lolium* contribuiu com até 71% da cromatina total do híbrido (Zwierzykowski *et al.*, 2003).

O pareamento cromossômico em híbridos interespecíficos é também um excelente método para entender a relação genômica entre as espécies e consequentemente estabelecer uma filogenia no gênero. A partir de uma alta afinidade no pareamento dos cromossomos presume-se que o conjunto gênico de ambos os genitores são homeólogos (Valle e Pagliarini, 2009). Em híbridos interespecíficos entre *B. ruzizensis* e *B. brizantha*, Mendes-Bonato *et al.* (2006a) observaram a formação de associações predominantemente como bivalentes que foram igualmente distribuídos em duas placas metafásicas e formando dois distintos fusos bipolares. Em contrapartida, análise citológica em dois outros híbridos, envolvendo diferentes acessos de *B. ruzizensis* e *B. brizantha* demonstrou meiose regular, com ambos os genomas ocupando a mesma placa metafásica e apresentando o mesmo ritmo meiótico (Risso-Pascotto *et al.*, 2005b). Esses dados reforçam a relação de homeologia proposta para os genomas de *B. ruzizensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens*, no qual as associações cromossômicas na diacinese vão

dependem da homeologia dos genomas envolvidos no cruzamento. Nesse sentido, vale ressaltar que a extensão da recombinação inter-genoma vai variar de acordo com os genótipos e as espécies utilizadas nos cruzamentos.

A análise da diacinese nos híbridos 963 e 1863 (Paula, manuscrito em preparação) revelou configurações cromossômicas multivalentes em 33.7% e 27.6% das células avaliadas respectivamente nos dois híbridos. Esta é uma evidência de pareamento intra e intergenômico e reforça a relação genômica proposta e, conseqüentemente, a proximidade filogenética entre as espécies utilizadas como genitores.

Um resumo das inter-relações entre as espécies e híbridos de *Brachiaria* baseadas em número cromossômico, tamanho do genoma nuclear, número de loci rDNA e resultados da GISH são apresentados na figura 7.

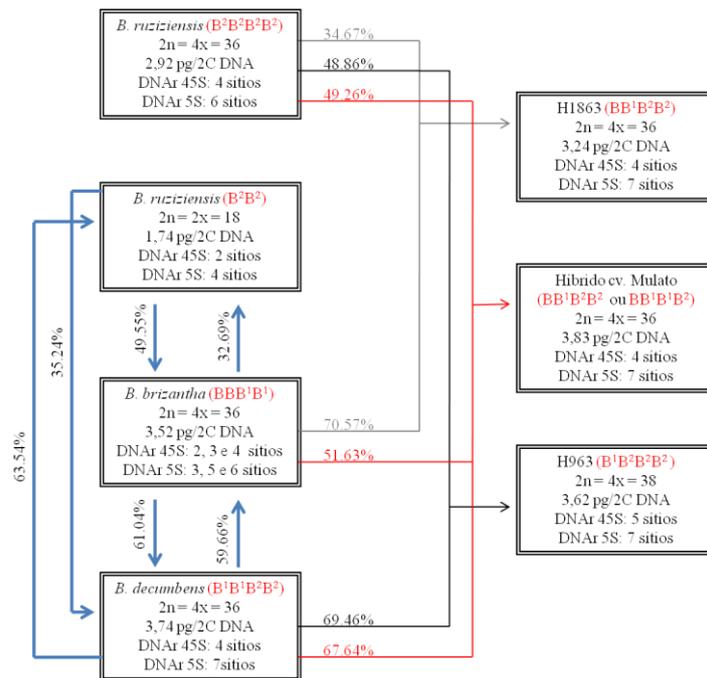


Figura 7 Inter-relações entre as espécies e híbridos de *Brachiaria*. Seta azul representa a porcentagem de hibridização entre os genomas. Setas cinza, preta e vermelha indicam porcentagem de hibridização e a origem parental dos híbridos.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados da GISH, *B. brizantha* apresenta constituição  $BBB^1B^1$ , *B. decumbens*  $B^1B^1B^2B^2$  e *B. ruziziensis*  $B^2B^2$ .

Os genomas B,  $B^1$  e  $B^2$  são considerados homeólogos, com menor afinidade entre B e  $B^2$ .

O híbrido 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*) ( $BB^1B^2B^2$ ) apresentou número cromossômico, quantidade de DNA e sítios de rDNA conforme o esperado a partir dos genitores. O híbrido cv. Mulato II [(*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) x *B. brizantha*] ( $BB^1B^2B^2$  ou  $BB^1B^1B^2$ ) teve um aumento no conteúdo de DNA em relação à média dos genitores. No híbrido 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*) ( $B^1B^2B^2B^2$ ) foi observado dois cromossomos excedentes que representaram um aumento na quantidade de DNA e sítio de rDNA 45S.

A análise da GISH nos híbridos permitiu identificar que houve intensa recombinação entre os genomas homeólogos e diferenças na contribuição dos genomas dos genitores para a constituição do híbrido.

**Normas da Revista Científica Annals of Botany (Versão preliminar)**

## REFERÊNCIAS

**Adamowski EV, Pagliarini MS, Valle CB. 2008.** Meiotic behaviour in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae: Paniceae). *Journal of Genetics* **87**: 33-38.

**Akiyama Y, Yamada-Akiyama H, Ebina M. 2010.** Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. *Grassland Science* **56**: 217-223.

**Ambiel AC, Machado Neto NB, Guaberto LM, Vanderlei TM. 2010.** *Brachiaria* germplasm dissimilarity as shown by RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **10**: 55-64.

**Anamthawat-Jónsson K, Schwarzacher T, Leith AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS. 1990.** Discrimination between closely related Triticeae species using genomic DNA as a probe. *Theoretical and Applied Genetics* **79**: 721-728.

**Andrade-Vieira LF, Reis GB, Torres GA, Oliveira AR, Brasileiro-Vidal AC, Pereira AV, Dvide LC. 2013.** Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. *Crop Science* **53**: 1917-1924.

**Argel PJ, Miles JW, Guiot JD, Cuadrado H, Lascano CE. 2007.** *Cultivar Mulato II (Brachiaria híbrida CIAT 36087)*. Cali, CO: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

**Assis GML, Euclides RF, Cruz CD, Valle CB. 2002.** Genetic divergence in *Brachiaria* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **2**: 331-338.

**Azevedo ALS, Costa PP, Machado MA, Paula CMP, Souza Sobrinho F. 2011.** High degree of genetic diversity among genotypes of the forage grass *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae) detected with ISSR markers. *Genetics and Molecular Research* **10**: 3530-3538.

**Baptista-Giacomelli FR, Pagliarini MS, Almeida JL. 2000.** Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. *Genetics and Molecular Biology* **23**: 681-684.

**Belyayev A, Raskina O, Nevo E. 2001.** Evolutionary dynamics and chromosomal distribution of repetitive sequences on chromosomes of *Aegilops speltoides* revealed by genomic in situ hybridization. *Heredity* **86**: 738-742.

**Benabdelmouna A, Shi Y, Abirached-Darmency M, Darmency H. 2001.** Genomic in situ hybridization (GISH) discriminates between the A and the B genomes in diploid and tetraploid *Setaria* species. *Genome* **44**: 685-690.

**Bernini C, Marin-Morales MA. 2001.** Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. *Cytobios* **104**: 157-171.

**Cao M, Sleper DA, Dong F, Jiang J. 2000.** Genomic in situ hybridization (GISH) reveals high chromosome pairing affinity between *Lolium perenne* and *Festuca mairei*. *Genome* **43**: 398-403.

**Darlington CD, Wylie AP. 1955.** *Chromosome atlas of flowering plants*. London: Allen & Unwin.

**Dolezel J. 1997.** Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* **38**: 285-302

**Dong F, Mcgrath JM, Helgeson JP, Jiang J. 2001.** The genetic identity of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. *Genome* **44**: 729-734.

**Dujardin M. 1979.** Additional chromosome numbers and meiotic behavior in tropical African grasses from western Zaire. *Canadian Journal of Botany* **57**: 864-876.

**Ferdoroff N. 2000.** Transposons and genome evolution in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* **97**: 7002-7007.

**Fu S, Yang M, Fei Y, et al. 2013.** Alterations and Abnormal Mitosis of Wheat Chromosomes Induced by Wheat-Rye Monosomic Addition Lines. *PLoS ONE* **9**: e106288.

**González-Melendi P, Wells B, Beven A, Shaw PJ. 2001.** Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *The Plant Journal* **27**: 223-233.

**Książczyk T, Taciak M, Zwierzykowska E. 2010.** Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. *Journal of Applied Genetics* **51**: 449-460.

**Książczyk T, Zwierzykowska E, Molik K, Taciak M, Krajewski P, Zwierzykowski Z. 2014.** Genome-dependent chromosome dynamics in three successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrid. *Protoplasma* **252**: 985-996.

**Kopecký D, Loureiro J, Zwierzykowski Z, Ghesquière M, Dolezel J. 2006.** Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 731–742.

**Kopecký D, Bartos J, Zwierzykowski Z, Dolezel J. 2009.** Chromosome pairing of individual genomes in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), its progenitors, and hybrids with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Cytogenetic and Genome Research* **124**: 170–178.

**Leitch IJ, Bennett MD. 2004.** Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 651-663.

**Lutts S, Ndikumana J, Louant BP. 1991.** Fertility of *Brachiaria ruziziensis* in interspecific crosses with *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria brizantha*: Meiotic behavior, pollen viability and seed set. *Euphytica* **57**: 267–274.

**Mendes DV, Boldrini KR, Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB. 2006.** Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **150**: 441–446.

**Mendes-Bonato AB, Pagliarini, MS, Silva N, Valle CB. 2001.** Meiotic instability in invader plants of signal grass *Brachiaria decumbens* Stapf (Gramineae). *Acta Scientifica* **23**: 619–625.

**Mendes-Bonato AB, Junqueira Filho RG, Pagliarini MS, Valle CB, Penteado MIO. 2002a.** Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. *Cell Biology International* **26**: 641–646.

**Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Forli F, Valle CB, Penteado MIO. 2002b.** Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Euphytica* **125**: 419–424.

**Mendes-Bonato AB, Pagliarini MS, Valle CB. 2006a.** Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific hybrid of *Brachiaria* (Gramineae). *Genetics and Molecular Biology* **29**: 122–125.

**Mendes-Bonato AB, Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB. 2006b.** Cytogenetic evidence for genome elimination during microsporogenesis in interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). *Genetics and Molecular Biology* **29**: 711–714.

**Morrone O, Zuloaga FO. 1992.** Revision de las espécies sudamericanas nativas e introducidas de los gêneros *Brachiaria* e *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Darwiniana* **1**: 43–109.

**Nani TF. 2015.** *Citogenética de espécies de Brachiaria: Contribuições para construção de mapas físicos*. Tese, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

**Nielen S, Almeida LM, Carneiro VTC, Araujo ACG. 2010.** Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. *Sexual Plant Reproduction* **23**: 45–51.

**Nunes JD, Azevedo ALS, Pereira AV, et al. 2013.** DNA elimination in embryogenic development of *Pennisetum glaucum* x *Pennisetum purpureum* (Poaceae) hybrids. *Genetics and Molecular Research* **12**: 4817-4826.

**Ndikumana J. 1985.** *Etude de l'hybridation entre espèces apomictiques et sexuées dans le genre Brachiaria*. PhD dissertation, Université Catholique de Louvain, Belgium.

**Pagliarini MS. 2001.** Citogenética aplicada ao melhoramento. In: Nass LL, et al, eds. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 871-910.

**Pagliarini MS, Risso-Pascotto C, Souza-Kaneshima AM, Valle CB. 2008.** Analysis of meiotic behavior in selecting potential genitors among diploid and artificially induced tetraploid accessions of *Brachiaria ruziziensis* (Poaceae). *Euphytica* **164**: 181–187.

**Pasakinskiene I, Jones N. 2005.** A decade of “chromosome painting” in *Lolium* and *Festuca*. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 393–399.

**Pereira RC, Davide LC, Techio VH, Timbó ALO. 2012.** Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. *Ciência Rural* **42**: 1278-1285.

**Raskina O, Barber JC, Nevo E, Belyayev A. 2008.** Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research* **120**: 351–357.

**Reis GB, Mesquita AT, Torres GA, Andrade-Vieira LF, Pereira AV, Davide LC. 2014.** Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). *Comparative Cytogenetics* **3**: 31-41.

**Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS. 1996.** Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB, eds. *Brachiaria: Biology, agronomy and improvement*. Cali: CIAT/Brasília:EMBRAPA-CNPGC, 1–15.

- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB, Jank L. 2004.** Asynchronous meiotic rhythm as the cause of selective chromosome elimination in an interspecific *Brachiaria* hybrid. *Plant Cell Reports* **22**: 945–950.
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB. 2005a.** Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Plant Cell Reports* **23**: 522–527.
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB. 2005b.** Meiotic behavior in interspecific hybrid between *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Euphytica* **145**: 155–159.
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB. 2006.** A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* **53**: 7-10.
- Roa F, Guerra M. 2012.** Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology* **12**: 1-13.
- Sato S, Isobe S, Asamizu E, et al. 2005.** Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pretense* L.). *DNA Research* **12**: 301–364.
- Souza Sobrinho F. 2005.** Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: *Forragicultura e Pastagens: Temas em evidência*. Lavras: Editora UFLA, 65-120.
- Takayama SY, Freitas PM, Pagliarini MS, Batista LAR. 1998.** Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum* (Plicatula group) from different regions in Brazil. *Euphytica* **99**: 89-94.
- Timbó ALO, Pereira RC, Souza Sobrinho F, Davide LC. 2014a.** Nuclear DNA content and chromosome number in *Brachiaria* spp. genotypes. *Revista Ciência Agronômica* **45**: 62-67.

**Timbó ALO, Souza PNC, Pereira RC, et al. 2014b.** Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *Revista Brasileira de Zootecnia* **43**: 127-131.

**Tohme J, Palacios S, Lenis S, Roca W. 1996.** Applications of biotechnology to *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB, Kumble V, eds. *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 196-204.

**Torres González AM, Morton CM. 2005.** Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**: 36–44

**Valle CB, Savidan, Y. 1996.** Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: Miles JW, Maass BL, Valle CB, Kumble V, eds. *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT/Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 147-163.

**Valle CB, Pagliarini MS. 2009.** Biology, Cytogenetics, and Breeding of *Brachiaria* In: Singh RJ ed. *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement*. Boca Raton: CRC Press, 103-151.

**Wicker T, Sabot F, Hua-Van A. 2007.** A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* **8**: 973-982.

**Winterfeld G, Röser M. 2007.** Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of perennial oats (Poaceae: Aveneae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **155**: 193-210.

**Wolny E, Hasterok R. 2009.** Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Annals of Botany* **104**: 873–881.

**Wolny E, Lesniewska K, Hasterok R, Langdon T. 2011.** Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. *Chromosoma* **120**: 199–212.

**Zao M, Zhi H, Doust AN, et al, 2013.** Novel genomes and genome constitutions identified by GISH and 5S rDNA and knotted1 genomic sequences in the genus *Setaria*. *BMC Genomics* **14**: 1-12.

**Zwierzykowski Z, Tayyar R, Brunell M, Lukaszewski AJ. 1998.** Genome Recombination in Intergeneric Hybrids Between Tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *The American Genetic Association* **89**: 324–328.

**Zwierzykowski Z, Zwierzykowska E, Kosmala A, Luczak M, Joks W. 2003.** Genome recombination in early generations of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrids. In: Zwierzykowski Z, Surma M, Kachlicki P, eds. *Application of Novel Cytogenetic and Molecular Techniques in Genetics and Breeding of the Grasses*, 63–69 (International Workshop, Poznan, Poland).

**Zwierzykowski Z, Zwierzykowska E, Taciak T, Jones N, Kosmala A, Krajewski P. 2008.** Chromosome pairing in allotetraploid hybrids of *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* revealed by genomic in situ hybridization (GISH). *Chromosome Research* **16**: 575–585.

**ARTIGO 2**

**Distribuição cromossômica de modificações de histonas e metilação do DNA em espécies e híbridos interespecíficos do gênero *Brachiaria* (Poaceae)**

## RESUMO

As modificações pós-traducionais de histonas e a metilação do DNA são processos epigenéticos que estão envolvidos na organização estrutural e funcional do genoma, os quais podem ser herdados ao longo das gerações. A di-metilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me2) é uma marca característica de cromatina ativa, a di-metilação da lisina 9 na H3 (H3K9me2) está associada a heterocromatina, assim como a 5-metilcitosina (5-mCyt) que atua no silenciamento gênico. O objetivo desse estudo foi avaliar a distribuição cromossômica da H3K4me2, H3K9me2 e da 5-metilcitosina em espécies e híbridos interespecíficos de *Brachiaria* com diferentes níveis de ploidia e modo de reprodução. Relações entre as marcas epigenéticas e as regiões cromossômicas também foram analisadas e discutidas. Para preparo das lâminas, pontas de raízes foram pré-tratadas com ciclohexamida, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v/v) e imunodetectadas indiretamente com anticorpos primário anti-H3K4me2 e anti-H3K9me2 *rabbit* policlonal e anti-5-methylcytosine *mouse* monoclonal, que foram detectados com anticorpo secundário anti-*rabbit* FITC-conjugated e anti-*mouse* TRITC-conjugated. Foi observada correlação entre H3K9me2 e 5-mCyt na região organizadora do nucléolo, domínio central centromérico e região pericentromérica. A dimetilação na lisina 4 da histona H3 (H3K4me2) foi detectada em domínios eucromáticos, localizados principalmente na região terminal cromossômica. A comparação da distribuição cromossômica de modificações de histonas entre as espécies e híbridos revelou uma maior variação de tipos cromossômicos para a marcação heterocromática (H3K9me2) em *B. decumbens* e no híbrido 963, enquanto que, para a marca epigenética da eucromatina (H3K4me2), a variação foi maior em *B. brizantha*, *B. decumbens* e híbrido 963. A distribuição cromossômica da 5-mCyt foi similar entre *B. brizantha* e *B. decumbens*, espécies tetraploides e apomíticas, as quais diferiram do observado em *B. ruziziensis*, espécie diploide e sexual. Significativas alterações na metilação do DNA foram observadas na *B. ruziziensis* duplicada e nos híbridos interespecíficos, possivelmente como consequência dos processos de poliploidização e hibridação, respectivamente.

Palavras-chave: Epigenética. Eucromatina. Forrageira. Heterocromatina. H3K9me2. H3K4me2. Poliploides. 5-mCyt.

## ABSTRACT

Histone post-translational modifications and DNA methylation are epigenetic processes that are involved in structural and functional organization of the genome, which may be inherited through generations. Histone H3 lysine 4 di-methylation (H3K4me2) is a characteristic mark of active chromatin, histone H3 lysine 9 di-methylation (H3K9me2) is associated with heterochromatin, as well as 5-methylcytosine which operates in gene silencing. The aim of this study was to evaluate the chromosomal distribution of H3K4me2, H3K9me2 and 5-methylcytosine in species and interspecific hybrids of *Brachiaria* with different ploidy levels and reproduction modes. Relations between epigenetic marks and chromosomal regions were also analyzed and discussed. For slides preparation, root tips were pretreated with cycloheximide and fixed in ethanol: acetic acid (3:1 v/v) solution and immunodetected indirectly with primary antibodies anti-H3K4me2, anti-H3K9me2 rabbit polyclonal and anti-5-methylcytosine mouse monoclonal, which were detected with anti-rabbit FITC-conjugated and anti-mouse TRITC-conjugated secondary antibodies. Relation between H3K9me2 and 5-mCyt was observed in the nucleolus organizer region, centromeric central domain and pericentromeric region. Histone H3 lysine 4 di-methylation (H3K4me2) was detected in euchromatic domains, mainly located in the terminal chromosomal regions. Comparison of chromosomal distribution in histone modifications among species and hybrids showed greater variation of chromosomal types for the heterochromatic marks (H3K9me2) in *B. decumbens* and the 963 hybrid, while, for the euchromatin epigenetic mark (H3K4me2), the variation was higher in *B. brizantha*, *B. decumbens* and 963 hybrid. The chromosome distribution of 5-mCyt was similar between *B. brizantha* and *B. decumbens*, tetraploid and apomictic species, which differ from the distribution observed in *B. ruziziensis*, a diploid and sexual species. Significant alterations in DNA methylation were observed in the duplicated *B. ruziziensis* and in the interspecific hybrids, possibly as a result of hybridization and polyploidization process.

Keywords: Epigenetic. Euchromatin. Forage. Heterochromatin. H3K9me2. H3K4me2. Polyploidy. 5-mCyt.

## 1 INTRODUÇÃO

Modificações epigenéticas podem acarretar em diferenças no nível de expressão gênica, com consequente efeito fenotípico (Rapp e Wendel 2005). Esses mecanismos podem ser herdáveis, desempenhando assim um papel importante no processo evolutivo e de adaptação em plantas (Rapp e Wendel 2005; Furusawa e Kaneko 2013). Desta forma, é interessante o estudo da distribuição nuclear e em nível cromossômico, de marcas epigenéticas em genótipos com diferentes modos de reprodução e que reúnam em seu processo evolutivo, eventos de poliploidização e hibridação interespecífica. A avaliação de espécies de *Brachiaria* pode ser um bom modelo para estudar a plasticidade do genoma em plantas de reprodução sexual e apomítica (assexuais), diploide e tetraploides naturais (alotetraploides) e induzidos (autotetraploides) e também em híbridos interespecíficos. Dentre as alternativas de estudo, é possível realizar um mapeamento de regiões eucromáticas, heterocromáticas e silenciadas nos cromossomos/genomas de *Brachiaria*, utilizando a técnica de imunolocalização de histonas modificadas e metilação do DNA.

Os diferentes níveis de organização da cromatina (eucromatina e heterocromatina) são citologicamente caracterizados por diferentes graus de compactação e atividade transcricional e estão associados a importantes marcas epigenéticas, tais como modificações pós-traducionais de histonas e metilação do DNA (Fuks 2005; Bannister e Kouzarides 2011). Em resposta a mudanças ambientais e de desenvolvimento, a acessibilidade da cromatina é dinamicamente regulada por modificações de histonas, que podem ser covalentemente modificadas em diferentes aminoácidos da cauda N-terminal, por diferentes marcas químicas (acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, biotilação and ADP-ribosilação) (Chen et al. 2010; Bannister e Kouzarides 2011).

As modificações de histonas ou a combinação de modificações implicam em diferentes efeitos na estrutura e função da cromatina. Três tipos

de metilação de histonas são as mais estudadas em plantas: mono, di e tri-metilação da lisina 4 na H3 (H3K4me, H3K4me2 e H3K4me3) que são marcas de cromatina ativa, tri-metilação da lisina 27 na H3 (H3K27me3) que está associada à repressão da expressão gênica e di-metilação da lisina 9 na H3 (H3K9me2), característica de heterocromatina (Feng e Jacobsen 2011).

A metilação do DNA no carbono 5 da citosina (5-mCyt) é também um dos processos epigenéticos que estão envolvidos na organização estrutural e funcional do genoma (Saze et al. 2012). Em plantas, a metilação ocorre em três contextos na sequência do DNA, CG, CHG (H = A, T, C) e CHH (Law e Jacobsen 2010). Há dois padrões de metilação do DNA no genoma, o primeiro ocorre em alta frequência nos elementos transponíveis (TEs), em outras sequências de DNA repetitivo como a região pericentromérica e em pequenas áreas entre genes nos braços cromossômicos. O segundo ocorre exclusivamente no contexto CG, na região de transcrição ou em genes (Feng e Jacobsen 2011).

Experimentos de imunolocalização utilizando anticorpos contra modificações de histonas ou metilação do DNA, permitem a investigação da distribuição nuclear e análise de todo epigenoma em nível cromossômico. Alternativamente, a análise de marcas epigenéticas pode ser feita em nível molecular, por meio do sequenciamento da imunoprecipitação da cromatina (ChIP-seq) (Park 2009), no entanto, com essa técnica não é possível distinguir as células em diferentes fases do ciclo celular, tão pouco a distribuição cromossômica.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a distribuição cromossômica de histonas modificadas associadas à eucromatina e heterocromatina (histona H3 dimetilada na lisina 4 –H3K4me2 e histona H3 dimetilada na lisina 9 - H3K9me2, respectivamente) e 5-metilcitosina em espécies e híbridos interespecíficos de *Brachiaria*. Relações entre as marcas epigenéticas (5mCyt e modificações de histonas) e as regiões cromossômicas que apresentam diferentes graus de compactação também foram analisadas e discutidas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

A técnica de imunolocalização foi aplicada em plantas sexuais de *Brachiaria ruziziensis* (cultivar Kennedy,  $2n = 2x = 18$  e genótipo tetraploidizado obtido por Timbó et al. (2014) na Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil,  $2n = 4x = 36$ ), nas apomíticas *Brachiaria brizantha* (cultivar Marandu,  $2n = 4x = 36$ ) e *Brachiaria decumbens* (cultivar Basilisk,  $2n = 4x = 36$ ) e em híbridos interespecíficos experimentais oriundos do cruzamento entre *B. ruziziensis* x *B. brizantha* (identificação: H1863,  $2n = 4x = 36$ ) e *B. ruziziensis* x *B. decumbens* (identificação: H963,  $2n = 4x = 36+2$ ). As contagens cromossômicas foram realizadas por PAULA (2015, Cap. 1)

### 2.2 Preparação das lâminas/obtenção de metáfases

As raízes foram coletadas e pré-tratadas com ciclohexamida ( $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 2h em temperatura ambiente e fixadas em solução de álcool etílico: ácido acético (3:1). Para preparo das lâminas, as raízes foram submetidas à digestão enzimática em um mix contendo 0,7 % celulase (Onozuka R10), 0,7% celulase (Sigma), 1% pectoliase (Sigma), 1% citohelicase (Sigma) por 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os meristemas foram macerados com auxílio de uma pinça em solução de álcool etílico: ácido acético (2:1) e as lâminas foram secas ao ar.

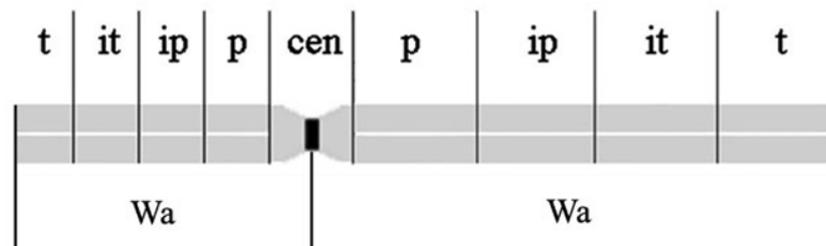
### **2.3 Imunodeteção de modificações de histonas e metilação do DNA (5-metilcitosina)**

A técnica de imunodeteção de modificações de histonas foi realizada segundo o método descrito por Chelysheva et al. (2013) com algumas modificações. As lâminas foram levadas ao micro-ondas em tampão citrato (pH6) por 45 segundos a 800w e imediatamente transferidos para PBS 1X (Tampão fosfato salino) durante 5 minutos. As lâminas foram incubadas em BSA 10% (Albumina de soro bovino) durante 1h em câmara úmida e temperatura ambiente e, posteriormente, em anticorpo primário (*Rabbit polyclonal IgG*, Millipore) H3K4me2 e H3K9me2 diluído 1:100 em BSA 3% por, no mínimo, 24h a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS 1X e a detecção foi realizada com anticorpo secundário anti-*rabbit IgG* FITC-conjugated diluído 1:100 em BSA 3% por 1h a 37°C. Após lavagens em PBS 1X, as lâminas foram montadas e contra-coradas em DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)/Vectashield H-1000 (1:100).

A imunolocalização da 5-metilcitosina foi baseada em Suzuki et al. (2010) com algumas modificações. As lâminas foram desnaturadas em formamida 70%/SSC2x a 70°C por 90seg, posteriormente desidratadas em série alcoólica (70, 90 e 100%) e secas ao ar. O material foi bloqueado com BSA 1% durante 30 minutos em câmara úmida (temperatura ambiente) e incubado com anticorpo primário anti-*5methylcytosine* (*mouse* monoclonal, Millipore) diluído em BSA 1% (1:200) por 1h a 37°C. Após 3 lavagens em PBS 1X foi aplicado anticorpo secundário (anti-*mouse IgG* TRITC-conjugated) diluído em BSA 1% (1:200) por 1h a 37°C sob condições afóticas. As lâminas foram montadas e contra-coradas em DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol)/Vectashield H-1000 (1:100).

## 2.4 Microscopia e processamento das imagens

Imagens foram capturadas usando uma câmera QImaging Retiga EXi CCD acoplada ao microscópio de epifluorescência Olympus BX 60 e o contraste final feito com o software Photoshop CS3. Para definir o posicionamento dos sinais do anticorpo no cromossomo foi utilizada a classificação das regiões cromossômicas proposta por Roa e Guerra (2012), caracterizada como região centromérica (cen), proximal (p), intersticial-proximal (ip), intersticial-terminal (it), terminal (t) e todo o braço (wa) (Figura 1).



**Regiões ao longo do cromossomo**

Figura 1 Divisão das regiões cromossômicas: região centromérica (cen), proximal (p), intersticial-proximal (ip), intersticial-terminal (it), terminal (t) e todo o braço (wa). Fonte: Adaptado de Roa e Guerra (2012).

## 3 RESULTADOS

### Contrastação direta com fluorocromo DAPI

Nas espécies e híbridos de *Brachiaria* avaliadas, a contrastação direta com fluorocromo 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) demonstrou a presença de bandas DAPI<sup>+</sup> colocalizadas na região centromérica (Figura 2A) e em pequenos blocos de cromatina condensada (cromocentros) no núcleo

interfásico (Figura 2C). A condensação tardia das regiões terminais dos cromossomos nas metáfases mitóticas também foi evidenciada (Figura 2B).

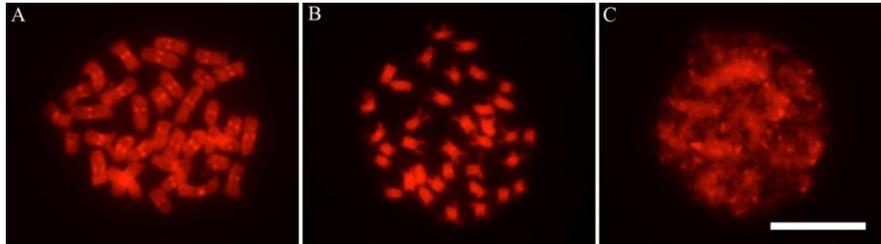


Figura 2 Características citológicas de *B. ruziziensis* ( $2n=4x=36$ ) utilizando o fluorocromo DAPI (vermelho). A) Bandas DAPI<sup>+</sup> colocadas na região centromérica. B) Condensação tardia da região terminal dos cromossomos metafásicos. C) Núcleo interfásico com cromocentros DAPI<sup>+</sup>. A barra corresponde a 10 $\mu$ m.

#### Imunodeteccção da H3K4me2 e H3K9me2 nos núcleos interfásicos e em cromossomos metafásicos

Nos núcleos interfásicos, a cromatina difusa foi marcada com o anticorpo contra H3K4me2 (Figura 3A), enquanto os cromocentros foram intensamente marcados com o anticorpo H3K9me2 (Figura 3B).

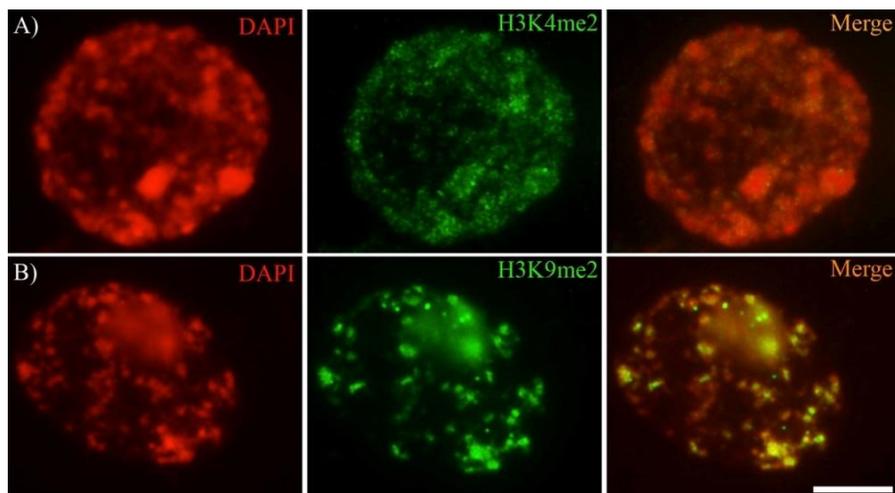


Figura 3 Imunodeteccção da histona H3K4me2 (A) e H3K9me2 (B) no núcleo interfásico de *B. brizantha*. A) cromatina difusa marcada com

anticorpo contra H3K4me2. B) Cromocentros marcados com anticorpo contra H3K9me2. A barra representa 10 $\mu$ m.

Sinais do anticorpo H3K4me2 foram visualizados nos domínios cromossômicos eucromáticos em posição terminal e intersticial-terminal (Figura 4). Em padrão oposto, sinais da H3K9me2 foram visualizados em domínios tipicamente heterocromáticos, incluindo o domínio central centromérico e pericentromérico (Figura 4 e 8).

A região organizadora do nucléolo (RON) não foi marcada com sinais H3K4me2 (Figura 4I, seta). No entanto, em todas as espécies e híbridos, algumas RONS apresentaram uma fraca marcação da H3K9me2 em alguns cromossomos (Figura 4J, seta).

O padrão cromossômico de dimetilação da H3K4 observado evidenciou cromossomos: (I) hipometilados; (II) com as duas regiões terminais eucromáticas metiladas; (III) com apenas uma das regiões terminais eucromáticas metiladas; (IV) hipermetilados e (V) com uma banda intersticial metilada (Figuras 4A1, C1, E1, G1, I1 e K1).

Em contraposição, os cromossomos com sinais do anticorpo contra H3K9me2 estavam: (VI) hipermetilados; (VII) com a região central centromérica e pericentromérica metilada; (VIII) com um braço e, algumas vezes, parte do outro braço metilado e (IX) hipometilados (Figuras 4B1, D1, F1, H1, J1 e L1).

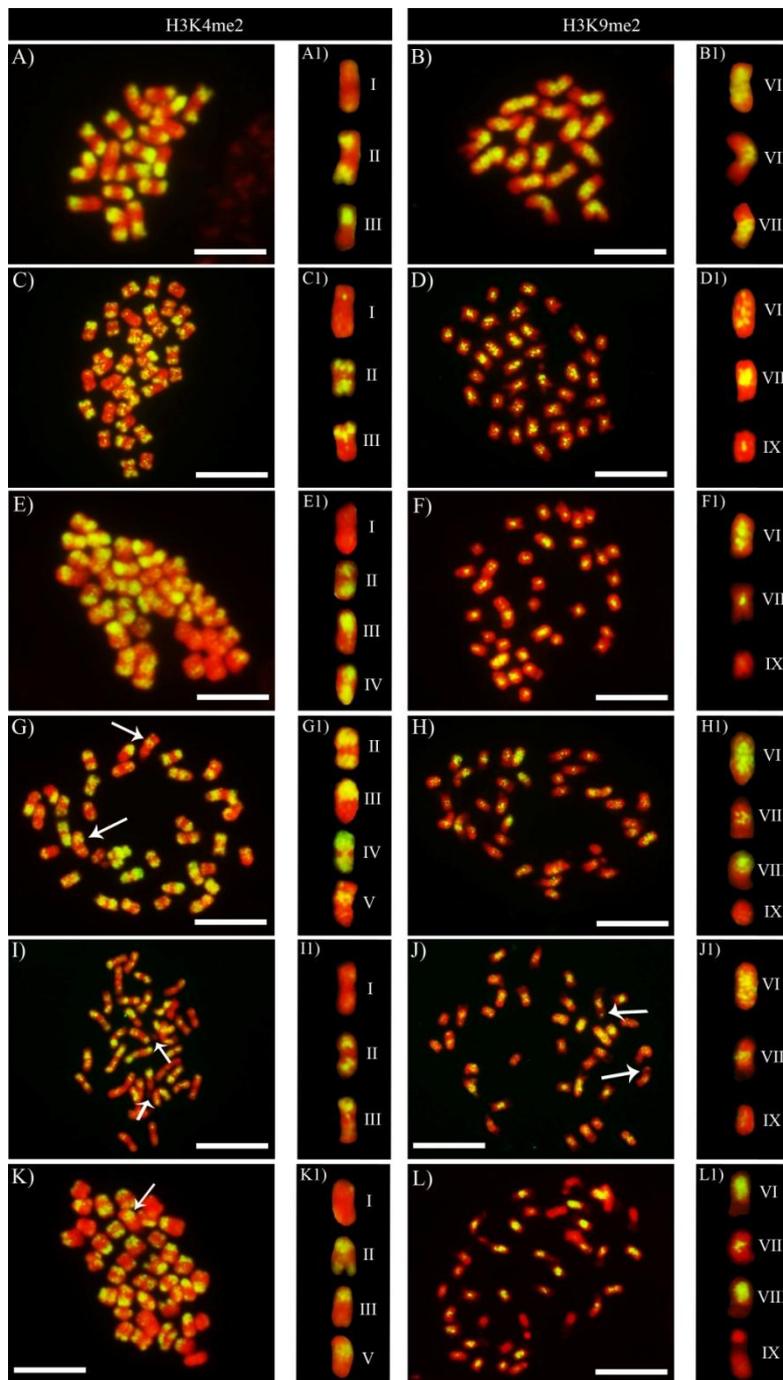


Figura 4 Imunodetecção da histona H3K4me2 e H3K9me2. Os cromossomos (DAPI) estão apresentados em vermelho e sinais das histonas H3K4me2 e H3K9me2 estão apresentados em amarelo em metáfases de *B. ruzizensis* (2x) (A e B), *B. ruzizensis* (4x) (C e D), *B. brizantha* (E e F), *B. decumbens* (G e H), híbrido 1863 (I e J) e híbrido 963 (K e L). Para o

anticorpo H3K4me2, os cromossomos foram classificados como: (I) hipometilados; (II) com as duas regiões terminais eucromáticas metiladas; (III) com apenas uma das regiões terminais eucromáticas metiladas; (IV) hipermetilados e (V) com uma banda intersticial metilada (A1, C1, E1, G1, I1 e K1). Para o anticorpos H3K9me2 foram classificados como: (VI) hipermetilados; (VII) com a região central centromérica e pericentromérica metilada; (VIII) com um braço e, algumas vezes, parte do outro braço metilado e (IX) hipometilados (B1, D1, F1, H1, J1 e L1). A barra representa 10 $\mu$ m.

Para *B. ruziziensis* diploide, os sinais dos anticorpos contra H3K4me2 e H3K9me2 foram complementares às regiões cromossômicas metiladas (Figura 5).

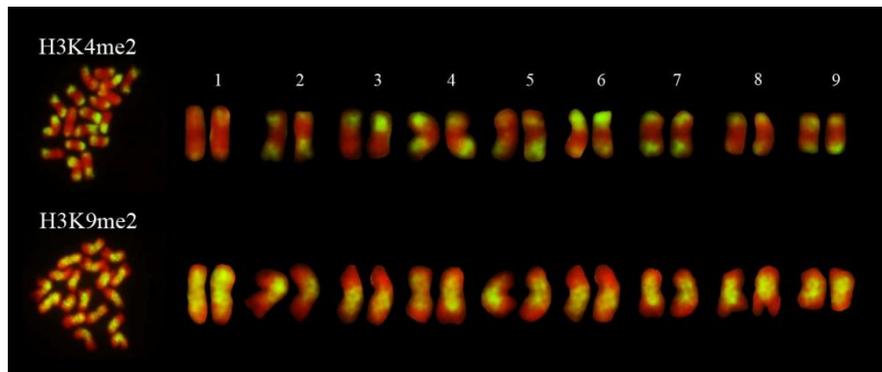


Figura 5 Comparação da distribuição cromossômica dos anticorpos H3K4me2 e H3K9me2 em metáfases de *B. ruziziensis* diploide.

### Imunodeteccção da 5-metilcitosina (5-mCyt)

As bandas DAPI<sup>+</sup>, colocalizadas com o centrômero, não apresentaram metilação do DNA (Figura 6G, seta e Figura 8). Sinais do anticorpo para a 5-mCyt foram detectados em algumas RONS (Figura 6A, seta) e em outras não (Figura 6B, seta). A distribuição desigual das regiões ricas em 5-mCyt nos cromossomos mostram que há variabilidade quantitativa (percentual de áreas metiladas) e qualitativa (intensidade de marcação) entre espécies e híbridos de *Brachiaria* (Figura 6).

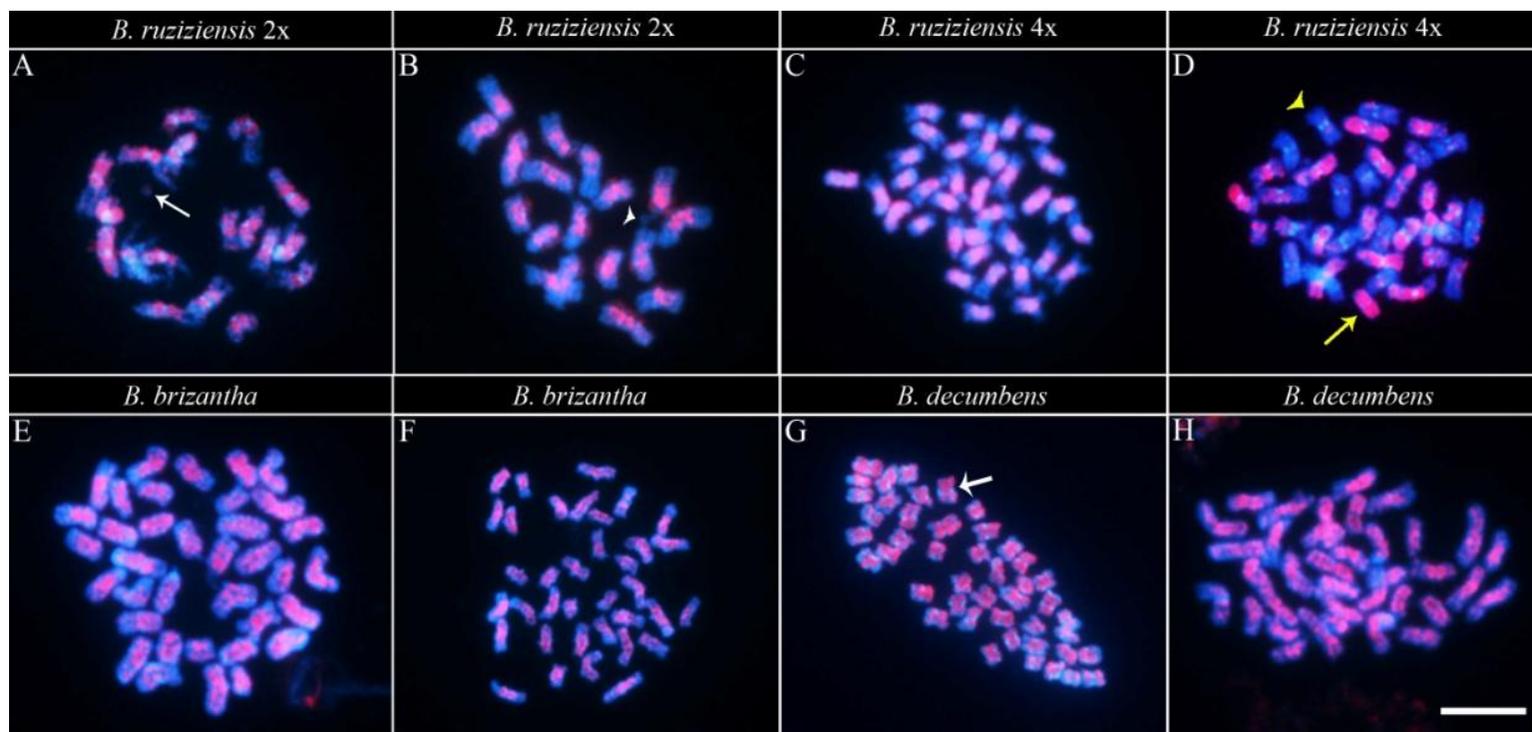


Figura 6 Imunodeteção da metilação do DNA em *B. ruziensi* 2x (A e B), *B. ruziensi* 4x (C e D), *B. decumbens* (E e F) e *B. brizantha* (G e H). Os cromossomos (DAPI) estão apresentados em azul e sinais da 5mCyt (TRITC) em vermelho. RON metilada (seta branca) e não metilada (ponta de seta branca). Cromossomos hipermetilado (seta amarela) e hipometilado (ponta de seta amarela). A barra representa 10 $\mu$ m.

Em *B. ruziziensis* diploide, a imunodeteção com anti-5mCyt marcou principalmente a região pericentromérica e proximal, no entanto, em alguns cromossomos o sinal se estendeu aos braços (Figura 6A e 6B). Não foi observada variação entre células de diferentes plantas. Na tetraploide, o padrão de metilação do DNA (5-mCyt) foi considerado heterogêneo, pois observaram-se heteromorfismos entre células de diferentes meristemas de uma mesma planta e até entre células de um mesmo meristema. Foram observadas metáfases com sinais frequentemente nas regiões pericentroméricas, proximais e braços cromossômicos (Figura 6C), e metáfases com cromossomos hiper e hipometilados (Figura 6D).

As espécies apomíticas *B. brizantha* (Figura 6E e 6F) e *B. decumbens* (Figura 6G e 6H) apresentaram visualmente maior área do cromossomo com sinais do anticorpo anti-5-mCyt. A marcação não se sobrepõe às regiões terminais de condensação tardia nos cromossomos. Não houve variação entre células de diferentes plantas.

Nos híbridos interespecíficos H1863 (Figura 7A e B) e H963 (Figura 7C e D), o padrão de metilação do DNA nas metáfases foi heterogêneo, incluindo diferenças na reatividade dos cromossomos à 5-mCyt entre plantas de um mesmo híbrido. Dentre as observações, destacam-se: (i) cromossomos ou braços hipometilados; (ii) cromossomos hipermetilados; (iii) hipometilação da região terminal dos cromossomos; (iv) cromátides irmãs ou regiões correspondentes entre elas com assimetria no grau de metilação, caracterizando a formação de cromossomos hemimetilados.

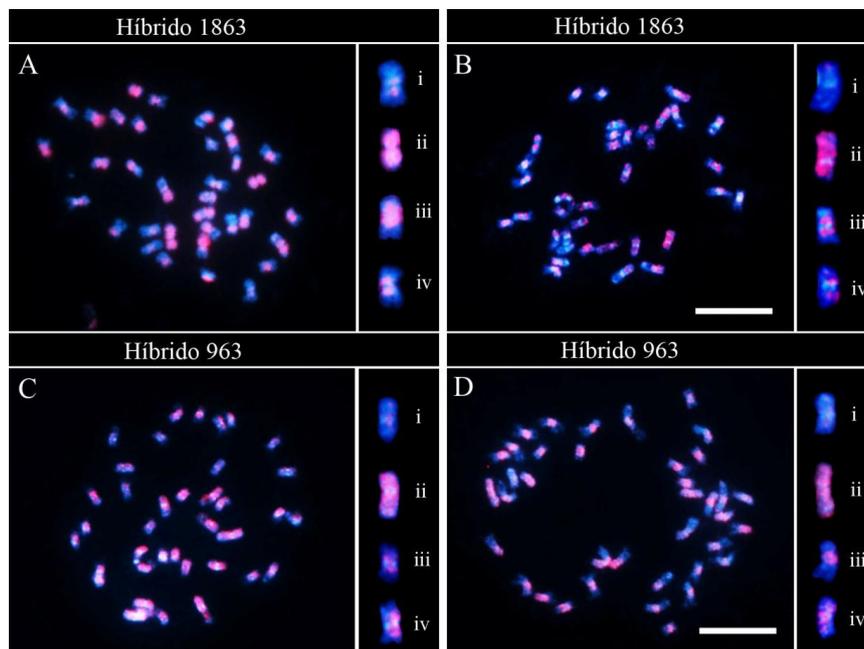


Figura 7 Imunodeteccção da metilação do DNA no híbrido 1863 (A e B) e híbrido 963 (C e D). Os cromossomos (DAPI) estão apresentados em azul e sinais da 5mCyt (TRITC) em vermelho. As variações na reatividade dos cromossomos à 5mCyt são identificadas nas imagens. Os cromossomos foram classificados como: (i) cromossomos ou braços hipometilados; (ii) cromossomos hipermetilados; (iii) hipometilação da região terminal dos cromossomos; (iv) cromátides irmãs ou regiões correspondentes entre elas com assimetria no grau de metilação. A barra representa 10 $\mu$ m.

#### 4 DISCUSSÃO

##### Imunodeteccção da H3K4me2, H3K9me2 e 5-mCyt nos núcleos interfásico e regiões cromossômicas

Nas espécies e híbridos de *Brachiaria* avaliados, os cromocentros DAPI<sup>+</sup> no núcleo interfásico foram altamente enriquecidos com H3K9me2, assim como observado em *Arabidopsis* (Soppe et al. 2002; Houben et al. 2003; Fransz et al. 2006). Ainda no núcleo interfásico, as bandas DAPI<sup>+</sup>, que em *Brachiaria* são colocalizadas com centrômero, também estavam duplamente metiladas na H3K9.

A região terminal cromossômica que apresenta condensação tardia foi fortemente dimetilada na lisina 4 da histona H3, uma marca característica de eucromatina ativa (Feng e Jacobsen 2011), o que indica que esta região cromossômica é rica em genes. Correlação entre a região de condensação terminal tardia e a H3K4me2 também foi relatada para *C. spiralis* e *Eleutherine bulbosa* (Feitoza e Guerra 2011) e em linhagens e híbridos de milho (Shi e Dawe 2006; He et al. 2014). Também em milho e outros cereais, Anderson et al. (2006), mostraram a localização preferencial dos genes nas regiões distais dos braços cromossômicos, coincidente com os domínios eucromáticos detectados nos cromossomos de *Brachiaria* e seus híbridos.

A dimetilação na lisina 9 da histona H3 é uma marca característica de heterocromatina (Feng e Jacobsen 2011) importante no silenciamento de transposons e no controle da metilação do DNA (Bernatavichute et al. 2008). Essa marca epigenética foi observada preferencialmente em regiões pericentromérica e central centromérica, domínios tipicamente heterocromáticos, e às vezes, se estendeu aos braços cromossômicos nas espécies e híbridos avaliados neste trabalho. Em *Arabidopsis* foram observados dois padrões de di-metilação da H3K9, o primeiro em transposons e outros elementos repetitivos em braços cromossômicos em níveis relativamente baixos, e o segundo nas regiões pericentromérica/centromérica em níveis elevados (Bernatavichute et al. 2008).

Sinais da H3K9me2 e da 5mCyt foram concomitantemente observados na RON de alguns cromossomos, caracterizando o estado heterocromático (Neves et al. 2005) e a inatividade do locus rDNA 45S. A dimetilação da H3K9 na RON também foi observada em estudos com milho (Jin et al. 2008). O padrão inativo da RON determinado pelas marcas epigenéticas da H3K9me e da 5 mCyt foi associado também à hipoacetilação da H3 e ao elevado grau de condensação da cromatina rDNA (Neves et al. 2005). Em estudos com *Arabidopsis suecica*, Lawrence et al. (2004)

determinaram que genes de rRNA inativos estão associados com H3K9me2 e seus promotores são hipermetilados na citosina e genes ativos estão associados a H3K4me3 e hipometilados na citosina.

Na maioria dos eucariotos, o número de genes rRNA está em grande parte redundante em relação ao que é exigido para a formação do ribossomo, sendo assim, apenas uma pequena fração das unidades do rDNA são transcritas (Neves et al. 2005). Em ervilha, apenas cerca de 5% das unidades são transcritas (Gonzalez-Melendi et al. 2001), sugerindo que a maioria das unidades de rDNA permanecem transcricionalmente silenciadas. Sendo assim, o silenciamento da RON em alguns cromossomos de todas as espécies de *Brachiaria* avaliadas também é consistente com as evidências de que apenas um subconjunto de genes rRNA estão ativos.

Em espécies poliploides, como *B. decumbens*, *B. brizantha* e *B. ruziziensis*, e em híbridos a relação da H3K9me2 e 5mCyt com o silenciamento da RON é ainda sustentada pela expressão diferencial dos genes rDNA 45s também denominada de dominância nucleolar. Algumas evidências apontam que a dominância nucleolar ocorre como um controle de dosagem de genes com tendência a homogeneização, no qual um conjunto parental de genes rRNA deve ser seletivamente silenciado (Preuss e Pikaard 2007).

A imunomarcagem da 5-mCyt associada com observações da dimetilação da H3K9me revelaram o estado diferenciado da cromatina centromérica em dois domínios (Figura 8). O primeiro caracterizado pela interação com as proteínas de fundação do cinetócoro, que inclui a CENH3, com ausência de metilação do DNA e da H3K9me. O segundo domínio, mais centralizado, hipermetilado para ambos anticorpos e marcadamente heterocromático.

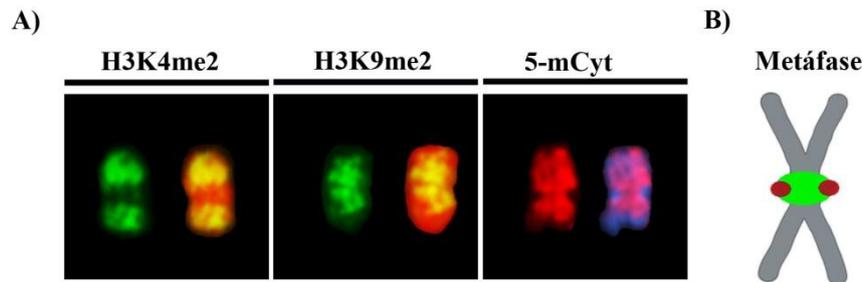


Figura 8 A) Comparação da imunodeteção das histonas H3K4me2, H3K9me2 e 5-mCyt na cromatina centromérica em cromossomos de *B. decumbens*. B) Esquema da cromatina centromérica subdividida em dois domínios: O primeiro mais lateral com ausência de metilação da H3K4me2, H3K9me2 e 5-mCyt (vermelho) e um segundo domínio central heterocromático hipermetilado para H3K9me2 e 5-mCyt (verde).

Essas observações vão ao encontro dos modelos eucariotos, os quais têm demonstrado que a especificação e a propagação do centrômero são definidas por mecanismos epigenéticos e não pela sequência de DNA (Amor et al. 2004). Na estrutura centromérica, a interação da variante da histona H3 (CENH3) e sua relação hierárquica com as demais proteínas de fundação do cinetócoro, tem papel fundamental para a identidade e funcionalidade do centrômero (Amor et al. 2004). Zhang et al. (2008) consideraram que a metilação do DNA é uma marca epigenética potencial para a identidade centromérica, por desempenhar um papel importante na demarcação da cromatina centromérica em relação à região de heterocromatina que a flanqueia. Em *Arabidopsis*, esses autores também observaram que os domínios de ocorrência da CENH3 e a região imediatamente adjacente, apresentavam significativa redução ou ausência do sinal da 5mCyt e da H3K9me2.

Essa heterocromatina centromérica é um componente essencial do centrômero (Amor et al. 2004) e provavelmente fornece um limite para prevenir o espalhamento da deposição da CENH3, de modo a também assegurar a identidade centromérica (Zhang et al. 2008). Um papel similar é

atribuído à heterocromatina pericentromérica, também observada em *Brachiaria* e seus híbridos. Amor et al. (2004) destacam várias outras funções, incluindo a formação de uma barreira física entre o centrômero e os braços eucromáticos e a supressão da recombinação meiótica.

A correlação entre a metilação da H3K9 e a metilação do DNA tem sido objeto de estudo de alguns autores. Em *Arabidopsis*, por exemplo, Bernatavichute et al. (2008) observaram uma alta coincidência entre H3K9me2 e metilação CHG em todo o genoma, sugerindo assim uma correlação entre essas marcas. O provável mecanismo que explica essa relação é que a metilação da H3K9 e da H3K27 catalisada pela histona metiltransferase SUVH4/KYP promove uma sinalização (código de histonas) para o recrutamento da CMT3 (Cromometilase 3) promover a metilação do DNA (Jackson et al. 2004; He et al. 2011). Em contrapartida, a família de proteínas SUVH (SUVH1-SUVH10) tem um domínio N-terminal SRA o qual se liga a citosina metilada (Rajakumara et al. 2011). Assim, as histonas metiltransferases H3K9 são recrutadas pela metilação do DNA através do domínio SRA, e provavelmente adicionam marcas de metilação na H3K9 nesses loci (Saze et al. 2012). Sítios de metilação da H3K9 podem também se ligar a CMT3, formando assim um mecanismo de autorreforço de marcas epigenéticas repressivas na heterocromatina (Johnson et al. 2007).

### **Comparação da distribuição da H3K4me2, H3K9me2 e 5-mCyt nos cromossomos metafásicos entre as espécies e híbridos avaliados**

A análise comparativa dos padrões cromossômicos de modificações de histonas permitiu categorizar nove tipos característicos (I a IX) de cromossomos nos genótipos avaliados. Considerando essa classificação, a maior variação de tipos cromossômicos para a marcação heterocromática (H3K9me2) foi constatada em *B. decumbens* e para o híbrido 963. Para a marca epigenética da eucromatina, a variação de tipos cromossômicos foi maior em *B. brizantha*, *B. decumbens* e híbrido 963.

Outra abordagem comparativa da distribuição das marcas epigenéticas entre cromossomos das espécies e híbridos revela que existem algumas similaridades. Em vários cromossomos de *B. ruziziensis* diploide ( $2n = 2x = 18$ ), *B. ruziziensis* tetraploidizada artificialmente ( $2n = 4x = 36$ ), na apomítica *B. brizantha* ( $2n = 4x = 36$ ) e no híbrido interespecífico 1863 (*B. ruziziensis* x *B. brizantha*  $2n = 4x = 36$ ) foi observada marcação da H3K4me2 predominantemente em uma ou nas duas regiões eucromáticas terminais que apresentam condensação tardia, e, em alguns casos, se estendendo até a região intersticial-terminal e intersticial-proximal. Também foram observados cromossomos hipometilados em *B. ruziziensis* diploide e tetraploide, *B. brizantha* e no híbrido 1863. Em estudo de comparação da distribuição de modificações de histonas ao longo dos cromossomos metafásicos entre milho cultivado e seus parentes selvagens, He et al. (2014) mostraram que não houve diferenças no padrão de modificações de histonas durante o processo de domesticação. Entretanto, Moghaddam et al. (2011) observaram que existe variação nos padrões de metilação da H3K4me2 e H3K27me3 entre acessos de *A. thaliana*. Os autores atribuem essa variação observada a sequências de elementos transponíveis (TEs), os quais podem afetar a regulação da transcrição através da deposição de modificações associadas à cromatina repressiva.

Nas espécies apomíticas *B. brizantha* e *B. decumbens* ( $2n = 4x = 36$ ) além das configurações acima descritas, os sinais do anticorpo contra a H3K4me2 se estenderam até a região proximal, não se sobrepondo apenas à banda DAPI<sup>+</sup> colocalizada com centrômero, sendo considerados assim hipermetilados. Em *B. decumbens* foi observada uma banda intersticial em dois cromossomos e ausência de cromossomo hipometilado, como observado nas outras espécies avaliadas.

No híbrido interespecífico 963 (*B. ruziziensis* x *B. decumbens*  $2n = 4x = 36+2$ ), a imunodeteção da H3K4me2 mostrou cromossomos hipometilados, assim como em *B. ruziziensis* e um cromossomo com marcação intersticial, assim como em *B. decumbens*, o que pode representar

a manutenção do padrão de herança epigenética. As modificações epigenéticas podem acarretar em diferenças no nível de expressão gênica, com consequente efeito fenotípico. Uma vez estabelecido, o estado epigenético pode ser herdado durante muitas gerações, o que confere implicações significativas no melhoramento de plantas, visto que a variação fenotípica herdável dentro de populações é a base para a seleção e melhoramento (Tsaftaris e Polidoros 2000).

Para a maioria dos cromossomos e regiões cromossômicas das espécies e híbridos, a hipermetilação da H3K9me2 se correlacionou com um nível alto de metilação de DNA, conforme já relatado anteriormente, sendo frequentemente concentrados na região central centromérica, pericentromérica, proximal e, em alguns cromossomos, se estendendo para a região intersticial-proximal. Ao contrário do observado nas demais espécies e híbridos, na *B. ruziziensis* diploide, espécie de reprodução sexual, não foram observados cromossomos hipometilados para H3K9. Quanto à metilação do DNA, em *B. ruziziensis* diploide, a marcação não apresentou variações e foi detectada na região pericentromérica e proximal, com alguns sinais observados nos braços cromossômicos. Esse padrão é diferente do observado em *Allium cepa*, cuja metilação ocorre principalmente na região terminal, além da marcação em alguns sítios proximais e intersticiais (Ruffini Castiglione et al. 1995). Em *Hordeum vulgare*, Ruffini Castiglione et al. (2008) demonstraram uma constante presença de sinais de metilação do DNA principalmente na região telomérica, pericentromérica e centromérica.

Em *B. ruziziensis* tetraploidizada (autopoliploide) foi observada uma heterogeneidade com relação à distribuição dos sinais da 5-mCyt. Algumas metáfases tiveram o padrão semelhante à *B. ruziziensis* diploide e outras apresentaram uma variação na distribuição cromossômica dessa marca, inclusive entre células de um mesmo meristema. Foram também observados cromossomos inteiros hipermetilados e hipometilados para sinais da 5-mCyt em *B. ruziziensis* tetraploide, o que caracteriza a ocorrência de silenciamento e expressão gênica, respectivamente. Essa variação pode ser oriunda do

processo de poliploidização, o qual é frequentemente acompanhado por alterações na metilação do DNA. A poliploidização pode induzir mudanças na metilação do DNA, que desempenha um papel fundamental na expressão gênica e regulação do genoma, afetando assim o crescimento, desenvolvimento e o fenótipo (Zhihui et al. 2011). Essa inconstância na metilação provavelmente promove uma flexibilidade para a planta poliploide responder as alterações substanciais de um genoma duplicado (Chen 2007; Zhihui et al. 2011). Além do evento de poliploidização, não se pode negligenciar um possível efeito da colchicina, agente indutor usado na duplicação cromossômica de *B. ruziziensis*, nas mudanças epigenéticas, Zingg e Jones (1997) relataram que a colchicina pode aumentar as taxas de metilação do DNA.

Nas espécies apomíticas *B. decumbens* e *B. brizantha*, além da região pericentromérica, os sinais de metilação do DNA estavam dispersos ao longo dos braços e não apresentaram uma distribuição cromossômica preferencial, assim como observado em *B. ruziziensis* diploide neste trabalho. Resultados semelhantes foram observados em *Triticale*, o qual teve uma distribuição não uniforme da 5-mCyt ao longo dos cromossomos e não ocorreu em regiões cromossômicas específicas (Castilho et al. 1999). Em *B. decumbens* e *B. brizantha*, os sinais da 5-mCyt não se colocaram com a região terminal de condensação tardia, corroborando com a informação de que esta é uma região de cromatina ativa, provavelmente rica em genes.

Nos híbridos interespecíficos houve diferenças na reatividade dos cromossomos à 5mCyt entre plantas de um mesmo híbrido. Essa variação pode ser oriunda do processo de hibridação. Segundo Liu e Wendel (2003) alterações epigenéticas parecem ser prevalentes durante a formação de híbridos interespecíficos e poliploides. Alterações na metilação do DNA também foram observados em alopoliploides recém-sintetizados de *Arabidopsis* (Madlung et al. 2002) e trigo (Shaked et al. 2001). A alteração da metilação em poliploides, oriundos de duplicação ou hibridação, pode ser atribuída a três fatores: (i) Perturbações na expressão da met1,

metiltransferase responsável pela metilação, a qual afeta a regulação gênica, crescimento e o desenvolvimento em alopoliploides (Chen et al. 2008); (ii) a alopoliploidia e a metilação do DNA podem ter efeitos distintos e sobrepostos, ou seja, a densidade e os sítios específicos de metilação podem afetar a regulação gênica de genomas alopoliploides (Chen 2007); (iii) a variação observada pode estar também relacionada ao silenciamento de genes redundantes em um genoma duplicado ou talvez, porque os sistemas de metilação do DNA são perturbados por efeito da hibridação interespecífica ou poliploidização (Fulnecek et al. 2007).

Cromossomos com assimetria no padrão de metilação do DNA entre cromátides irmãs ou região correspondente entre elas foram observados nos híbridos e podem refletir em diferença na atividade transcricional de genes. Essa heterogeneidade pode ser comparada ao fenômeno da hemimetilação, que foi inicialmente registrado em cromossomos de camundongo (Rougier et al. 1998) e embriões humanos (Baranov et al. 2005). A hemimetilação resulta do processo de duplicação, onde cada molécula de DNA dupla hélice tem apenas uma fita metilada. Em plantas, a manutenção da metilação do DNA é assegurada pela MET1 (metiltransferase 1) e CMT3 que tem afinidade pelo DNA hemimetilado e utiliza como base o estado metilado da outra fita de DNA (Probst et al. 2009; Saze et al. 2012). Entretanto a fita hemimetilada está passível de desmetilação, por ação de proteínas DNA glicosilases (Probst et al. 2009). O processo de desmetilação pode ser resultado de uma deficiência na manutenção enzimática após a replicação do DNA ou um processo enzimático ativo envolvendo glicosilases para proteger os genes de uma metilação potencialmente deletéria (Penterman et al. 2007). Nos híbridos de *Brachiaria* o modelo de metilação assimétrica observado possivelmente representa um processo de desmetilação, uma vez que, visualmente as duas fitas de DNA de uma mesma cromátide não apresentam metilação, enquanto a outra cromátide manteve o estado metilado. Esse processo também pode representar um mecanismo de silenciamento como

tentativa de homeostase e/ou regulação da dosagem gênica após a hibridação.

Diferente da assimetria na metilação do DNA observada para cromátides irmãs, variações entre regiões correspondentes de cromossomos homólogos parecem ser mais comuns, e foram observados em *Vicia faba* (Frediani et al. 1996) e *Hordeum vulgare* (Ruffini Castiglione et al. 2010). Substantial variação no padrão de metilação do DNA no genoma também foi relatada entre diferentes acessos de *A. thaliana* (Vaughn et al. 2007) e em duas subespécies de arroz (*Oryza sativa japonica* e *O. sativa indica*) e seus híbridos recíprocos (He et al. 2010).

A variação no padrão de metilação de histonas em espécies poliploides e híbridos como observado em *Brachiaria*, quando comparados com seus genitores e espécies poliploides é esperada, uma vez que, em resposta ao choque genômico, essas espécies devem superar a redundância genética e reestabelecer uma nova composição genômica através de modificações genéticas e epigenéticas (Chen 2010). Segundo Lynch e Force (2000) muitos genes duplicados estão sujeitos a perda progressiva, pseudogenização (perda da função), subfuncionalização (divisão das funções anteriores entre duplicatas) e neofuncionalização (evoluindo nova função em um dos genes duplicados).

## 5 CONCLUSÕES

Há relação entre H3K9me2 e 5-mCyt em algumas regiões organizadora do nucléolo, domínio central centromérico e região pericentromérica dos cromossomos de *Brachiaria* spp. A dimetilação na lisina 4 da histona H3 (H3K4me2) foi detectada em domínios eucromáticos, localizados principalmente na região terminal cromossômica.

A comparação da distribuição cromossômica de modificações de histonas entre as espécies e híbridos revelou uma maior variação de tipos cromossômicos para a marcação heterocromática (H3K9me2) em *B.*

*decumbens* e no híbrido 963, enquanto que, para a marca epigenética da eucromatina (H3K4me2), a variação foi maior em *B. brizantha*, *B. decumbens* e híbrido 963.

A distribuição cromossômica da 5-mCyt foi similar entre *B. brizantha* e *B. decumbens*, espécies tetraploides e apomíticas, as quais diferiram do observado em *B. ruziziensis*, espécie diploide e sexual. Significativas alterações na metilação do DNA foram observadas na *B. ruziziensis* duplicada e nos híbridos interespecíficos (H1863 e H963), possivelmente como consequência dos processos de poliploidização e hibridação, respectivamente.

**Normas da Revista Científica Plant Cell Reports (Versão preliminar)**

## REFERÊNCIAS

Amor DJ, Kalitsis P, Sumer H, Andy Choo KH (2004) Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *TRENDS Cell Biol* 14:359-368

Anderson LK, Lai A, Stack SM, Rizzon C, Gaut BS (2006) Uneven distribution of expressed sequence tag loci on maize pachytene chromosomes. *Genome Res* 16:115-122

Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21:381-395

Baranov VS, Pendina AA, Kuznetsova TV et al (2005) Peculiarities of metaphase chromosome methylation pattern in pre-implantation human embryos. *Tsitologiya* 47:723–730

Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 3:e3156

Castilho A, Neves N, Ruffini Castiglione R, Viegas W, Heslop-Harrison JS (1999) 5-Methylcytosine distribution and genome organization in Triticale before and after treatment with 5-azacytidine. *J Cell Sci* 112:4397-4404

Chelysheva LA, Grandont L, Grelon M (2013) Immunolocalization of meiotic proteins in *Brassicaceae*: Method 1. In: Pawlowski WP, Grelon M, Armstrong S (eds) *Plant Meiosis: Methods and Protocols*. Springer Science+Business Media, New York, pp 93-101

Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol* 58:377–406

Chen ZJ (2010) Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci* 15:57-71

Chen M, Ha M, Lackey E, Wang J, Chen ZJ (2008) RNAi of met1 reduces DNA methylation and induces genome-specific changes in gene expression and centromeric small RNA accumulation in Arabidopsis allopolyploids. *Genetics* 178:1845–1858

Chen M, Shaolei LV, Meng Y (2010) Epigenetic performers in plants. *Dev Growth Differ* 52:555–566

Feitoza L, Guerra M (2001) Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica* 139:305-314

Feng S, Jacobsen SE (2011) Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. *Curr Opin Plant Biol* 14:179–186

Franz P, Ten Hoopen R, Tessadori F (2006) Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res* 14:71–82

Frediani M, Giraldi E, Castiglione RM (1996) Distribution of 5-methylcytosine-rich regions in the metaphase chromosomes of *Vicia faba*. *Chromosome Res* 4:141-146

Fuks F (2005) DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 15:1–6

Fulnecek J, Matyasek R, Kovalík A (2009) Faithful inheritance of cytosine methylation patterns in repeated sequences of the allotetraploid tobacco correlates with the expression of DNA methyltransferase gene families from both parental genomes. *Mol Genet Genomics* 281:407–420

Furusawa C, Kaneko K (2013) Epigenetic Feedback Regulation Accelerates Adaptation and Evolution. *PLoS ONE* 8:e61251

González-Melendi P, Wells B, Beven A, Shaw PJ (2001) Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *Plant J* 27:223–233

He G, Zhu X, Elling AA, Chen L et al (2010) Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell* 22:17-33

He XJ, Chen T, Zhu JK (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and Animals. *Cell Res* 21:442-465

He S, Yan S, Wang P, Zhu W, Wang X, Shen Y, Shao K, Xin H, Li S, Li L (2014) Comparative analysis of genome-wide chromosomal histone modification patterns in maize cultivars and their wild relatives. *PLoS ONE* 9:e97364

Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I (2003) Methylation of histones H3 in euchromatin of plant chromosome depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* 33:967-973

Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z et al (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112:308–315

Jin W, Lamb JC, Zhang W, Kolano B, Birchler JA, Jiang J (2008) Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. *Chromosome Res* 16:1203–1214

Johnson LM, Bostick M, Zhang XY, Kraft E, Henderson I, Callis J, Jacobsen SE (2007) The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol* 17:379–384

Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11:204-220

Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CSA (2004) concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* 13:599–609

- Liu B, Wendel J (2003) Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Mol Phylogenet Evol* 29:365–379
- Lynch M, Force A (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459–473
- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L (2002) Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids. *Plant Physiol* 129:733–746
- Moghaddam AMB, Roudier F, Eifert M et al (2011) Additive inheritance of histone modifications in *Arabidopsis thaliana* intra-specific hybrids. *Plant J* 67:691–700
- Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecílio L, Viegas W (2005) Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res* 109:104–111
- Park PJ (2009) ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 10:669–680
- Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Henikoff S, Fischer RL (2007) DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proc Natl Acad Sci* 104:6752–6757
- Preuss S, Pikaard CS (2007) rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta* 1769:383–392
- Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 10:192–206
- Rajakumara E, Law JA, Simanshu DK, Voigt P, Johnson LM, Reinberg D et al (2011) A dual flip-out mechanism for 5mC recognition by the *Arabidopsis* SUVH5 SRA domain and its impact on DNA methylation and H3K9 dimethylation in vivo. *Genes Dev* 25:137–152

Rapp RA, Wendel JF (2005) Epigenetics and plant evolution. *New Phytol* 168:81–91

Roa F, Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evol Biol* 12:1-13

Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Péquirot E (1998) Chromosome methylation pattern during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* 12:2108–211

Ruffini Castiglione M, Giraldi E, Frediani M (1995) The DNA methylation pattern of *Allium cepa* metaphase chromosomes. *Biol Zbl* 114:57-66

Ruffini Castiglione M, Venora G, Ravalli C, Stoilov L, Gecheff K, Cremonini R (2008) DNA methylation and chromosomal rearrangements in reconstructed karyotypes of *Hordeum vulgare* L. *Protoplasma* 232:215–222

Ruffini Castiglione M, Venora G, Ravalli C, Gecheff K, Stoilov L, Cremonini R (2010) DNA methylation pattern in a barley reconstructed karyotype with deleted ribosomal gene cluster of chromosome 6H. *Protoplasma* 242:13–18

Shi J, Dawe RK (2006) Partitioning of the Maize Epigenome by the Number of Methyl Groups on Histone H3 Lysines 9 and 27. *Genetics* 173:1571–1583

Saze H, Tsugane K, Kanno T, Nishimura T (2012) DNA methylation in plants: Relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposons inactivation. *Plant Cell Physiol* 53:766-784

Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA (2001) Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13:1749–1759

Soppe WJJ, Jasencakova Z, Houben A, Kakutani T, Meister A, Huang MS, Jacobsen SE, Schubert I, Fransz PF (2002) DNA methylation controls

histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J* 21:6549–6559

Suzuki G, Shiomi M, Morihana MY, Mukai Y (2010) DNA methylation and histone modification in onion chromosomes. *Genes Genet Syst* 85:377-382

Timbó ALO, Souza PNC, Pereira RC et al (2014) Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). *Rev Bras Zootecn* 43:127-131

Tsafitaris AS, Polidoros AN (2000) DNA Methylation and Plant Breeding. *Plant Breed Rev* 18:87-176

Vaughn MW, Tanurdzic M, Lippman Z et al (2007) Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol* 5:e174

Zhang W, Lee HR, Koo DH, Jiang J (2008) Epigenetic Modification of Centromeric Chromatin: Hypomethylation of DNA Sequences in the CENH3-Associated Chromatin in *Arabidopsis thaliana* and Maize. *Plant Cell* 20:25–34

Zhihui L, Xiang L, Yun G, Liu S, Tao M, Xiao H, Qiao Y, Zhang Y, Luo J (2011) Polyploidization and epigenetics. *Chinese Sci Bull* 56:245–252

Zingg J-M, Jones PA (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:869–882