



THAÍS FURTADO NANI

**CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE
BRACHIARIA: CONTRIBUIÇÕES PARA A
CONSTRUÇÃO DE MAPAS FÍSICOS**

**LAVRAS-MG
2015**

THAÍS FURTADO NANI

**CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *BRACHIARIA*: CONTRIBUIÇÕES
PARA A CONSTRUÇÃO DE MAPAS FÍSICOS**

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

Orientadora
Dra. Vânia Helena Techio

Dr. Fausto Souza Sobrinho
Co-orientador

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).**

Nani, Thaís Furtado.

Citogenética de espécies de *Brachiaria*: Contribuições para a construção de mapas físicos / Thaís Furtado Nani. – Lavras: UFLA, 2015.

124 p. : il.

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

Orientador (a): Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. FISH. 2. Forrageira. 3. Cariograma. 4. Idiograma. 5. Variação intraespecífica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do (a) autor (a) e de seu orientador(a).

THAÍS FURTADO NANI

**CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DE *BRACHIARIA*: CONTRIBUIÇÕES
PARA A CONSTRUÇÃO DE MAPAS FÍSICOS**

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

Aprovada em 18 de setembro de 2015.

Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira	UFLA
Dr. Welison Andrade Pereira	UFLA
Dr. Lyderson Facio Viccini	UFJF

Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

LAVRAS-MG
2015

Aos amantes da arte de “citogeneticar”.

OFEREÇO

Aos meus pais Sônia e Luiz (in memoriam) pelo que fizeram por mim para que eu chegasse até aqui, por abdicarem de quase tudo para o bem das filhas e por serem os primeiros a aplaudirem minhas conquistas! E também à minha irmã e melhor amiga Paula, por fazer parte dessa vitória!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras por oferecer ensino de qualidade e dar a oportunidade de fazer de cada erro um aprendizado.

Meus sinceros agradecimentos aos professores e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela formação que, além das minhas próprias expectativas, me permitiu crescer tanto em termos pessoais quanto profissionais.

Em especial devo agradecer todo suporte advindo da minha orientadora Dra. Vânia Helena Techio, que acreditou no meu trabalho, e foi quem me colocou no caminho que me fez enxergar que os limites são impostos por nós mesmos. Cabe a cada um decidir qual é o seu, e com um pouco de coragem, aos poucos, deixamos de subestimar nossa própria capacidade de “evoluir”. Também não posso deixar de mencionar a participação da Professora Dra. Lisete Chamma Davide, a quem sou profundamente grata, por ter me acompanhado durante o mestrado, e por ter me apresentado para a beleza de se estudar citogenética. Suas perguntas são sempre surpreendentes e nos fazem refletir e extrair mais do que imaginamos dessa “arte”. O início de tudo, no entanto, aconteceu com o Professor Dr. Sandro Barbosa, quem me lançou no caminho da citogenética. Por sua influência conquistei tudo o que tenho em termos intelectuais. Não me esquecerei dos meus “alicerces”, afinal, foi também por meio deles que me tornei a pessoa que sou. Também gostaria de agradecer à Professora Dra. Giovana Augusta Torres, pela disponibilidade em ajudar a nos livrar das armadilhas que a ciência às vezes nos coloca! Suas críticas são sempre pertinentes, dadas no momento certo, mesmo que sutis, que com certeza me inspiraram na execução e na escrita dessa tese.

Agradeço ao Dr. Fausto de Souza Sobrinho, pela orientação e apoio para a execução dos experimentos.

Aos membros da banca de defesa pela avaliação, sugestões, comentários e enriquecimento deste trabalho.

Devo também expressar meus agradecimentos “às famílias de coração”. À família Alfenas, pela amizade desde a época da graduação e pelo constante incentivo. À família Lavras, que me acolheu de braços abertos desde minha primeira visita como estudante de iniciação científica. Reconheço toda a torcida que fizeram por mim para que aqui me estabelecesse. Aqui devo citar duas amigas muito especiais que tiveram papel muito importante durante a pós graduação. Ludmila e Jeanne! Amizade que virou família! Devo ainda ressaltar o apoio vindo da “querida Lud”. Pra mim o maior exemplo e que inspira nosso trabalho no laboratório. Obrigada pela constante apoio, críticas polidas, pela companhia nas horas mais complicadas principalmente no meu ano de doutorado

sanduíche nos EUA, a distância ficou bem menos sofrida sabendo que tinha alguém com quem contar que estava “por perto”! Enfim, pela sincera amizade.

Também quero agradecer à Cristina, que mostrou ser uma amiga ainda mais especial nas etapas finais do nosso trabalho. Com muita maturidade conseguimos passar por cima dos estresses que a vida profissional nos coloca e isso foi prova de que a amizade prevalece. Obrigada pela parceria!

Gisele pela amizade, agradável companhia, pela sensibilidade em deixar uma surpresa na gaveta quando a gente precisa! Especialmente muito obrigada pela sua contribuição nos experimentos para que eu conseguisse concluir as etapas finais do doutorado.

Yasmim e Daniele, agradeço o auxílio na condução dos experimentos. Com vocês pude mais aprender do que ensinar! Tive a oportunidade de dar os primeiros passos na arte de orientar.

A todos os demais membros do laboratório, em especial a Iara, além dos servidores do departamento pela boa convivência, espírito cooperativo e amizade!

Ao programa “Ciência sem fronteiras” por permitir abrir a mente de muitos estudantes do Brasil e fizesse com que eles desafiassem suas próprias limitações. Foi por meio desse programa que pude fazer contato profissional com representantes renomados da área de citogenética. Em especial o Dr. James A. Birchler da Universidade de Missouri - EUA, a quem devo agradecer pela orientação e por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu tivesse treinamento de excelente qualidade. Obrigada à Dra. Patrice S. Albert pelos conselhos, pela infinita paciência em me ensinar todas as técnicas executadas no laboratório e por ter abraçado a causa de alcançar parte dos objetivos ambiciosos do projeto. Aos parceiros Dr. James C. Schnable e doutorando Jacob D. Washburn pelo auxílio na obtenção de dados para a realização desse trabalho. Aos colegas de laboratório, em especial ao doutorando Nathaniel Graham e Dr. Ryan Douglas que me auxiliaram na comunicação na língua inglesa e no desenvolvimento das técnicas citogenéticas, por fazerem do laboratório um ambiente harmonioso, por terem me apresentado a cultura americana, por se fazerem meus amigos conselheiros da vida nos EUA e por me fazerem sentir quase como se eu estivesse em casa. Também devo agradecer aos amigos que fiz fora do laboratório em Columbia-MO, pelo auxílio na minha adaptação a uma cultura nova e pelos momentos felizes que ficarão para sempre na minha memória. A todos vocês não existem palavras suficientes para expressar minha gratidão.

Mãe, na sua figura e na figura de meu pai, obrigada por ter abdicado de muitos dos seus desejos para atender aos meus. Obrigada também por ter renunciado a minha companhia para que eu pudesse me dedicar aos estudos e

realizar meus sonhos. Espero conseguir retribuir tudo que fez e tem feito por mim! Foi pelo seu incentivo que cheguei até aqui!

Paula obrigada por ser a melhor irmã que alguém poderia ter! Quem eu sempre vou poder recorrer com a certeza de que de alguma forma você poderá me ajudar! Saiba que é recíproco! Obrigada por comemorar comigo todas minhas superações, por estar sempre presente nos momentos que a família precisa e eu não posso estar, pela sensibilidade em entender minhas falhas e me aceitar do jeito que eu sou.

Aos meus avós agradeço todas as orações, apoio nas minhas decisões, conselhos e exemplo de vida! Se que mesmo à distância vocês torcem pelo meu sucesso!

À minha madrinha, tia e amiga Silvana, meus agradecimentos por cuidar do meu equilíbrio mesmo a distância, por estar sempre presente tanto nos momentos de vitória quanto nos de fraqueza.

Luige, meu porto seguro e inspiração, obrigada pelo amor, pelo incentivo, por compreender meus momentos de ausência e minhas escolhas, mesmo que isso implicasse em aumentar a distância física entre nós. Saiba que seu apoio foi e é fundamental para a conclusão de todos os meus planos.

Às companheiras de república que se tornaram amigas, Marinês², Flávia e Juliana. O meu sincero agradecimento por terem feito parte desta etapa tão importante da minha vida. Gostaria de registrar aqui meus agradecimentos pela convivência harmoniosa e aprendizado que tive com elas.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e Fapemig pelo apoio financeiro.

À Deus, por querer que no final tudo dê certo!

“No great discovery was ever made without a bold guess.”

Isaac Newton

RESUMO

Brachiaria spp. (Poaceae) agrega espécies de interesse forrageiro. Análises citogenéticas mostram diferentes níveis de ploidia e variabilidade intraespecífica para a morfologia cromossômica e para o número de sítios de DNAr. Sequências de DNA repetitivo têm sido amplamente utilizadas em análises citogenéticas, contudo o uso de sequências de genes de cópia única/baixo número de cópias é pouco explorado, provavelmente pelo fato de o gênero não possuir espécie modelo de genoma sequenciado. O estudo das sequências que compõem o centrômero em cromossomos de *Brachiaria* spp., assim como detalhamento do cariótipo com localização de sequências específicas em *Brachiaria decumbens* são inexistentes. Em outras espécies do gênero as informações por vezes são divergentes. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo contribuir para a construção de mapas físicos dos cromossomos de *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* e *Brachiaria ruziziensis* com a localização de sequências repetitivas de DNAr 5S e 45S, Retrotransposons Centroméricos (CR), além de bandas CMA/DAPI. Genes de cópia única/baixo número de cópias também foram localizadas nos pares cromossômicos utilizando-se dados de RNAseq e de sequenciamento de *Setaria italica* e *Sorghum bicolor* por meio da técnica de FISH. A avaliação da atividade transcricional das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) foi também avaliada. Com o detalhamento do cariograma das três espécies foi possível a identificação de pares cromossômicos, incluindo a observação de pares heteromórficos, além de diferenças intra e interespecíficas quanto ao número e tamanho dos sítios de DNA ribossomais. O cariótipo das espécies avaliadas foi considerado simétrico. A atividade transcricional das RONs é variável e foram detectados um ou dois nucléolos heteromórficos. Alguns dos genes de cópia única/baixo número de cópias estavam em sintenia com sítios de genes ribossomais, o que foi fundamental para a identificação dos pares cromossômicos portadores de alguns dos referidos genes. Em *Brachiaria* spp., foram observados alguns cromossomos com segmentos de estrutura conservada. Possíveis quebras cromossômicas fizeram parte do processo de diversificação das espécies no gênero. O uso de dados de sequenciamento genômico foi de fundamental importância para o enriquecimento de análises citogenéticas.

Palavras-chave: Forrageira. FISH. Cariograma. Idiograma. Variação Intraespecífica.

ABSTRACT

Brachiaria spp. (Poaceae) are forage species. Cytogenetic analyses exhibit different ploidy levels and intra-specific variability related to chromosome morphology, and to the number and position of rDNA sites. Repetitive DNA sequences have been widely used in cytogenetic analyses, however the use of single copy genes or low copy number sequences is poorly explored, likely because no *Brachiaria* genome has been sequenced. Studies of centromeric sequences in *Brachiaria* spp. chromosomes, as well as karyotypes detailing the location of specific sequences in *Brachiaria decumbens* are nonexistent. Regarding other species of the genus, data are sometimes conflicting. Therefore, this study aims to characterize the karyotype of *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria ruziziensis* with the location of repetitive sequences of 5S and 45S rDNA, Centromeric Retrotransposons (CR), CMA/DAPI bands, and single copy genes/low copy number sequences in the chromosome pairs. Useful loci were obtained from RNAseq and sequencing data of *Setaria italica* and *Sorghum bicolor*, and the useful loci were used in FISH, and also to assess the transcriptional activity of the nucleolar organizing regions (NORs) in *Brachiaria* species. Karyograms were detailed, heteromorphic chromosome pairs were identified, and intraspecific and interspecific differences in the number and size of ribosomal DNA sites were detected. The karyograms of the three analyzed species are considered to be symmetric. The transcriptional activity of NORs is variable, and one or two heteromorphic nucleoli were detected. Some of the single copy gene/low copy number sequences are in synteny with ribosomal genes sites, which is important to identify some chromosomes. In *Brachiaria* spp., conserved structure of chromosome segments is observed. Possible chromosomal breaks that took place during the species diversification process in the genus are identified. The use of genomic sequencing data had great importance for the enrichment of cytogenetic analyses.

Keywords: Forage. FISH. Karyotype. Idiograms. Intraspecific variation.

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLA	SIGNIFICADO
ADH	Álcool Desidrogenase
BAC	Biblioteca Genômica
CHS	Chalcona Sintase
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CMA	Chromomicina A
CoGe	Accelerating Comparative Genomics
CR	Cetromeric Retrotransposons
CRM	Cetromeric Retrotransposons of Maize
CRM1	Cetromeric Retrotransposons of Maize 1
cv	cultivar
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GISH	Hibridização Genômica <i>in situ</i>
H3K9	Lisina 9 da Histona H3
M	Metacêntrico
NAD/NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCK	Fosfoenol Piruvato Carboxiquinase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Amplificação ao Acaso do Polimorfismo de DNA
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
RONs/ NOR	Regiões Organizadoras de Nucléolo
SM	Submetacêntrico
SSC	Tampão com NaCl e Citrato Trissódico
TE	Tampão com tris-HCl e EDTA
TNT	Tampão com tris-HCl, NaCl
WGS	Whole Genome Shotgun

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Taxonomia, origem e características botânico-agronômicas de <i>Brachiaria</i> spp.....	17
2.2	Importância econômica e melhoramento genético de <i>Brachiaria</i> spp.....	20
2.3	Aspectos cromossômicos em <i>Brachiaria</i> spp.....	23
2.4	Incentivo ao estudo dos genomas em <i>Brachiaria</i> spp.....	27
	REFERÊNCIAS.....	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	41
	ARTIGO 1: Mapa físico de sítios de DNA repetitivo em <i>Brachiaria</i> spp.: polimorfismos intra e interespecíficos	41
1	INTRODUÇÃO.....	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3	RESULTADOS.....	50
4	DISCUSSÃO.....	64
4.1	Localização de sequências repetitivas em cromossomos de <i>Brachiaria</i> spp.....	64
4.2	Atividade transcricional dos sítios de DNAr 45S.....	70
4.3	Rearranjos cromossômicos moldam o cariótipo em <i>Brachiaria</i> spp.....	72
5	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	ARTIGO 2: Localização de genes conservados em espécies de <i>Brachiaria</i> spp.....	85
1	INTRODUÇÃO.....	88
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.1	Seleção de sequências candidatas a sonda.....	91
2.2	Preparo de sondas.....	93
2.3	Coleta de material biológico e preparo de lâminas.....	95
2.4	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente	95
3	RESULTADOS.....	96
4	DISCUSSÃO.....	103
4.1	Localização de genes de cópia única/baixo número de cópias.....	103
4.2	Relação da posição gênica com a estrutura da cromatina.....	106
4.3	Desafios e avanços com estudos de genes de cópia única/baixo número de cópias.....	109
5	CONCLUSÕES.....	111

REFERÊNCIAS.....	112
INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR.....	120

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

No cenário mundial da produção de alimentos, as plantas forrageiras têm dado relevantes contribuições para o desenvolvimento do agronegócio da carne e do leite, desempenhando um papel importante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda, e, no caso do Brasil, na composição da pauta das exportações. Contribuições estas que se refletiram no aumento da área cultivada com pastagens no país (DA SILVA; NASCIMENTO JÚNIOR, 2006), de forma que os sistemas de produção se tornaram mais intensivos, demandando cultivares de forrageiras mais produtivos, de melhor qualidade e melhor adaptados a ofertas ambientais específicas (PEREIRA; REZENDE; RUIZ, 2005).

Brachiaria (Trinius, 1826) Grisebach, 1853 é um dos gêneros pertencentes à família Poaceae Barnhart, 1895 (FILGUEIRAS, 2012) que agrega espécies forrageiras de importância econômica (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996; SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971). Espécies como *Brachiaria ruziziensis* Germain, Evrard, 1953, *Brachiaria decumbens* Stapf, 1919 e *Brachiaria brizantha* (Hochstetter, Richard, 1851) Stapf, 1919 são o foco dos melhoristas pelo fato dessas espécies apresentarem características de interesse dos pecuaristas na formação de pastagens de qualidade (PEREIRA et al., 2001).

O histórico taxonômico de *Brachiaria* spp. é repleto de complicações e ambiguidades devido à fragilidade dos caracteres morfológicos adotados como diagnóstico do gênero. *Brachiaria* e *Urochloa* Beauvois, 1812, são gêneros que possuem muitas características em comum e a diferenciação das espécies se

restringe apenas à orientação das espiguetas (MORRONE; ZULOAGA, 1993; WEBSTER, 1987). Devido à existência de variação intraespecífica, a classificação taxonômica de maneira eficiente é dificultada (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

A caracterização citogenética de espécies do gênero é muito bem tratada na literatura em termos de número cromossômico. *B. ruziziensis* é tipicamente diploide ($2n=2x=18$) (BENINI; MARIN-MORALES, 2001), para *B. brizantha* já foram descritas variações quanto à ploidia, desde a ocorrência de plantas diploides ($2n=2x=18$) (NATH; SWAMINTHAN, 1957) até hexaploides ($2n=6x=54$) (SPIES; DU PLESSIS, 1987) e para *B. decumbens*, na maioria das vezes, são encontradas plantas tetraploides ($2n=4x=36$) e, com menor frequência, plantas diploides ($2n=2x=18$) (BENINI; MARIN-MORALES, 2001). O número básico mais frequente é de $x=9$ (GIUSSANI et al., 2001), embora existam relatos de $x=6$ (RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006), $x=7$ (DARLINGTON; WYLIE, 1955) e $x=8$ (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987). O primeiro detalhamento da morfologia dos cromossomos foi realizado por Bernini e Marin-Morales (2001) utilizando-se técnicas de citogenética convencional. Questionamentos a respeito do comportamento dos genomas nas espécies do gênero ainda não foram completamente elucidados e são raros os estudos que caracterizam regiões específicas dos cromossomos em espécies de *Brachiaria*.

Estudos com técnicas de citogenética molecular em *Brachiaria* spp. foram iniciados por Akiyama, Akiyama-Yamada e Ebina (2010) e Nielen et al. (2010) com a localização de sítios de DNAr 5S e 45S. Os autores encontraram evidências de aloploidia no gênero com base no número de sítios de DNA ribossomais que corroboraram com resultados de estudos meióticos anteriores com espécies do gênero desenvolvidos por Mendes-Bonato et al. (2006).

Quanto à determinação dos cromossomos portadores de sítios de DNAr 45S não existe concordância entre os trabalhos disponíveis na literatura. Sítios de DNAr 5S já foram estudados, contudo sua localização no par cromossômico específico ainda não foi realizada, assim como ainda não foram relatados sítios adicionais para o incremento dos mapas físicos em *Brachiaria* spp. Estudos de citogenética molecular são inexistentes para *B. decumbens*.

Apesar da importância econômica de espécies de *Brachiaria*, o gênero ainda não possui uma espécie modelo com genoma sequenciado. O desafio reside na busca de sequências conservadas em genomas já sequenciados de espécies afins.

Diante dos fatos apresentados, este trabalho teve por objetivo contribuir para a construção de mapas físicos cromossômicos de diferentes espécies de *Brachiaria* coletadas no Brasil. Os resultados obtidos tem o intuito de dar suporte para as hipóteses evolutivas no entendimento da relação entre os genomas existentes no gênero, oferecer subsídios para estudos taxonômicos, além de gerar informações importantes para programas de melhoramento, intercâmbios e programas de conservação de recursos genéticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taxonomia, origem e características botânico-agronômicas de *Brachiaria* spp.

Brachiaria spp. faz parte de um pequeno grupo de gêneros que inclui *Urochloa* (sinonímia *Brachiaria*), *Eriochloa* Kunth, 1815 e *Panicum* Linnaeus, 1929, todos pertencentes à tribo Paniceae Reichenbach, 1828, subfamília Panicoideae Braun, 1864, família Poaceae (FILGUEIRAS, 2012). Esse gênero abrange cerca de 100 espécies distribuídas pelos trópicos, especialmente na África, região dada como seu centro de origem (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). A introdução de *Brachiaria* spp. nas Américas permitiu ampla disseminação, pois as espécies que compõem o gênero possuem expressivo potencial adaptativo à condição de solos ácidos e de baixa fertilidade natural (BOGDAN, 1977).

No Brasil, os primeiros exemplares de espécies do gênero foram involuntariamente trazidos na época colonial quando a palha de *Brachiaria plantaginea* (Link, 1827) Hitchcock, 1909 e de *Brachiaria mutica* Stapf, 1919 era utilizada como leito para escravos em navios negreiros. A introdução oficial de *Brachiaria* spp. no país ocorreu com *B. decumbens* em 1952, no Instituto de Pesquisa Agropecuária de Norte (IPEAN), termo que inspirou o nome do cultivar: *B. decumbens* cv. Ipean (SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971). Nos primeiros anos de 1960, outro cultivar da espécie, oriundo de Uganda, porém registrado na Austrália como cv. Basilisk (MACKAY, 1982), foi levado para o Brasil por meio do Instituto de Pesquisas Internacionais em São Paulo. Até o início de 1970 houve intensa importação de sementes desse cultivar devido ao incentivo governamental à formação de pastagens. O monocultivo em áreas

extensas é um risco, independente do tipo de cultura, e esse problema pode ser ainda mais acentuado para o caso de espécies poliploides de *Brachiaria*, que se propagam principalmente por meio de reprodução apomítica. Extensas áreas foram prejudicadas especialmente por ataque da cigarrinha de pastagens e, por esse motivo, *B. decumbens* foi gradualmente substituída por *B. brizantha* cv. Marandú, como opção ao combate à praga devido a sua resistência (NUNES et al., 1984).

Os limites taxonômicos das espécies que compõem o grupo ainda não são muito bem definidos. Inicialmente, *Brachiaria* foi classificado como uma seção de *Panicum*, e posteriormente, promovido à categoria de gênero por Grisebach (1853). Trata-se de um gênero que compartilha diversas características com espécies de *Urochloa*, o que dificulta a classificação taxonômica de forma eficiente. As características que definem as espécies de *Brachiaria* são as espiguetas ovais a oblongas, arranjadas em racemos unilaterais com a gluma inferior adjacente à raquis, o que significa posição abaxial. Tal critério foi considerado caráter diagnóstico para transferir várias espécies de *Panicum* para *Brachiaria*, e desde então, a maioria dos taxonomistas adotaram essas características como as mais importantes para separar as espécies de *Brachiaria* das de outros gêneros (STAPF, 1920; TRINIUS, 1834).

Muito tem sido discutido sobre a fragilidade de se utilizar esse critério como característica determinante da separação de gêneros. De acordo com Renvoize, Clayton e Kabuye (1996), especialmente para *Brachiaria*, a diversidade intra e interespecífica natural muitas vezes constitui uma barreira para o reconhecimento de limites taxonômicos. Espécies do gênero *Urochloa* diferem de *Brachiaria*, apenas pelo fato de possuírem as espiguetas na orientação abaxial, ou seja, oposta a ráquis. A separação, contudo, só funciona para espiguetas únicas nos ramos primários, e quando as espiguetas estão pareadas, ambos os gêneros possuem a mesma orientação, no caso, adaxial

(MORRONE; ZULOAGA, 1992, 1993; WEBSTER, 1987). Além disso, quando a espiguetta ocorre na forma pedicelada ou bisseriada, não é tão fácil reconhecer o real posicionamento taxonômico (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

Webster (1987) tentou encontrar outro critério que pudesse melhor caracterizar o grupo, como presença/ ausência de protuberância na espiguetta superior, o que resultou no remanejamento de algumas espécies de *Brachiaria* para *Urochloa*. Morrone e Zuloaga (1992) adotaram os mesmos critérios de Webster (1987) e passaram todas as espécies de *Brachiaria* sul-americanas para *Urochloa*. O reposicionamento taxonômico das espécies de ambos os gêneros deixou lacunas, uma vez que algumas espécies eram agrupadas mesmo sem apresentar as características utilizadas como critério taxonômico. Desta forma, as espécies de *Brachiaria* mais difundidas no Brasil são atualmente referidas como espécies pertencentes ao gênero *Urochloa*: *Urochloa brizantha* (Hochstetter, Richard, 1851) Webster, 1987, *Urochloa decumbens* (Stapf, 1919) Webster, 1987, *Urochloa dictyoneura* (Figari, De Notaris, 1854) Veldkamp, 1996, *Urochloa humidicola* (Rendle, 1899) Morrone & Zuloaga, 1992 e *Urochloa ruziziensis* (Germain, Evrard, 1953) Morrone & Zuloaga, 1992.

Segundo Veldkamp (1996) o gênero *Brachiaria* deveria ser completamente reduzido em *Urochloa*, pois estudos de filogenia em Paniceae mostram que esses gêneros estão incluídos em um grupo monofilético chamado “clado PCK” pelo fato de todos os táxons usarem a Fosfoenol Piruvato Carboxiquinase na via fotossintética C4. Os autores alegaram que apesar de um forte apoio para o monofiletismo, as relações entre essas taxa ainda precisam de maiores esclarecimentos.

O termo “braquiária” é muito difundido na comunidade envolvida com forrageiras e o reposicionamento taxonômico de espécies de maior importância econômica pode afetar a legislação de sementes. A falta de informações

taxonômicas conclusivas faz com que as espécies de *Brachiaria* sejam frequentemente referenciadas por *Urochloa* apenas como sinônimas até que informações mais relevantes consigam de fato separar os dois gêneros (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

2.2 Importância econômica e melhoramento genético de *Brachiaria* spp.

O Brasil é um dos maiores produtores de leite e de carne bovina a pasto no mundo com um rebanho de 176,6 milhões de cabeças (ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - ANUALPEC, 2010). A demanda por leite e carne vem crescendo anualmente e os produtores têm procurado por recursos que incrementem a produtividade tanto por animal quanto por área. Programas de melhoramento animal têm contribuído para o sucesso dos pecuaristas, contudo o aumento da produtividade requer investimento também na alimentação do gado (PEREIRA et al., 2003).

Há de se ressaltar a importância das forrageiras na criação de rebanhos. Grande parte da carne bovina produzida no país é proveniente de confinamento em pastagens (ARRUDA, 1997). Segundo Nussio (2000), a forragem colhida no campo pelo próprio animal é o sistema mais rentável para a engorda.

A crescente demanda por forrageiras tropicais também tem impulsionado o desenvolvimento da indústria sementeira no Brasil. Em pouco mais de trinta anos, o Brasil passou a ser considerado maior produtor de sementes de forrageiras do mundo revertendo a condição de importador para a de exportador (MARCHI et al., 2008). A área de pastagem no país abrange cerca de 170 milhões de hectares. Aproximadamente 100 milhões são cobertos por forrageiras cultivadas, dentre as quais, as de maior abrangência, são de espécies pertencentes ao gênero *Brachiaria*, com a estimativa de aproximadamente 85%,

e o restante por espécies do gênero *Panicum* (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006).

Das espécies de *Brachiaria* de maior importância econômica no país, *B. ruziziensis* não tolera solos alagadiços, preferindo terrenos bem drenados e com boa fertilidade assim como *B. decumbens* (SERRÃO; SIMÃO NETO, 1971). De acordo com Souza Sobrinho et al. (2005), dentre os cultivares de *B. ruziziensis*, o cv. Comum propicia boa digestibilidade considerando-se a planta como um todo, pois é constituída por menores quantidades de fibra.

B. decumbens se adapta facilmente a solos ácidos e é de fácil manejo. Entretanto, a característica de maior importância foi a produtividade de forragem de boa qualidade dando suporte à criação animal durante todo o ano (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). Essa espécie já foi uma das mais utilizadas nas pastagens pelos pecuaristas, contudo, o lançamento do cultivar Marandú (*B. brizantha*) pela Embrapa Gado de Corte e a Embrapa Cerrados, fez da espécie uma nova opção que se tornou a preferência entre os criadores de gado devido à sua principal característica de ser resistente à cigarrinha das pastagens. Além disso, esse cultivar se caracteriza pela elevada produção e qualidade de forragem, elevada resposta à adubação, boa produtividade de sementes e boa adaptação a solos de cerrado de média a alta fertilidade (ZIMMER et al., 1998). Atualmente, cerca de 50% das pastagens introduzidas nos Cerrados brasileiros é ocupada pelo cv. Marandú (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2012).

No Brasil, o melhoramento de *Brachiaria* spp. é conduzido por dois centros de pesquisa: a Embrapa Gado de Leite, que gerencia um programa de melhoramento de *B. ruziziensis*, com a realização de intercruzamentos objetivando a obtenção de cultivares com melhor tolerância a solos de baixa fertilidade e resistentes à cigarrinha (SOUZA SOBRINHO, 2005), e a Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande - MS, que domina o mercado de 90% das

sementes de pastagens e possui germoplasma com mais de 500 acessos coletados na África pelo CIAT, na Colômbia. Este centro também conduz um programa de melhoramento em *Brachiaria* spp. por meio da seleção recorrente, visando resistência às cigarrinhas típicas do país (MILES; CARDONA; SOTELO, 2006).

Avaliação e seleção de acessos promissores, explorando a variabilidade do germoplasma, introdução de materiais e cruzamentos intra e interespecíficos envolvendo *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* e posterior seleção recorrente fenotípica têm sido as estratégias de melhoramento adotadas (PEREIRA et al., 2001).

Cruzamentos interespecíficos que utilizam como parentais *B. decumbens* e *B. brizantha* tetraploides são mais complexos pelo fato dessas espécies serem apomíticas. Por esse motivo, os melhoristas têm envolvido *B. ruziziensis* nos cruzamentos, única espécie diploide que tem como forma principal de propagação a reprodução sexual. Para tornar esse cruzamento possível, foi necessário fazer a duplicação cromossômica desse material (ARGEL et al., 2005; TIMBÓ et al., 2014).

Esse procedimento foi fundamental para a obtenção da descendência de um cruzamento interespecífico, e assim, foi possível o lançamento do primeiro híbrido, o cultivar Mulato I, que reuniu características favoráveis de ambos parentais, *B. ruziziensis* e *B. brizantha* cv Marandú, além de conservar sua característica apomítica. Posteriormente, o CIAT lançou o cultivar Mulato II que conseguiu reunir características ainda superiores como: ampla adaptação edafoclimática; tolerância ao frio, geadas e queimadas; resistência à cigarrinha das pastagens e à maioria das espécies de lagartas e resistência a solos ácidos (ARGEL et al., 2007). Posteriormente Timbó et al. (2014) realizou a duplicação cromossômica de *B. ruziziensis* em genótipos pré selecionados de características favoráveis para forragem.

Para a condução de programas de melhoramento, conhecimentos básicos sobre a biologia da planta são necessários para a seleção de genitores e o sucesso nas hibridações (MILES et al., 2004; MILES; VALLE, 1996). É de grande importância para o melhorista a identificação correta das espécies durante a seleção de materiais base para o melhoramento, principalmente para o caso de *Brachiaria*, gênero que agrega espécies de intensa semelhança morfológica, o que pode causar equívocos na classificação taxonômica (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996; SHELTON, 2007).

O uso da biotecnologia no melhoramento de forrageiras é a perspectiva para o futuro próximo e pode trazer elevados ganhos em curto prazo (ARAÚJO; DEMINICIS; CAMPOS, 2008). Contudo, apesar da grande importância do uso das forrageiras, os programas de melhoramento ainda são recentes e são gerenciados por um pequeno número de especialistas (VALLE; JANK; RESENDE, 2009).

2.3 Aspectos cromossômicos em *Brachiaria* spp.

Estudos citogenéticos para espécies de *Brachiaria* tiveram início em 1931 por Avdulov, e até então, cerca de 60% das espécies de *Brachiaria* tiveram seus números cromossômicos descritos (AVDULOV, 1931; BERNINI; MARIN-MORALES, 2001). Em uma revisão realizada por Valle e Pagliarini (2009) foram relatadas espécies com $2n=14$ a $2n=90$ cromossomos e que a poliploidia é predominante no gênero. A tendência a tetraploidia foi confirmada por Penteadó et al. (2000), que em análises por meio da citometria de fluxo em mais de 400 acessos identificaram 58% de tetraploides. Segundo Valle e Savidan (1996), a poliploidia em *Brachiaria* spp. está relacionada com apomixia.

Darlington e Wylie (1955) determinaram que o número básico de cromossomos em *Brachiaria* spp. é $x = 7$ e $x = 9$. Christopher e Abrahan (1976)

reportaram $x = 5, 8, 10$ e 12 . Basappa, Muniyamma e Chinnappa (1987) avaliaram 260 populações de diferentes espécies e encontraram $x = 7, 8$ e 9 como número básico cromossômico e sugeriram a ocorrência de raças cromossômicas para várias espécies do gênero. Giussani et al. (2001), trabalhando com filogenia molecular de várias espécies de gramíneas, alegam que o número básico mais comum em *Urochloa* (sinonímia de *Brachiaria*) é de $x = 9$ e que a variação de número básico é evidência do processo ativo de evolução cromossômica dentro do gênero. Risso-Pascotto, Pagliarini e Valle (2006) encontraram um novo número básico de cromossomos para o gênero, $x = 6$, em *B. dictyoneura*, e que poderia ter surgido a partir de $x = 7$.

Dentre as espécies cultivadas de maior importância no mercado, *B. ruziziensis* tem se mostrado tipicamente diploide ($2n=2x=18$), contudo plantas tetraploidizadas artificialmente também já foram obtidas para que fosse possível sua introdução em cruzamentos nos programas de melhoramento de *Brachiaria* spp. (ARGEL et al., 2005; TIMBÓ et al., 2014).

Para *B. brizantha*, existem relatos de plantas com variados números cromossômicos como $2n = 18, 36, 45$ e 54 (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Risso-Pascotto et al. (2006) avaliaram o nível de ploidia em cerca de 200 acessos de *B. brizantha* por meio da citometria de fluxo e a maioria mostrou-se poliploide. De acordo com Basappa, Muniyamma e Chinnappa (1987), existem diferenças morfológicas notáveis entre *B. brizantha* com $2n = 36$ e $2n = 54$ cromossomos e que esses citotipos deveriam ser considerados entidades taxonômicas distintas: *B. brizantha* var. *brizantha* $2n = 54$ e *B. brizantha* var. *ciliata* $2n = 36$.

B. decumbens possui $2n = 4x = 36$ na maioria das análises, mas também existem relatos de indivíduos diploides com $2n=2x=18$ (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Estudos citogenéticos em *Brachiaria* spp. começaram a ser mais requisitados a partir de 1970, quando as primeiras tentativas de cruzamento entre *B. ruziziensis* e *B. decumbens* foram mal sucedidas. Apesar da semelhança morfológica entre essas espécies, o nível de ploidia mostrou ser a barreira que impediu a obtenção de híbridos interespecíficos (FERGUSON, 1974).

O primeiro detalhamento da morfologia cromossômica, por meio de citogenética convencional em espécies de *Brachiaria* foi realizado por Bernini e Marin-Morales (2001) em 12 acessos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *Brachiaria humidicola* (Rendle, 1853) Schweickerdt, 1936, *Brachiaria jubata* (Figaris, Notaris, 1854) Stapf, 1919 e *B. ruziziensis*. Os autores avaliaram diversos parâmetros cariomorfológicos como comprimento total do lote haploide, comprimento cromossômico, razão de braços, posição do satélite quando presente e índices de assimetria cromossômica. Os autores relataram a existência de variação intra e interespecífica em *Brachiaria* spp. Constataram ainda que o cariótipo dos acessos avaliados era simétrico, que a maioria dos cromossomos era de tamanho mediano, na maior parte das vezes, classificados como metacêntricos e apenas alguns submetacêntricos.

A respeito da posição do satélite, os relatos, por vezes, não eram coincidentes. Bernini e Marin-Morales (2001) decreveram que em *B. ruziziensis* o satélite se encontra na região terminal do par oito, entretanto Valle, Savidan e Jack (1987) por meio de análises em cromossomos paquitênicos, relataram que o satélite se encontra localizado no par sete. Em *B. brizantha* diploide, o locus de DNAr 45S foi detectado no par cromossômico oito, e em acessos tetraploides, o satélite foi detectado nos pares sete e 13 (NIELEN et al., 2010). Akiyama, Akiyama-Yamada e Ebina (2010), em diferentes acessos de *B. brizantha* (4x e 5x), encontraram diferentes números de sinais de DNAr 45S, contudo não localizaram o par portador do sítio. Para *B. decumbens*, Bernini e Marin-Morales

(2001) descreveram a localização dos satélites como sendo variável entre diferentes acessos.

Sítios de DNAr 5S em *Brachiaria* spp. foram estudados por Akiyama, Akiyama-Yamada e Ebina (2010) e Nielen et al. (2010) e os autores alegam que as diferenças no número de locus entre os indivíduos da mesma espécie são indicativas da ocorrência de aloploidia no gênero. A identificação dos pares portadores do sítio ainda não foi realizada em *Brachiaria* spp.

Risso-Pascotto et al. (2006) já haviam mencionado a ocorrência de aloploidia em *Brachiaria* spp. Os autores identificaram, dentre vários acessos de *B. brizantha*, um hexaploide ($2n=6x=54$) com um tipo de anormalidade meiótica nunca observada dentre as espécies já estudadas. Cerca de 40% dos meiócitos tiveram seus cromossomos arranjados em duas placas metafásicas na meiose I posicionadas nos polos junto à membrana plasmática. As placas não estavam posicionadas paralelamente, mas sim, formando um ângulo típico de fuso tripolar. As células apresentaram assincronia durante a segregação cromossômica na anáfase I e as contagens revelaram nove univalentes deslocados para um dos polos, enquanto os demais cromossomos ficaram mantidos na placa. O conjunto de cromossomos migrados para o polo oposto formava um núcleo de tamanho bastante reduzido comparado aos dois outros núcleos formados na telófase. Comportamento semelhante também já foi relatado para híbridos interespecíficos entre *B. ruziziensis* e *B. brizantha* (MENDES-BONATO et al., 2006).

Apesar das evidências da aloploidia por meio de análises meióticas em espécies do gênero, a origem dos genomas em *Brachiaria* spp. ainda era desconhecida, e por esse motivo, o genoma de *B. brizantha* foi referido por B e *B. ruziziensis* por R (MENDES-BONATO et al., 2006).

Paula (2015), trabalhando com espécies e híbridos interespecíficos do gênero *Brachiaria*, realizou análises da composição do genoma por meio da

técnica da GISH e foi possível identificar a ocorrência de rearranjos e diferenças da contribuição dos genomas genitores na constituição do híbrido. Uma nova proposta para a constituição genômica das espécies do gênero foi elaborada. Assim *B. brizantha* foi caracterizada por ter genoma BBB^1B^1 , *B. decumbens* $B^1B^1B^2B^2$ e *B. ruziziensis* B^2B^2 . Os genomas B e B^1 foram considerados homeólogos, assim como os genomas B^1 e B^2 .

Estudos citogenéticos mais aprofundados são necessários para a melhor compreensão da história evolutiva do gênero e podem auxiliar o direcionamento de programas de melhoramento com o entendimento das barreiras de ploidia e incompatibilidades entre espécies (BOLDRINI et al., 2011; FERGUSON, 1974; MENDES-BONATO, 2006).

2.4 Incentivo ao estudo dos genomas em *Brachiaria* spp.

A subfamília Panicoideae é formada por aproximadamente 3300 espécies forrageiras distribuídas em 206 gêneros (following the Grass Phylogeny Working Group, 2001). O grupo inclui as culturas de maior importância econômica do mundo como milho (*Zea mays* Linnaeus, 1753), sorgo (*Sorghum bicolor* (Linnaeus, 1771) Moench, 1794), cana de açúcar (*Saccharum officinarum* Linnaeus, 1753), miheto comum (*Panicum miliaceum* Linnaeus, 1753), miheto pérola (*Pennisetum glaucum* (Linnaeus, 1753) Brown, 1810), foxtail millet (*Setaria italica* (Linnaeus, 1753) Beauvois, 1812), e Shama millet (*Echinochloa colona* (Linnaeus, 1759) Link, 1833). *Brachiaria* é um dos gêneros que compõe a subfamília, abrange espécies forrageiras de importância econômica de ampla ocupação no território brasileiro (IBGE, 2006).

Estudos sobre a morfologia floral em espécies de Panicoideae (BROWN, 1810, 1814), apontam para o monofiletismo no grupo, teoria que tem sido suportada por análises de filogenia molecular com base em análises da

sequência de genes de DNA nuclear e de cloroplasto (KELLOGG, 1998; SORENG; DAVIS, 1998).

Bentham (1881) dividiu a subfamília em seis tribos, embora outras divisões tenham sido propostas durante o século 20 com base em caracteres anatômicos e citológicos (BUTZIN, 1970; HSU, 1965). Das sete tribos que são comumente reconhecidas, a tribo Paniceae agrega mais da metade dos gêneros e é a mais problemática taxonomicamente. Não há evidência de que a tribo seja monofilética, e por ser um grupo bastante diverso, ainda não foram encontrados caracteres morfológicos que esclareçam a taxonomia do grupo (GIUSSANI et al., 2001).

Giussani et al. (2001) usaram dados de sequenciamento do gene *ndhF* proveniente de várias espécies de diferentes gêneros pertencentes à Panicoideae com o objetivo de verificar a filogenia da subfamília e os resultados permitiram dividir o grupo em três grandes clados. Andropogoneae Dumortier, 1824 e Paniceae formam os dois maiores clados e são compostos por espécies que compartilham o número básico de cromossomos de $x = 10$. O terceiro clado corresponde as demais espécies de Paniceae avaliadas no trabalho que apresentam $x = 9$ como número básico cromossômico. Espécies do gênero *Urochloa* (sinonímia de *Brachiaria*) foram incluídas no clado Paniceae ($x = 9$) juntamente com as espécies de *Setaria* e grande parte das espécies de *Panicum* e *Pennisetum* Richard, 1805. Sorgo e milho foram incluídos no clado Andropogoneae ($x = 10$).

S. bicolor foi a primeira forrageira cujo genoma foi sequenciado. A escolha de utilizar sorgo como um modelo baseou-se no fato de ser uma espécie de genoma relativamente pequeno, o que representa aproximadamente um terço do tamanho do genoma do milho, ou um quarto do tamanho do genoma humano. Somando-se ao tamanho do genoma, a espécie apresenta baixo nível de duplicação de genes e elevado número de elementos repetitivos,

aproximadamente 60%. Além disso, trata-se de uma importante cultura agrícola nas regiões tropicais e subtropicais, onde é cultivada há mais de 3000 anos. A estratégia utilizada no sequenciamento do genoma do sorgo foi a WGS. O sequenciamento contribuiu para que quase 90% do genoma tivesse sua localização nos cromossomos. Além disso, comparações do seu genoma com outras espécies cultivadas mostraram que em sorgo 55% do genoma é composto de retrotransposons, valor intermediário entre o genoma do milho (79%) e do arroz (26%). O genoma do sorgo se assemelha mais ao do arroz quanto à alta proporção de elementos transponíveis do tipo Gypsy, contudo o tipo mais comum presente no sorgo é o CACTA. Cerca de 30.000 a 50.000 genes codificadores de proteína foram encontrados no genoma da espécie e foi constatada intensa sintenia entre o genoma de sorgo com o do arroz, como esperado tomando como base estudos anteriores com mapas moleculares (PATERSON et al., 2009).

S. italica e *Setaria viridis* (Linnaeus, 1753) Beauvois, 1812 tiveram o sequenciamento completo do genoma realizado por Bennetzen et al. (2012). Para o sequenciamento foi gerada uma biblioteca de BAC com 50.688 clones que foram utilizados no sequenciamento de Sanger e Plataforma 454. Desta forma, foi gerada uma sequência referência de alta qualidade para *S. italica* que cobre aproximadamente 80% do genoma e mais de 95% dos genes. Foram identificados cerca de 24.000 a 29.000 genes codificadores de proteínas e que os exons correspondem a 9% do genoma. Também constataram que 40% do genoma é composto por elementos transponíveis, sendo o Gypsy o tipo mais abundante. Com o sequenciamento de *S. viridis* foi possível identificar as regiões de polimorfismo de nucleotídeo único, a distribuição de elementos transponíveis e rearranjos cromossômicos. Neste trabalho os autores relatam que o sequenciamento do genoma diploide de *Setaria* pode auxiliar a montagem do genoma em curso de um poliploide relacionado, o *Panicum virgatum* Linnaeus,

1753 e que trabalhos mais detalhados podem ser realizados para que espécies de *Setaria* tenham seu desenvolvimento como planta modelo.

Apesar da importância e interesse agrônomo de espécie de *Brachiaria* o sequenciamento completo em espécies do gênero ainda não foi realizado. O estudo do genoma no grupo está restrito ao uso de técnicas de citogenética convencional e molecular, como já explanado anteriormente, e à construção de mapas moleculares.

As primeiras tentativas para a construção de um mapa molecular em *Brachiaria* spp. foram realizadas por Pessino et al. (1997, 1998), com o objetivo de localizar o gene ligado à apomixia em híbridos derivados do cruzamento entre *B. brizantha* apomítica e *B. ruziziensis* sexual. Com base na colinearidade entre os genomas de *Brachiaria* spp. e de milho foram identificados alguns marcadores RFLP e RAPD e os resultados apontam para um único locus que controla a apomixia.

Sabe-se que entre espécies taxonomicamente relacionadas como *Triticum aestivum* Linnaeus, 1753, *Z. mays*, *Oryza sativa* Linnaeus, 1953 e algumas outras espécies de gramíneas, existe conservação no conteúdo genético e até mesmo na ordem de genes (GALE; DEVOS, 1998).

Arruda et al. (2007) trabalharam com primers a priori desenvolvidos para milho, arroz e trigo, os quais foram testados em acessos de *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. ruziziensis* e *Panicum maximum* Jacquin, 1781. Os resultados indicaram a possibilidade de transferência de marcadores microssatélites entre espécies relacionadas. Silva et al. (2013) desenvolveram o primeiro conjunto validado de marcadores microssatélites para *B. ruziziensis* por meio de dados de sequenciamento de nova geração (Illumina). A seleção de marcadores microssatélites foi possível após o sequenciamento parcial *de novo* do genoma de *B. ruziziensis* realizado por Martins (2013). Milhões de sequências de DNA puderam ser obtidas em uma única análise de

sequenciamento feita por meio da plataforma Illumina, fornecendo dados que cobriram aproximadamente 35% do genoma estimado de *B. ruziziensis*, o que é suficiente para iniciar a análise genômica na espécie. Aparentemente existe uma grande semelhança entre os genes de DNA genômico de *Brachiaria* spp. com sorgo, milho e *P. virgatum*, com cerca de 17 mil genes ortólogos. Em análises do DNA do cloroplasto, Martins (2013) ainda verificou que *B. decumbens* e *B. brizantha* podem ser espécies derivadas de um ancestral comum com *B. ruziziensis* e que se separaram há 14 milhões de anos como consequência de evento(s) de poliploidização, que por sua vez isolou reprodutivamente estas espécies.

Fica evidente que o estudo detalhado dos genomas presentes na história evolutiva de espécies de *Brachiaria* pode trazer informações relevantes para que as especulações sobre o gênero saiam do campo das hipóteses. Informações a respeito dos genomas em *Brachiaria* spp. ainda estão longe de serem satisfatórias. Segundo Martins (2013), pouco se sabe quanto à composição e distribuição dos genes, abundância e diversidade de elementos transponíveis, similaridade entre genomas das várias espécies de *Brachiaria*, ortologia com espécies modelo e abundância de sequências repetitivas. O genoma de *B. ruziziensis* é relativamente pequeno (~ 600 Mpb), semelhante em tamanho a outros modelos de espécies de cereais (ISHIGAKI et al., 2010), o que faz da espécie uma boa candidata às análises genômicas de sequenciamento. O desenvolvimento dinâmico de novos cultivares de *Brachiaria* spp. pode ser reforçado com o emprego de ferramentas genômicas na seleção de genótipos superiores.

Contudo, enquanto o sequenciamento genômico de *Brachiaria* spp. não é executado, considerações sobre o genoma das espécies do gênero podem ser realizadas tomando-se como base os genomas já sequenciados de espécies afins. Dentro do grupo, como abordado anteriormente, o sequenciamento do genoma

de *S. italica* e *S. bicolor* já foram concluídos e podem trazer subsídios para que comparações entre os gêneros com *Brachiaria* spp. sejam realizadas.

REFERÊNCIAS

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.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. São Paulo: Instituto FNP, 2010. 360 p.

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B.; CAMPOS, P. R. S. S. Melhoramento genético de plantas forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, p. 61-76, 2008.

ARGEL, P. J. et al. **Cultivar mulato (Brachiaria híbrido CIAT 36061)**: Gramínea de alta producción y calidad forrageira para los trópicos. Cali: CIAT, 2005. 28 p. (Boletín).

ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato II (Brachiaria híbrido CIAT 36087)**: gramínea de alta calidad y producción forrajera, resistente al salivazo y adaptada a suelos tropicales ácidos bien drenados. Cali: CIAT, 2007. 22 p.

ARRUDA, A. et al. 2007. **Avaliação da transferência de microssatélites de milho, trigo e arroz para quatro espécies de *Brachiaria* e para *Panicum maximum***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2007. 20 p. (Boletim de Pesquisa, 21).

ARRUDA, Z. J. A pecuária bovina de corte no Brasil e resultados econômicos de sistemas alternativos de produção. In: SIMPÓSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., 1997, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 259-273.

AVDULOV, P. Karyo-systematische Untersuchungen der Familie Gramineen. **Bulletin of Applied Botany, of Genetics and Plant-Breeding** Leningrad, v. 43, p. 1-438, 1931.

BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2297-2309, 1987.

BENNETZEN, J. L. et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 555–561, 2012.

BENTHAM, G. Notes on Gramineae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 19, p. 14–134, 1881.

BERNINI, C.; MARIN- MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios Journal**, Cambridge, v. 104, p. 157-171, 2001.

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. London: Longman, 1977.

BOLDRINI, K. R. et al. Meiotic behavior in nonaploid accessions of *Brachiaria humidicola* (Poaceae) and implications for breeding. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 1, p. 169-76, 2011.

BROWN, R. Genera remarks, geographical and systematical, on the botany of Terra Australis. In: FLINDERS, M. (Ed.). **A voyage to Terra Australis, undertaken for the purpose of completing the discovery of that vast country, and prosecuted in the years 1801, 1802, and 1803**. London: W. Bulmer, 1814. v. 2, p. 533–613.

BROWN, R. **Prodromus florae novae hollandiae et insulae Van-Diemen**. London: J. Johnson, 1810. v. 1, 468 p.

BUTZIN, F. Die systematische gliederung der Paniceae. **Willdenowia**, Berlin, v. 6, p. 179–192, 1970.

CHRISTOPHER, J.; ABRAHAM, A. Studies on the cytology and phylogeny of south Indian grasses III. Subfamily VI: Panicoideae, tribe (i) the Paniceae. **Cytologia**, Tokyo, v. 41, p. 621–637, 1976.

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

DA SILVA, S. C.; NASCIMENTO JUNIOR, D. Sistema intensivo de produção de pastagens. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: CBNA, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Pastagens**. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/index.php?pagina=pastagem.htm>>. Acesso em: 2 jun. 2012.

FERGUSON, J. E.; CROWDER, L. V. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 893-895, 1974.

FILGUEIRAS, T. S. et al. **Poaceae in lista de espécies da flora do Brasil**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB086785>>. Acesso em: 2 jun. 2015.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 1971–1974, 1998.

GIUSSANI, L. M. et al. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C₄ photosynthesis. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 88, p. 1993-2012, 2001.

GRISEBACH, A. *Brachiaria*. In: LEDEBOUR, C. F. (Ed.). **Flora rossica**. Stuttgart: Sumtibus Librariae E. Schweizerbart, 1853. v. 4, p. 469.

HSU, C. C. The classification of *Panicum* (Gramineae) and its allies, with special reference to the characters of lodicule, style-base and lemma. **Journal of the Faculty of Science**, Tokyo, v. 9, p. 43–150, 1965.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

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

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasma collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/Embrapa, 1996. p. 17–42.

KELLOGG, E. A. Who's related to whom? Recent results from molecular systematic studies. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 149–158, 1988.

MACKAY, J. H. E. **Register os Autralian herbage plant cultivar**. Camberra: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), 1982. 122 p.

MARCHI, C. E. et al. Químico e termoterapia em sementes e aplicação de fungicidas em *Brachiaria brizantha* como estratégias no manejo do carvão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 321-325, 2008.

MARTINS, A. M. **Sequenciamento de DNA, montagem de novo do genoma e desenvolvimento de marcadores microsatélites, indels e SNPs para uso em**

análise genética de *Brachiaria ruziziensis*. 2013. 183 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

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

MILES, J. W.; CARDONA, C.; SOTELO, G. Recurrent selection in a synthetic *Brachiaria* grass population improves resistance to three spittlebug species. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 1088-1093, 2006.

MILES, J. W. et al. *Brachiaria* grasses. In: SOLLENBERGER, L. E.; MOSER, L.; BURSON, B. (Ed.). **Warnseason (C4)grasses**. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 2004. p. 745-783.

MILES, J. W.; VALLE, C. B. Manipulation of apomixis in *Brachiaria* breeding. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.) **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Cali: CIAT; Brasília: EMBRAPA-CNPGC, 1996. p. 164-177.

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

MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Sinopsis del género *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) para México y América Central. **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 32, p. 59-75, 1993.

NATH, J.; SWAMINATHAN, M. S. Chromosome numbers of some grasses. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 17, p. 102, 1957.

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.

NUNES, S. G. et al. *Brachiaria brizantha* cv **Marandu**. Campo Grande: Embrapa/CNPQC, 1984. (Documentos Embrapa, 21).

NUSSIO, L. G. Volumosos para bovinos de corte em confinamento. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; ARIA, V. P. **Confinamento de bovinos de corte**. Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 85-112.

PATERSON, A. H. et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, n. 29, p. 551-556, 2009.

PAULA, C. M. P. **Citogenômica comparativa e aspectos epigenéticos em espécies de *Brachiaria* e híbridos interespecíficos**. 2015. 113 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

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. (Boletim de Pesquisa, 11).

PEREIRA, A. V. et al. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARESINGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

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

PEREIRA, J. M.; REZENDE, C. P.; RUIZ, M. A. M. Pastagem no ecossistema mata atlântica: atualidades e perspectivas. In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., Recife. **Anais...** Recife: SBZ, 2005. p. 36-51.

PESSINO, S. C. et al. A genetic map of the apospory region in *Brachiaria* hybrids: Identification of two markers closely associated with the trait. **Hereditas**, Landskrona, v. 128, p. 153–158, 1998.

PESSINO, S. C. et al. Identification of maize linkage group related to apomixis in *Brachiaria*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 439–444, 1997.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trinius) Griseberg. In: MILES, J. W. et al. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT, 1996. p. 1-17.

RISSO-PASCOTTO, C. et al. Evidence of allopolyploidy in *Brachiaria brizantha* (Poaceae: Paniceae) through chromosome arrangement at metaphase plate during microsporogenesis. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 4, p. 797-803, 2006.

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

SERRÃO, E. A.; SIMÃO NETO, M. Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *Brachiaria decumbens*. Stapf e *Brachiara ruziziensis* Germain e Everaed. **Boletim do Instituto de Pesquisa Experimental Agropecuária do Norte**, Belém, v. 1, n. 1, p. 1-31, 1971.

SHELTON, M. *Brachiaria decumbens*. 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/Pf00_0188.HTM>. Acesso em: 23 jan. 2015.

SILVA, P. I. et al. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 17, 2013.

SORENG, R. J.; DAVIS, J. I. Phylogenetics and character evolution in the grass family (Poaceae): simultaneous analysis of morphological and chloroplast DNA restriction site character sets. **Botanical Review**, Bronx, v. 64, p. 1–84, 1998.

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 5., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 1 CD ROM.

SPIES, J. J.; DU PLESSIS, H. Chromosome studies on African Plants. **Bothalia**, Pretoria, v. 17, n. 3, p. 131-135, 1987.

STAPF, O. Gramineae (Maydeae-Paniceae). In: PRAIN, D. (Ed.). **Flora of tropical Africa**. Ashford: Reeve e Co, 1920. p. 422–606.

TIMBÓ, A. L. O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.

TRINIUS, C. B. *Panicearum* genera. **Mémoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg**, St. Pétersbourg, v. 6, n. 3, p. 194, 1834.

VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **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 Series**. Boca Raton: CRC, 2009. p. 103-151.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H. Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). ***Brachiaria*: biology, agronomy, and improvement**. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali: CIAT, 1996. p. 147-163.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H.; JANK, L. Pachytene chromosome of *Brachiaria ruziziensis*. Ger. Et Evrard. **Plant Breeding**, Berlin, v. 78, p. 75-78, 1987.

VELDKAMP, J. F. *Brachiaria, Urochloa* (Gramineae-Paniceae) in Malaysia. **Blumea - Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography**, Berlin, v. 41, p. 413-437, 1996.

WEBSTER, R. D. **The Australian Paniceae (Poaceae)**. Stuttgart: J. Cramer, 1987. 322 p.

ZIMMER, A. H. et al. **Considerações sobre índices de produtividade da pecuária de corte em Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 53 p. (Documentos, 70).

**SEGUNDA PARTE
ARTIGOS**

Artigo 1

Mapa físico de sítios de DNA repetitivo em *Brachiaria* spp.: polimorfismos intra e interespecíficos

RESUMO

Brachiaria é um gênero pertencente à família Poaceae que agrega espécies de interesse forrageiro. Estudos citogenéticos no gênero apresentam espécies com diferentes níveis de ploidia e demonstram a existência de variabilidade intraespecífica para a morfologia cromossômica e número de sítios de DNAr. Não existe um consenso sobre a localização exata no cariótipo dos pares cromossômicos portadores de DNAr. Estudos a respeito da região centromérica de espécies de *Brachiaria*, assim como detalhamento do cariótipo com localização de sequências específicas em *Brachiaria decumbens* são inexistentes. Este trabalho objetivou caracterizar o cariótipo de *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* e *Brachiaria ruziziensis* com a localização de sequências repetitivas (DNAr 5S, DNAr 45S, Retrotransposon Centromérico – CR), bandas CMA/DAPI nos pares cromossômicos, bem como avaliar a atividade transcricional das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs) em espécies de *Brachiaria*. *B. ruziziensis* é uma espécie diploide com $2n=2x=18$ cromossomos, fórmula cariotípica 9M, um par cromossômico com sítio de DNAr 45s e dois com DNAr 5S. *B. brizantha* possui $2n=4x=36$ cromossomos, fórmula cariotípica 18M, possui quatro, cinco ou seis sinais de DNAr 5S e dois, três ou quatro sítios de DNAr 45S. Um dos cromossomos portadores de sítio de DNAr 45S é heteromórfico. *B. decumbens* apresenta $2n=4x=36$ cromossomos, fórmula cariotípica 17M+1M/SM, possui sete sinais de DNAr 5S, sendo um dos pares em estado de hemizigose. Nessa espécie, foram identificados dois pares portadores de sinal de DNAr 45S, um deles também heteromórfico, nesse par um dos cromossomo homólogos apresenta constrição terciária. CRM1 gerou sinais na região centromérica dos cromossomos de *B. decumbens*, porém não concentrados em clusters. Em *B. brizantha*, os sinais são raros e em *B. ruziziensis* a sonda marcou intensamente todos os cromossomos na região centromérica. Os sinais de CMA colocalizam-se com os de DNAr 45S em *B. decumbens* e *B. ruziziensis* e em *B. brizantha* apenas dois dos quatro sinais são coincidentes. O cariótipo das espécies de *Brachiaria* estudadas foi considerado simétrico. A atividade transcricional das RONs é variável e foram detectados um ou dois nucléolos heteromórficos.

Palavras-chave: Forrageira. Variação intraespecífica. Rearranjo cromossômico. DNA repetitivo. Constrição terciária.

ABSTRACT

The *Brachiaria* genus belongs to the Poaceae family that comprises species of forage interest. Cytogenetic studies on this genus exhibit species with different ploidy levels and demonstrate the existence of intraspecific variability in chromosome morphology and the number of rDNA sites. There is no consensus on the exact position within the karyotype of the chromosomal pairs that have rDNA loci. Studies on the centromeric regions of *Brachiaria* species, as well as details regarding the karyotype with the location of specific sequences in *Brachiaria decumbens* chromosomes are nonexistent. This study aimed to characterize the karyotype of *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria ruziziensis* using the location of repetitive sequences (5S rDNA, 45S rDNA, Centromeric Retrotransposons (CR)) and CMA/DAPI bands in the chromosome pairs, and evaluate the transcriptional activity of the nucleolar organizing regions (NORs) in *Brachiaria* species. *B. ruziziensis* is a diploid species with $2n = 2x = 18$ chromosomes; the karyotype formula is 9M. It has one chromosome pair containing a 45S rDNA locus and two pairs with 5S rDNA loci. *B. brizantha* has $2n = 4x = 36$ chromosomes; the karyotype formula is 18M. It has four, five, or six 5S rDNA loci; and two, three, or four 45S rDNA loci. One of the chromosomes which bears 45S rDNA locus is heteromorphic. *B. decumbens* presented $2n = 4x = 36$ chromosomes; the karyotype formula is 17M+1M/SM. It has seven 5S rDNA loci, and one chromosome pair is hemizygous. This species also has two chromosome pairs, which have a 45S rDNA locus. One of the pairs is heteromorphic as well, and one chromosome of this pair presents a tertiary constriction. CRM1 signals are observed in and around the centromeric region of the *B. decumbens* chromosomes. In *B. brizantha* chromosomes, the CRM1 signals are rare, and in *B. ruziziensis* CRM1 probe intensely hybridized the centromeric regions of all chromosomes. CMA signals were observed to co-localize at the 45S rDNA position in *B. decumbens* and *B. ruziziensis* chromosomes. In *B. brizantha* the CMA signals only co-localized with two of the four 45S rDNA signals. The karyograms of the three analysed species are considered symmetric. The transcriptional activity of the NORs varies, and one or two heteromorphic nucleoli were detected.

Keywords: Forage. Intraspecific variation. Chromosomal rearrangement. Repetitive DNA. Tertiary constriction.

1 INTRODUÇÃO

Brachiaria (Trinius, 1826) Grisebach, 1853 é um gênero pertencente à família Poaceae Barnhart, 1895, tribo Paniceae Reichenbach, 1828, que agrega aproximadamente 100 espécies de interesse forrageiro, de origem principalmente tropical e subtropical africana (KELLER-GREIN; MAASS; HANSON, 1996). No Brasil, a introdução de espécies do gênero se iniciou com *Brachiaria decumbens* Stapf, 1919 na ocasião da vinda dos escravos, e devido às condições de adaptação similares entre algumas regiões do Brasil e da África, sua disseminação foi favorecida em várias localidades do país. As demais espécies foram introduzidas posteriormente, entre a 1960 e meados de 1970, e nos anos subseqüentes tiveram uma ampla expansão nos cerrados brasileiros (MITIDIÉRI, 1988).

Estima-se que no Brasil existam mais de 170 milhões de hectares de pastagens sendo 100 milhões de pastagens cultivadas e 70 milhões de pastagens naturais, 85% da área total de pastagens é ocupada por *Brachiaria* spp. (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006). As espécies de maior importância econômica no país estão divididas em dois grupos por compartilharem características morfológicas. O primeiro grupo é constituído por *B. decumbens*, *Brachiaria brizantha* (Hochstetter, Richard, 1851) Stapf, 1919 e *Brachiaria ruziziensis* Germain, Evrard, 1953, e o outro por *Brachiaria humidicola* (Rendle, 1853) Schweickerdt, 1936, *Brachiaria dictyoneura* (Figaris, Notaris, 1854) Stapf, 1919 e *Brachiaria jubata* (Figaris, Notaris, 1854) Stapf, 1919 (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

A taxonomia do gênero é até hoje complexa devido à contínua variação de caracteres utilizados para delimitar espécies do gênero e até mesmo entre gêneros afins como *Urochloa* Beauvois, 1812, *Eriochloa* Kunth, 1815 e *Panicum*

Linnaeus, 1929. O gênero *Brachiaria* foi descrito pela primeira vez por Trinius (1834) como uma subdivisão de *Panicum*, depois foi elevado à categoria de gênero por Grisebach (1853). Os caracteres utilizados na separação dessas taxa são sutis e o fato de haver variação intraespecífica dificulta o reconhecimento do posicionamento taxonômico (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996).

Pouco se conhece a respeito da caracterização cromossômica de espécies de *Brachiaria*. O número básico de cromossomos foi estabelecido por Darlington e Wylie (1955) como $x = 7$ ou $x = 9$. Descrições posteriores propuseram um novo número básico de cromossomos, $x = 6$, que foi encontrado em alguns acessos de *B. humidicola* e de *B. dictyoneura* (BOLDRINI; PAGLIARINI; VALLE, 2009; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006). Para espécies poliploides como *B. brizantha* e *B. decumbens* já foram relatadas plantas com diferentes números cromossômicos (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPA, 1987; BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; DE WET, 1960; LOVE, 1981; MENDES-BONATO et al., 2006). Para *B. ruziziensis*, as descrições citogenéticas mostram $2n = 2x = 18$ cromossomos (BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPA, 1987; BERNINI; MARIN-MORALES, 2001) e em plantas tetraploidizadas artificialmente, $2n = 36$ cromossomos (TIMBÓ et al., 2014). O detalhamento da morfologia cromossômica em *Brachiaria* spp. foi realizado pela primeira vez por Bernini e Marin-Morales (2001). Os autores identificaram diferenças entre os acessos de *B. brizantha* e os de *B. decumbens* quanto ao comprimento relativo dos cromossomos e posição do satélite. Para *B. ruziziensis* não foi relatada diferença entre acessos, no entanto a posição do satélite difere da encontrada por Valle, Savidan e Jank (1987).

O estudo do DNAr em espécies de *Brachiaria* por meio da técnica de FISH foi realizado por Akiyama, Akiyama-Yamada e Ebina (2010) em diferentes acessos de *B. brizantha* (4x e 5x), *B. ruziziensis* (2x), *B. humidicola*

(6x) e de *Brachiaria híbrida* Basappa, Muniyamma, 1983 cv. Mulato (4x) (proveniente do cruzamento entre *B. decumbens* e *B. ruziziensis*). Os autores relataram diferenças no número e na morfologia dos sítios de DNAr nos acessos analisados, no entanto não foram identificados os pares cromossômicos portadores de sinais de DNAr. Nielen et al. (2010) avaliando acessos de *B. brizantha* (2x e 4x) identificaram a posição do sítio de DNAr 5S no par cromossômico 4 e o de DNAr 45S no par 8, e nos acessos tetraploides, nos pares 7 e 13. Além disso, encontraram um par adicional de sítios de DNAr 5S nos acessos tetraploides, para os quais não foram identificadas suas respectivas localizações cromossômicas. As diferenças encontradas nos acessos em ambos os trabalhos foram relacionadas com eventos de alopoliploidia.

Sequências, além das de DNAr, ainda não foram localizadas nos cromossomos de espécies de *Brachiaria*. A definição de sequências associadas ao centrômero, bem como suas funções, são de grande importância para a compreensão da morfologia cromossômica e evolução do centrômero. DNA satélite e retrotransposons são os tipos mais comuns de sequências encontradas nos centrômeros de plantas e são altamente variáveis (JIANG et al., 2003). Dentre os retroelementos conhecidos em centrômeros de plantas, a família de retrotransposons centroméricos (CRs) em gramíneas é a que mais desperta interesse. CRs foram isolados primeiramente em *Brachypodium sylvaticum* (Hudson, 1762) Palisot, 1812 (ARAGON-ALCAIDE et al., 1996) e *Sorghum bicolor* (Linnaeus, 1771) Moench 1794 (JIANG et al., 1996) e identificados posteriormente como derivados de Ty3/gypsy (MILLER et al., 1998). Ao contrário de outras famílias de retrotransposons que divergem rapidamente durante a evolução, a família CR foi encontrada nos centrômeros de todas as espécies de gramíneas já estudadas (MILLER et al., 1998).

Informações a respeito da definição do número de sítios de DNAr, a identificação dos pares de cromossomos homólogos/homeólogos, bem como a

caracterização cromossômica/genômica são inexistentes ou contraditórias em *Brachiaria* spp. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo caracterizar o cariótipo de *B. brizantha*, *B. decumbens* e *B. ruziziensis* com a localização de sequências repetitivas (DNAr 5S, DNAr 45S, CR), bandas CMA/DAPI, bem como avaliar a atividade transcricional das Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs).

2 MATERIAL E MÉTODOS

A análise citogenética foi realizada em cultivares comerciais como *B. ruziziensis* cv. Kennedy, *B. brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk, cedidos pela EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoléina 3 mM por 5 horas a 0-4° C, fixadas em Carnoy por 20 min e armazenadas em álcool 70% a -20° C. A região meristemática foi digerida em solução contendo celulase Onozuka R10 0,7%, celulase Sigma 0,7%, pectoliase Sigma 1%, citohelicase Sigma 1% por 1 h e 20 min, a 37° C. As lâminas foram confeccionadas pela técnica de secagem à chama (DONG et al., 2000).

Para a localização dos sítios de DNAr e de CRM1 (subfamília de CR-Centromeric Retrotransposons of Maize) o DNA plasmidial com o inserto das referidas sequências foi extraído por meio do kit QIAprep® Spin miniprep (Qiagen) e posteriormente foi marcado com biotina-16-UTP ou digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostic, Indianapolis) por meio de reação “nicktranslation” padrão. A reação foi feita em 50 µL de mix contendo tampão de reação 1x; 1 µg do produto de PCR; nucleotídeos dATP, dCTP e dGTP 0,5 mM; dTTP 0,33 mM; dUTP marcado com biotina ou digoxigenina 0,17 mM; 4 x 10⁻¹ U de

DNase I e 0,25 U de DNA Polimerase I, a 15° C por 1,5 h. O tamanho dos fragmentos, que deve estar entre 100 e 500 bases, foi confirmado em eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a aplicação da técnica de FISH, os cromossomos mitóticos foram desnaturados com formamida 70% em SSC 2x, por 1min. e 45s. a 85° C e posteriormente desidratados em série alcóolica (70%, 90% e 100%) a -20°C por 5 min. cada. A mistura de hibridização (formamida 50%, SSC 2x, sulfato de dextran 10%, 50-100 ng de sonda marcada) juntamente com as sondas de DNAr 5S e 45S (pTa71) provenientes do genoma de *Triticum aestivum* Linnaeus, 1753 e CRM1 proveniente do genoma do milho desenvolvida de acordo com Kato, Lamb e Birchler (2004) foram desnaturadas por 8 min. a 95° C. O tempo de hibridização se deu por no mínimo 16 horas.

O nível de estringência foi determinado com tampão SSC 2x a 42° C por 10 min. e as lavagens subsequentes foram feitas com TNT e PBS. As sondas foram detectadas com o uso dos anticorpos streptavidina conjugada com alexafluor 488 e antidigoxigenina conjugada com rodamina (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os cromossomos foram contrastados com DAPI em meio de montagem “antifade” VectaShield® (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As imagens foram capturadas pelo uso da câmera QImaging RetigaEXi CCD acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60. O contraste final foi feito com auxílio das ferramentas do software Photoshop CS6.

Os dados da morfometria cromossômica para cada cultivar foram obtidos a partir de 10 metáfases que continham o maior número de sinais de DNAr. As medições foram feitas por meio do software Micro Measure (Colorado State University). Os parâmetros utilizados para os estudos cariotípicos foram: CT (comprimento total cromossômico - μm); BL (comprimento do braço longo- μm); BC (comprimento do braço curto- μm); CR (comprimento relativo - %); RB (relação de braço) e CTLH (comprimento total

do lote haploide - μm). A nomenclatura utilizada para a descrição da morfologia cromossômica e posição dos sítios de DNAr foram as propostas, respectivamente, por Levan, Fredga e Souberg (1964) e Roa e Guerra (2012). A classificação do cariótipo foi baseada nas categorias estabelecidas por Stebbins (1958). Os índices de assimetria foram calculados segundo a metodologia desenvolvida por Peruzzi e Eroğlu (2013) e Sokal e Rohlf (1981).

A marcação das Regiões Organizadoras do Nucléolo (RONs) ativas, bem como a caracterização de nucléolos, foram realizadas por meio da técnica de bandamento Ag-NOR como proposto por Guerra e Souza (2002) e Huang et al. (2012), com adaptações. Sobre a preparação cromossômica fresca, uma gota de solução de nitrato de prata 50% juntamente com duas gotas de solução coloidal (gelatina incolor 2%, ácido fórmico 2%), foram gotejadas através de uma tela de Nylon (20 μm). As lâminas foram encubadas em câmara úmida sob a temperatura de 65 a 70° C por 5 min., posteriormente lavadas com água destilada e desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%), por 5 min. cada. As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Zeiss) modelo Axio e as melhores imagens foram capturadas com câmera AxioCam ICc. Os nucléolos foram avaliados em pelo menos 150 células interfásicas e as RONs, nas melhores metáfases de cada espécie.

As análises de bandamento CMA/DAPI foram realizadas segundo Guerra e Souza (2002), com adaptações. Lâminas envelhecidas por 3 dias foram lavadas em tampão McIlvaine (pH 7,0) por 20 min., secas e expostas à solução de cromomicina (CMA) 0,5 mg/mL por 3 h, lavadas em tampão McIlvaine e as lâminas foram montadas em Vectashield® antifade com DAPI. O mínimo de 10 imagens foram capturadas por meio da câmera QImaging RetigaEXi CCD acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60. O contraste final foi feito com as ferramentas do software Photoshop CS6.

A técnica de FISH com sonda de DNAr 45S foi aplicada sobre as mesmas metáfases selecionadas nas técnicas de bandamentos. Após o bandamento Ag-NOR, as lâminas foram lavadas em SSC 2x, série alcoólica (70%, 90% e 100%) e Carnoy (3:1) por 5 min. cada (HUANG et al., 2012). As lâminas submetidas ao bandamento CMA/DAPI foram lavadas em Carnoy (3:1) por 30 min. e álcool 100% por 2 h (GUERRA; SOUZA, 2002). Após os pré-tratamentos descritos prosseguiu-se com a FISH, como previamente descrito.

3 RESULTADOS

Para *B. ruziziensis* foi confirmado $2n=18$ cromossomos (Figura 1A), com fórmula cariotípica 9M. Os comprimentos do maior e menor pares cromossômicos correspondem respectivamente a 12% e 8,51% do comprimento total do lote haploide (Tabela 1). Sinais intersticiais-proximais de DNAr 5S foram localizados nos pares cromossômicos 2 (braço curto) e 6 (braço longo) com respectivos tamanhos médios de 0,26 e 0,22 μm e distanciados do centrômero, em média, à 0,19 e 0,23 μm , respectivamente. Sítios de DNAr 45S foram identificados no braço curto do par cromossômico 8 (Figura 1B e C), com tamanho médio de 0,74 μm e distância média de 0,42 μm do centrômero. O tamanho dos sítios de DNAr 45S variou de 0,39 a 1 μm , devido ao fato de essa região cromossômica frequentemente apresentar a fibra da cromatina estendida, o que contribuiu para superestimar o comprimento total do referido par cromossômico. Os sinais de DNAr 45S se colocaram com as bandas CMA (regiões ricas em CG). Não foram identificadas bandas DAPI (regiões ricas em AT) (Figura 2 A-C). A região centromérica foi nitidamente marcada com sonda CRM1 em todos os cromossomos (Figura 1A, B e C).

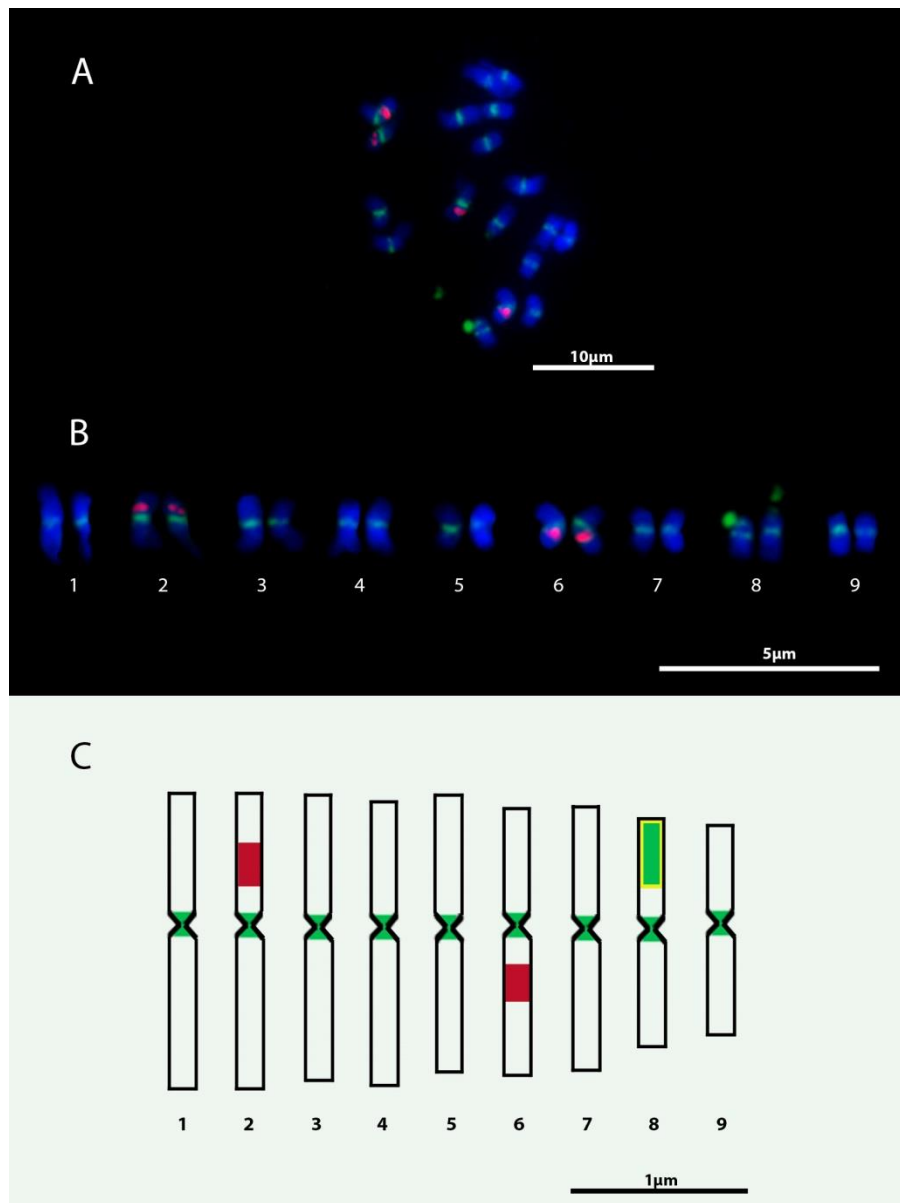


Figura 1 Cromossomos de *Brachiaria ruziziensis*. A) Metáfase com $2n=18$ cromossomos. B) Cariograma. C) Idiograma. Em verde, sinais de DNAr 45S e CRM1; em vermelho, sinais de DNAr 5S e em amarelo, sinal da banda CMA⁺

Tabela 1 Morfometria média dos cromossomos de *Brachiaria ruziziensis*: BL (comprimento do braço longo - μm); BC (comprimento do braço curto - μm); CT (comprimento total cromossômico - μm); CR (comprimento relativo - %); RB (relação de braço) e CTLH (comprimento total do lote haploide - μm). Cromossomos classificados em metacêntrico (m), de acordo com Levan, Fredga e Souberg (1964)

PAR	BL	BC	CT	CR	RB	MORFOLOGIA
1	0,95	0,77	1,72	12,00	1,23	m
2	0,93	0,76	1,69	11,79	1,22	m
3	0,9	0,76	1,66	11,58	1,18	m
4	0,93	0,72	1,65	11,51	1,29	m
5	0,87	0,68	1,55	10,82	1,28	m
6	0,84	0,69	1,53	10,68	1,22	m
7	0,7	0,62	1,32	9,21	1,13	m
8*	1,16	0,83	1,99	13,89	1,40	m
9	0,64	0,58	1,22	8,51	1,10	m
CTLH			14,33			

*Par cromossômico com DNAr 45S apresentando fibra de cromatina estendida

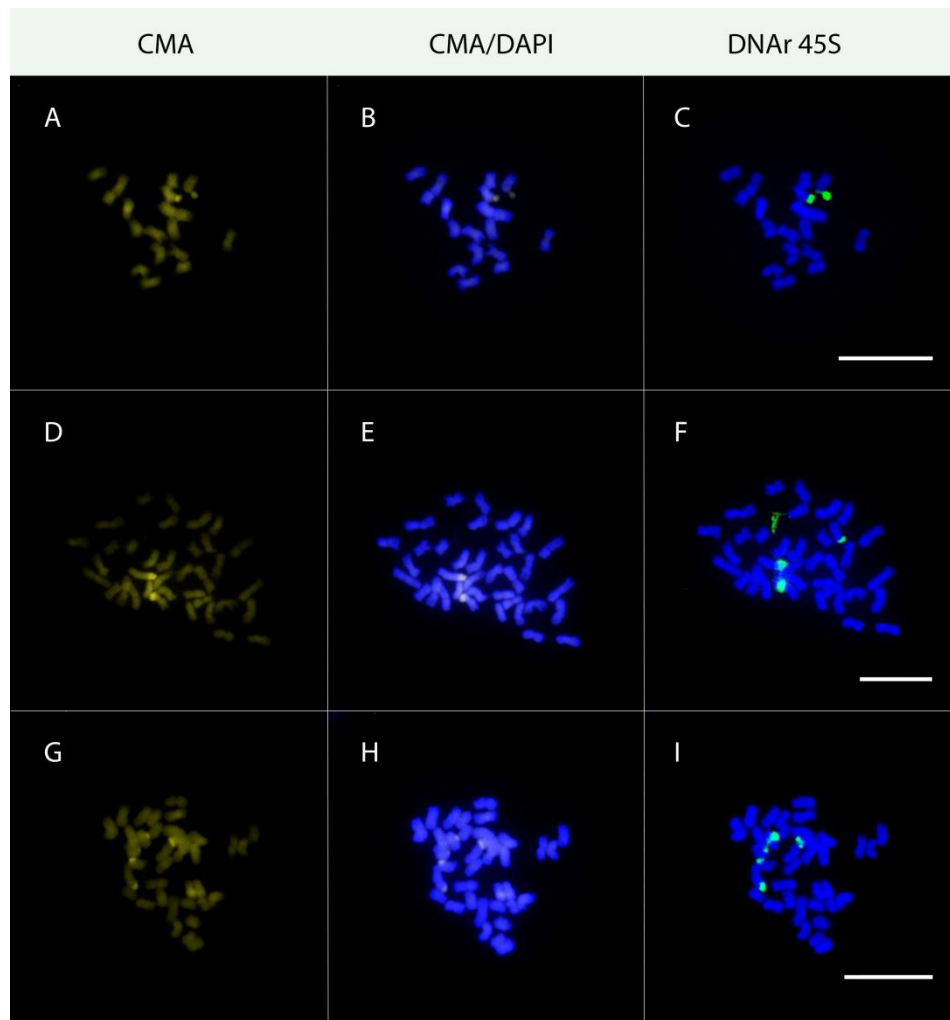


Figura 2 Bandamento CMA/DAPI e sítios de DNAr 45S em espécies de *Brachiaria*. A, B e C) Metáfase apresentando um par de cromossomos com sítios de DNAr 45S colocalizados com banda CMA em *Brachiaria ruziziensis*. D, E e F) Metáfase apresentando apenas um dos dois pares de cromossomos com sítios de DNAr 45S colocalizados com banda CMA em *Brachiaria brizantha*. G, H e I) Metáfase apresentando dois pares de cromossomos com sítios de DNAr 45S colocalizados com banda CMA em *Brachiaria decumbens*. Barra=10 μ m

B. brizantha apresentou $2n=36$ cromossomos (Figura 3A-E), com fórmula cariotípica 18M. O maior par cromossômico apresentou comprimento relativo de 6,83% e o menor par, 3,62% (Tabela 2). Foi identificada variação entre e dentro de plantas quanto ao número de sinais de DNAr 5S e 45S. De dez plantas analisadas, seis apresentaram seis sítios de DNAr 5S, duas apresentaram cinco e duas apresentaram quatro (Figura 3 A-C). Para os sítios de DNAr 45S, cinco plantas apresentaram número constante de sítios entre células, sendo uma delas com três (Figura 3E), e as demais, quatro (Figura 3A-C). As outras plantas tiveram número de sítios de DNAr 45S variando de dois a quatro entre células da mesma planta (Figura 3A-E). Para fins de detalhamento cariotípico foram escolhidas as metáfases com o maior número de sítios de DNA ribossomais.

Os sítios de DNAr 5S em *B. brizantha* estavam localizados na posição intersticial-proximal do braço longo dos pares cromossômicos 8 e 15. No par 12 esse sinal estava localizado no braço curto. Os tamanhos médios dos sinais foram de 0,46, 0,36 e 0,38 μ m, com distância média do centrômero de 0,43, 0,50 e 0,50 μ m respectivamente para os pares 8, 12 e 15 (Figura 3C, F e G). No par 15, por vezes, os sinais de DNAr 5S estavam ausentes, ou presentes em estado hemizigoto (Figura 3A, B e G). Sítios de DNAr 45S foram localizados no braço curto dos pares cromossômicos 7 e 13 com respectivos tamanhos médios de 1,18 e 0,88 μ m, distanciados do centrômero em média à 0,81 e 0,89 μ m respectivamente (Figura 3A-C, F e G). A fibra de DNA estendida dessa região cromossômica variou de 0,65 a 1,43 μ m, o que superestimou o comprimento total dos pares cromossômicos que possuem o referido sítio. No par 7 foi constatada diferença no comprimento total entre os cromossomos homólogos (Figura 3F e Tabela 2). Apenas dois sinais de DNAr 45S se colocaram com as bandas CMA e não foram identificadas bandas DAPI (Figura 2 D-F). Sinais de CMR1 foram identificados nos pares cromossômicos 5, 10 e 14, não concentrados em clusters (Figura 3F).

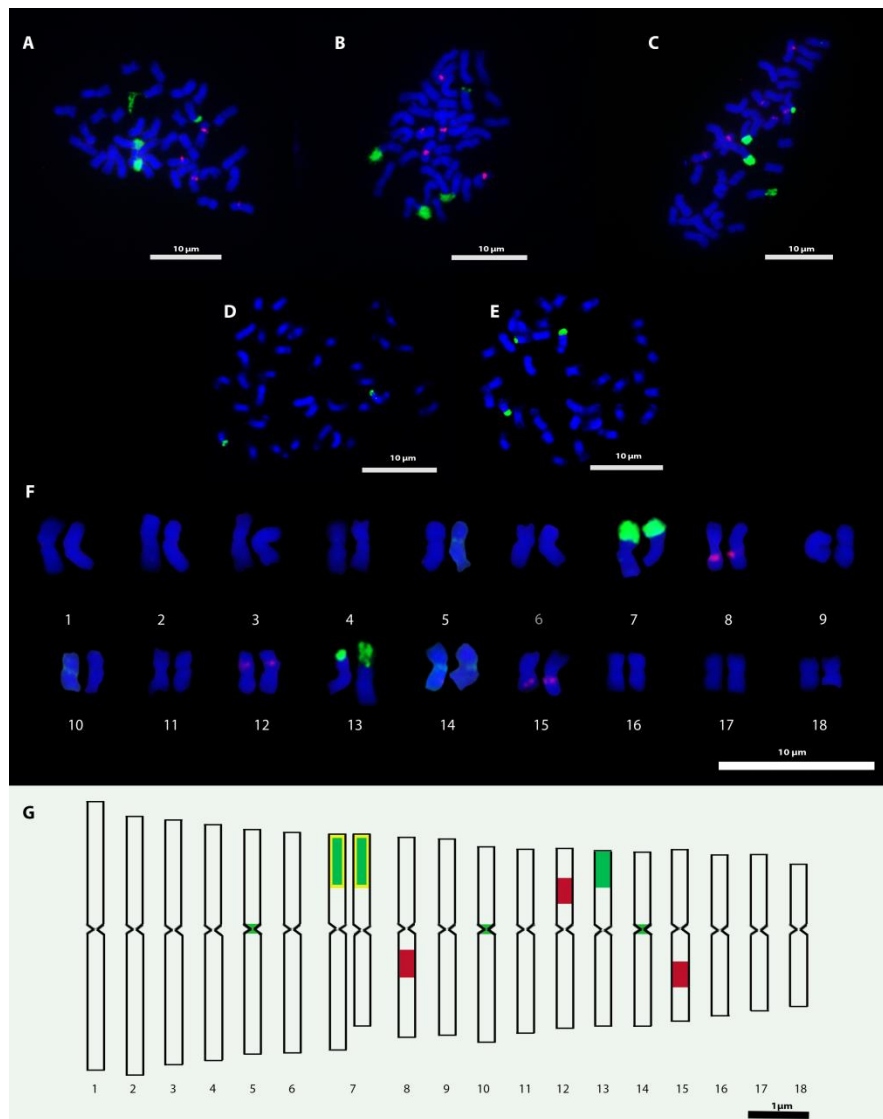


Figura 3 Cromossomos de *Brachiaria brizantha* ($2n=4x=36$). A) Metáfase com quatro sítios de DNAr 45S e três de DNAr 5S. B) Metáfase com quatro sítios de DNAr 45S e cinco de DNAr 5S. C) Metáfase com quatro sítios de DNAr 45S e seis de DNAr 5S. D) Metáfase com dois sítios de DNAr 45S. E) Metáfase com três sítios de DNAr 45S. F) Cariograma de metáfase que apresentou o maior número de sítios de DNAr. G) Idiograma. Em verde, sinais de DNAr 45S e CRM1; em vermelho, sinais de DNAr 5S e em amarelo, sinais da banda CMA⁺, par 15 com sítio de DNAr 5 por vezes ausente

Tabela 2 Morfometria média dos cromossomos de *Brachiaria brizantha*: BL (comprimento do braço longo - μm); BC (comprimento do braço curto - μm); CT (comprimento total cromossômico - μm); CR (comprimento relativo - %); RB (relação de braço) e CTLH (comprimento total do lote haploide - μm). Cromossomos classificados em metacêntrico (m), de acordo com Levan, Fredga e Souberg (1964)

PAR	BL	BC	CT	CR	RB	MORFOLOGIA
1	2,27	2,07	4,34	6,83	1,10	m
2	2,35	1,84	4,19	6,59	1,28	m
3	2,18	1,78	3,96	6,23	1,22	m
4	2,12	1,71	3,83	6,03	1,24	m
5	2,02	1,62	3,64	5,73	1,25	m
6	2,00	1,58	3,58	5,63	1,27	m
7 *	2,33	2,12	4,45	7,00	1,10	m
7**	1,93	1,64	3,57	5,62	1,18	m
8	1,73	1,49	3,22	5,07	1,16	m
9	1,71	1,48	3,19	5,02	1,16	m
10	1,83	1,35	3,18	5,00	1,36	m
11	1,68	1,31	2,99	4,70	1,28	m
12	1,62	1,32	2,94	4,63	1,23	m
13*	1,80	1,61	3,41	5,37	1,12	m
14	1,57	1,26	2,83	4,45	1,25	m
15	1,48	1,3	2,78	4,37	1,14	m
16	1,41	1,21	2,62	4,12	1,17	m
17	1,31	1,22	2,53	3,98	1,07	m
18	1,24	1,06	2,30	3,62	1,17	m
CTLH			63,55			

*Pares cromossômicos com DNAr 45S apresentando fibra de cromatina estendida

**Cromossomo heteromórfico e com cromatina estendida na região de DNAr 45S

B. decumbens com $2n=36$ cromossomos (Figura 4A) apresentou fórmula cariotípica $17M+1M/SM$. O comprimento relativo do maior par cromossômico corresponde a 7,17%, enquanto o menor 3,54% (Tabela 3).

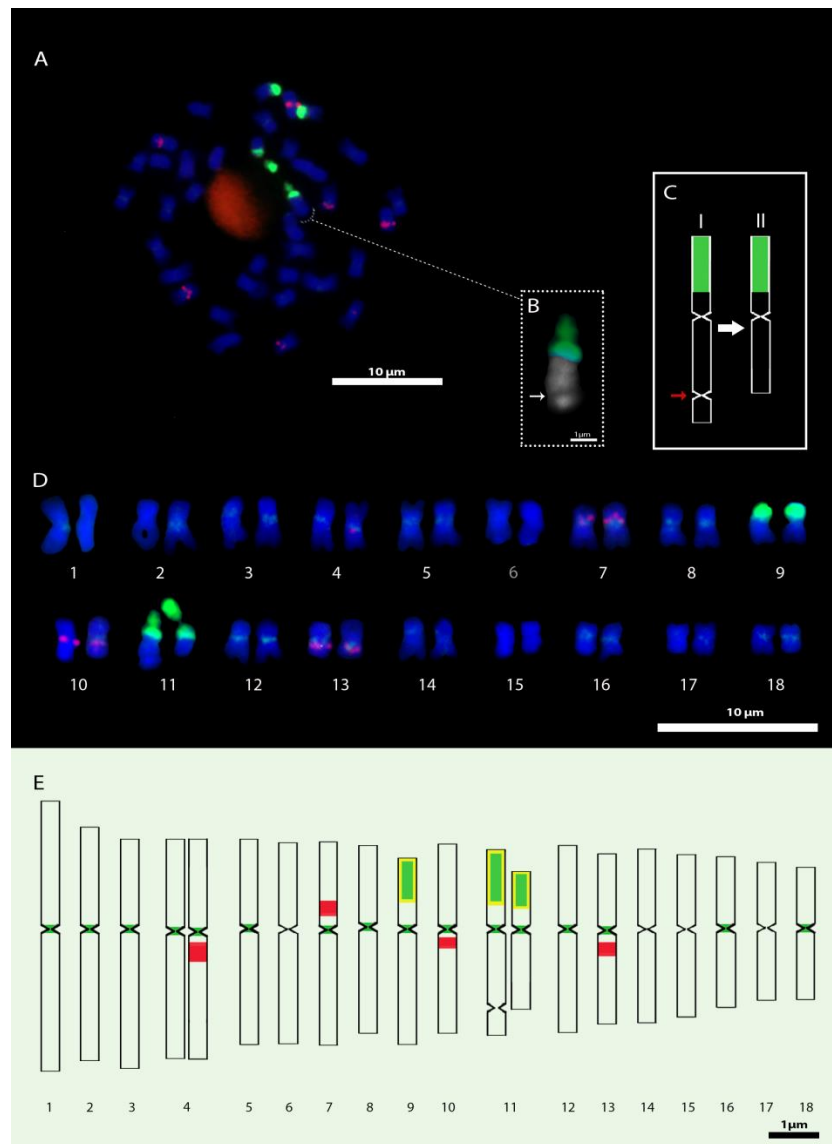


Figura 4 Cromossomos de *Brachiaria decumbens*. A) Metáfase com $2n = 36$ cromossomos. B) Cromossomo do par 11 portador de constrição terciária (seta) e de sítio de DNAr 45S. C) Tipo cromossômico II é o resultado da deleção na constrição terciária (seta vermelha) do cromossomo de maior comprimento do par 11 chamado de tipo I. D) Cariograma. E) Idiograma. Em verde, sinais de DNAr 45S e CRM1⁺; em vermelho, sinais de DNAr 5S e em amarelo sinais da banda CMA⁺

Tabela 3 Morfometria média dos cromossomos de *Brachiaria decumbens*: BL (comprimento do braço longo - μm); BC (comprimento do braço curto - μm); CT (comprimento total cromossômico - μm); CR (comprimento relativo - %); RB (relação de braço) e CTLH (comprimento total do lote haploide - μm). Cromossomos classificados em metacêntrico (m) e submetacêntrico (sm), de acordo com Levan, Fredga e Souberg (1964)

PAR	BL	BC	CT	CR	RB	MORFOLOGIA
1	1,43	1,26	2,69	7,17	1,13	m
2	1,33	1,00	2,33	6,21	1,33	m
3	1,40	0,88	2,28	6,08	1,59	m
4	1,28	0,91	2,19	5,84	1,41	m
5	1,16	0,9	2,06	5,49	1,29	m
6	1,16	0,86	2,02	5,38	1,35	m
7	1,18	0,87	2,05	5,46	1,36	m
8	1,08	0,8	1,88	5,01	1,35	m
9*	1,16	0,99	2,15	5,73	1,17	m
10	1,06	0,85	1,91	5,09	1,25	m
11*	1,19 (0,52+0,67)	1,57	2,76	7,36	1,32	m
11**	0,57	1,44	2,01	5,36	2,53	sm
12	1,06	0,83	1,89	5,04	1,28	m
13	0,96	0,75	1,71	4,56	1,28	m
14	0,95	0,79	1,74	4,64	1,20	m
15	0,89	0,74	1,63	4,34	1,20	m
16	0,79	0,71	1,50	4,00	1,11	m
17	0,74	0,65	1,39	3,70	1,14	m
18	0,72	0,61	1,33	3,54	1,18	m
CTLH			37,52			

*Pares cromossômicos com DNAr 45S apresentando fibra de cromatina estendida

** Cromossomo heteromórfico e com cromatina estendida na região de DNAr 45S

Sinais intersticiais–proximais de DNAr 5S em *B. decumbens* estavam distribuídos nos pares cromossômicos 4, 7, 10 e 13 com respectivos tamanhos médios de 0,32, 0,28, 0,22 e 0,24 μm , distanciados em média do centrômero à 0,18, 0,20, 0,14 e 0,26 μm . O par cromossômico 4 se apresenta em estado de

hemizigose e, com exceção do par cromossômico 7, nos demais o sinal do sítio de DNAr 5S estava localizado no braço longo. Sítios de DNAr 45S foram identificados no braço curto dos pares cromossômicos 9 e 11 com respectivos tamanhos médios de 0,79 e 1,08 μm e distâncias média de 0,32 e 0,34 μm do centrômero (Figura 4D e E). Tal região cromossômica apresentou fibra de DNA estendida, com comprimento variando de 0,58 a 1,97 μm , o que contribuiu para superestimar o comprimento total desses pares cromossômicos. O par 11 apresentou heteromorfismo com relação ao comprimento total e a morfologia cromossômica (Figura 4D e E). Além disso, o cromossomo homólogo de maior comprimento apresentou constrição terciária na região distal do braço longo (Figura 4B) de tamanho médio de 0,67 μm . Os sinais de DNAr 45S se colocalizaram com as bandas CMA e não foram identificadas bandas DAPI (Figura 2 G-I). Com exceção dos pares 6, 14, 15 e 17, a região centromérica foi marcada com CRM1, contudo com menor nitidez se comparado à *B. ruziziensis*.

A avaliação da atividade transcricional revelou que nem todos os sítios de DNA 45S estavam ativos nas três espécies avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 Número de bandas AgNOR⁺ comparado ao número de sítios de DNAr 45S e número de nucléolos em espécies de *Brachiaria* spp

espécie	n° de bandas AgNOR ⁺			N° de sítios de DNAr 45S	Número de nucléolos	
	1	2	3		1	2
<i>B. ruziziensis</i> (2x)	4	3	-	2	100%	0%
<i>B. brizantha</i> (4x)	1	7	1	4	96,90%	3,10%
	-	2	-	3		
<i>B. decumbens</i> (4x)	-	4	-	2	99,38%	0,62%
	3	9	1	4		

B. ruziziensis apresentou um ou dois sinais ativos em frequências similares entre as metáfases avaliadas (Figura 5A e B).

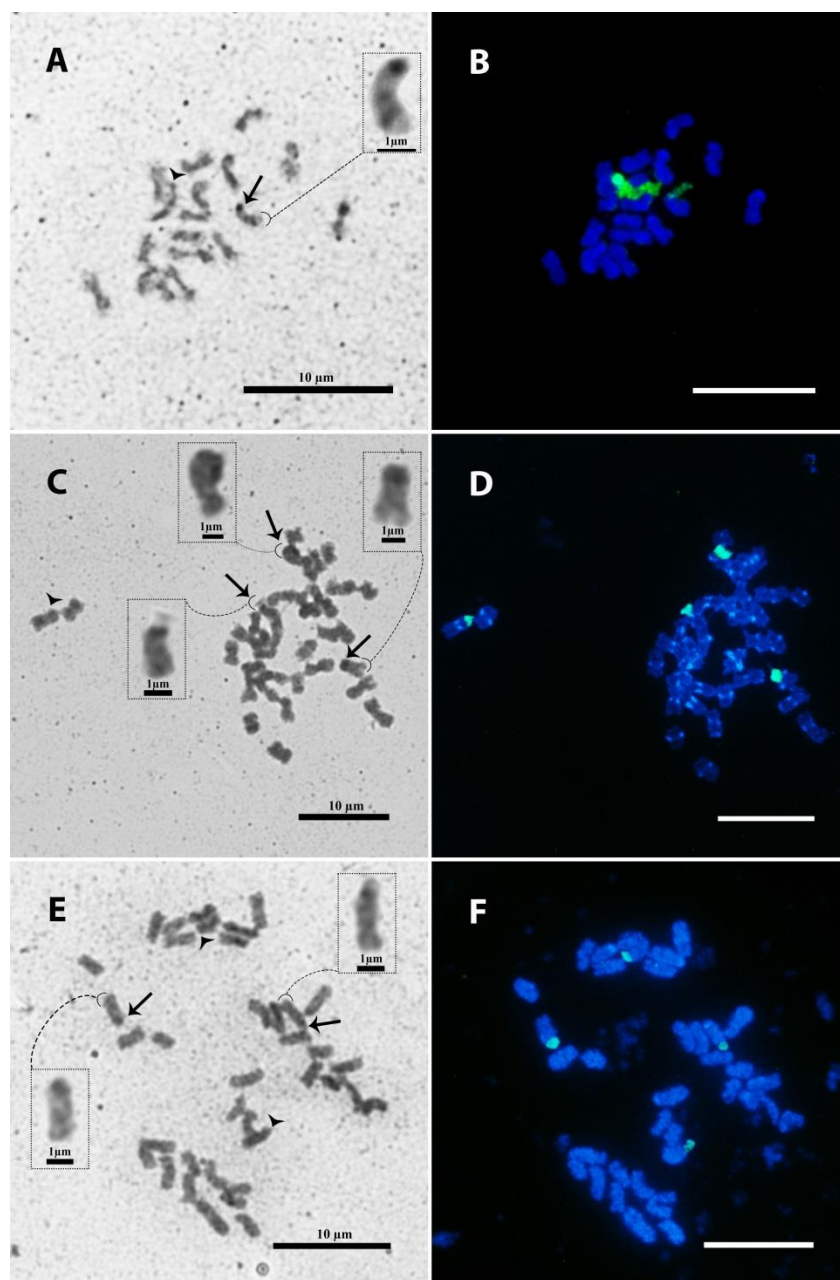


Figura 5 Bandas AgNOR e sítios de DNAr 45S em espécies de *Brachiaria*. A e B) *Brachiaria ruziziensis*. C e D) *Brachiaria brizantha*. E e F) *Brachiaria decumbens*. Setas indicam sítios ativos e pontas de seta, os sítios inativos.

B. brizantha, na maioria das metáfases, apresentou dois sinais ativos, independente do número de sítios de DNAr 45S presentes (Figura 5C e D) e *B. decumbens* apresentou com maior frequência dois sinais ativos dos quatro marcados com sonda de DNAr 45S (Figura 5E e F).

B. ruziziensis não apresentou variação quanto ao número de nucléolos. A presença de apenas um nucléolo foi mais frequente em *B. brizantha* e *B. decumbens* e a presença de um segundo nucléolo de menor tamanho foi rara (Tabela 4). Os nucléolos apresentaram tamanho variando de 3,97 a 13,98 μm em *B. ruziziensis*, de 1,56 a 24,95 μm em *B. brizantha* e de 6,38 a 19,49 μm em *B. decumbens* (Figura 6).

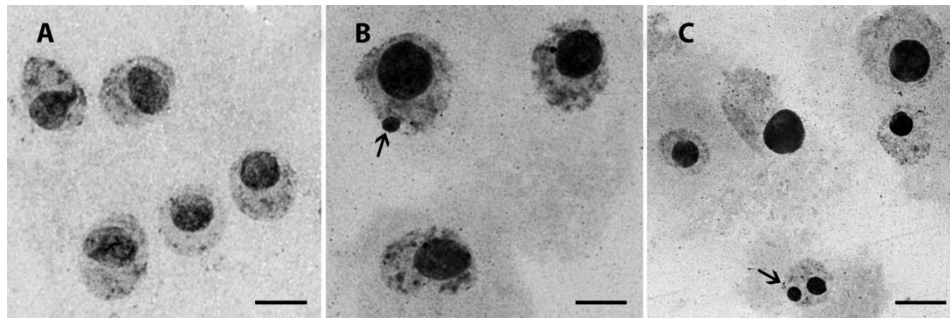


Figura 6 Nucléolos em espécies de *Brachiaria*. A) *Brachiaria ruziziensis*. B) *Brachiaria brizantha*. C) *Brachiaria decumbens*. Setas indicam células com dois nucléolos. Barra 10 μm

Os índices de assimetria intracromossômica (M_{CA}) e intercromossômica (CV_{CL}) revelaram que *B. ruziziensis* e *B. brizantha* são mais próximas quanto à morfologia dos cromossomos, enquanto *B. brizantha* e *B. decumbens* se aproximam quanto ao coeficiente de variação do comprimento total dos cromossomos (Tabela 5).

Tabela 5 Índices de assimetria cromossômica em espécies de *Brachiaria*, onde CV_{CL} = coeficiente de variação do comprimento cromossômico, M_{CA} = média da assimetria centromérica

	<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>
CV_{CL}	14,22	18,59	19,55
M_{CA}	10,14	8,82	13,49

Os resultados obtidos para as três espécies em relação às análises citogenéticas realizadas no presente trabalho podem ser sumarizados no quadro 1.

Quadro 1 Resumo dos resultados obtidos por meio das análises citogenéticas realizadas em espécies de *Brachiaria* spp.

Características avaliadas	<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. brizantha</i>	<i>B. decumbens</i>
Número cromossômico	18	36	36
Fórmula cariotípica	9 M	18 M	17 M + 1 M/SM
Comprimento relativo médio do maior e menor pares cromossômicos	12 % e 8,51 %	6,83 % e 3,62 %	7,17 % e 3,54 %
Comprimento Total do Lote Haploide	14,33 μm	63,55 μm	37,52 μm
Número de sítios de DNAr 45S	2	2 a 4	4
Par (es) cromossômico (s) portador (es) de sítio de DNAr 45S e posição	8 (braço curto)	7 e 13 (braço curto)	9 e 11 (braço curto)
Tamanho médio do (s) sítio (s) de DNAr 45S	0,74 μm	1,18 e 0,88 μm	0,79 e 1,08 μm
Amplitude de variação tamanho dos sítios de DNAr 45S	0,39 a 1 μm	0,65 a 1,43 μm	0,58 a 1,97 μm

Quadro1, Continua

Distância média dos sítios de DNAr 45S em relação ao centrômero	0,42 μm	0,81 e 0,89 μm	0,32 e 0,34 μm
Número de sítios de DNAr 45S ativos	1 ou 2	1 a 3	1 a 3
Numero de sítios de DNAr 5S	4	3 a 6	8
Pares cromossômicos portador dos sítios de DNAr 5S e posição	2 (braço curto) e 6 (braço longo)	8 (braço longo), 12 (braço curto) e 15 (braço longo)	4 (braço longo), 7 (braço curto), 10 (braço longo) e 13 (braço longo)
Tamanho médio dos sítios de DNAr 5S nos pares cromossômicos	0,26 e 0,22 μm	0,46, 0,36 e 0,38 μm	0,32, 0,28, 0,22 e 0,24 μm
Distância média dos sítios de DNAr 5S do centrômero	0,19 e 0,23 μm	0,43, 0,50 e 0,50 μm	0,18, 0,20, 0,14 e 0,26 μm
Presença de heteromorfismos cromossômicos	-	Ausência ou estado hemizigoto quanto ao sítio de DNAr 5S no par 15. Diferença no comprimento total entre os cromossomos homólogos do par 7	Estado hemizigoto do par cromossômico 4 quanto ao sítio de DNAr 5S. Cromossomos do par 11 de comprimento total e a morfologia cromossômica distintos
Presença de constrição terciária	-	-	Par 11 (braço longo)

Quadro 1, Continua

Sítios de CRM1	Região centromérica nitidamente marcada em todos os cromossomos	Pares cromossômicos 5, 10 e 14, com sinais centroméricos não concentrados em clusters	Sinais centroméricos não concentrados em clusters, com exceção dos pares 6, 14, 15 e 17
Número de bandas CMA⁺	2	2	4
Número de nucléolos	1	1 ou 2	1 ou 2
Tamanho dos nucléolos	3,97 a 13,98 μm	1,56 a 24,95 μm	6,38 a 19,49 μm

4 DISCUSSÃO

4.1 Localização de sequências repetitivas em cromossomos de *Brachiaria* spp.

B. ruziziensis apresenta $2n = 2x = 18$ cromossomos como reportado anteriormente por diferentes autores (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPA, 1987; BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; LOVE, 1981; SOTOMAYOR-ROS; FERGUSON; CROWDER, 1974). Até então apenas indivíduos diploides naturais foram descritos para a espécie e a ocorrência de plantas tetraploides se dá por intermédio da duplicação artificial dos cromossomos (TIMBÓ et al., 2014). A morfologia dos cromossomos, todos metacêntricos, está em acordo com os

resultados obtidos por Bernini e Marin-Morales (2001). Entretanto, Valle, Savidan e Jank (1987) identificaram os cromossomos no paquíteno como submetacêntricos.

A identificação do sítio de DNAr 45S no par 8 corrobora com a relatada por Bernini e Marin-Morales (2001) e diverge das análises realizadas por Valle, Savidan e Jank (1987), em células no paquíteno, por meio das quais os autores descrevem o posicionamento do sítio no par cromossômico 7. Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010) também encontraram dois sinais de DNAr 45S e quatro de DNAr 5S o que corrobora com os resultados do presente trabalho, no entanto os autores não identificaram o par portador dos loci. Os sítios de DNAr 45S em *B. ruziziensis* foram CMA⁺. Essa associação já foi descrita em outras gramíneas, tais como *Lolium perenne* Linnaeus, 1753 (ROCHA et al., 2015) e tem sido frequentemente relatada em Angiospermas (GUERRA, 2000).

Diferenças na identificação da posição de DNAr 45S podem ocorrer devido a variações intraespecíficas, mas também quando técnicas citogenéticas distintas são utilizadas isoladamente. Os cromossomos de espécies de *Brachiaria* frequentemente apresentam fibra da cromatina estendida na região cromossômica distal, especialmente nos cromossomos portadores de DNAr 45S, o que pode contribuir para superestimar as medidas de comprimento cromossômico, assim como observado para espécies do gênero *Setaria* Beauvois, 1812 (NANI et al., 2015). Esse comportamento pode levar à identificação equivocada da localização dos pares cromossômicos no cariógrama, sobretudo quando são utilizadas apenas técnicas de citogenética convencional. Em contraste, o alto nível de compactação da cromatina, segundo Winterfeld e Röser (2007), também dificulta a visualização da constrição secundária. A notificação precisa da presença de constrição secundária é facilitada quando a região gênica ribossomal esteve em atividade durante a

interfase precedente, e por isso, o uso de técnicas de citogenética convencional atrelado às análises adicionais, tais como banda NOR e FISH, constitui uma ferramenta mais segura para a interpretação de resultados, estratégia empregada nesse estudo.

A não visualização de bandas DAPI, tanto para *B. ruziziensis* quanto para as demais espécies estudadas no presente trabalho, pode estar relacionada com a inexistência de longos trechos do DNA ricos em bases A-T passíveis de serem detectados pelo bandamento CMA/DAPI. Segundo Barros Silva e Guerra (2010), o arranjo desses nucleotídeos no DNA e a associação de proteínas histônicas e não histônicas podem afetar a localização de bandas DAPI+.

Os centrômeros de *B. ruziziensis* apresentam sinais de CRM1 nitidamente identificados por intermédio da sonda. Tal observação indica expressiva participação dessa sequência na organização do centrômero na espécie. Em milho, CRM1 está exclusivamente relacionado ao centrômero (WOLFGRUBER et al., 2009). A diferenciada organização desse retrotransposon em *B. ruziziensis* pode ser atribuída à própria natureza de comportamento dos elementos transponíveis, que no caso dos CRs constituem uma família de retroelementos em plantas que pode ter a capacidade de direcionar a sua inserção para os centrômeros funcionais.

Segundo Miller et al. (1998), CR é um grupo de retrotransposons centroméricos derivado dos retrotransposons do tipo Ty3/gypsy, que foi identificado primeiramente em sorgo, e posteriormente, verificou-se sua presença em todas as gramíneas já estudadas. Diferentemente do que se tinha relatado para elementos transponíveis, os CRs em gramíneas parecem ser bastante conservados. Existem duas possíveis explicações para essa rara conservação: o retrotransposon Ty3/gypsy pode representar um transposon antigo e foi amplificado possivelmente antes da divergência das espécies de gramíneas. Posteriormente, mutações nos CRs foram acumuladas mais

lentamente que os retrotransposons fora da região centromérica, resultando em sequências altamente conservadas no centrômero. A segunda hipótese seria o fato da sequência Ty3/gypsy estar associada com a função centromérica resultando na alta conservação. A associação da sequência com alguma função é motivada pelo fato de CRs serem específicos de centrômeros e por serem conservados mesmo em espécies relacionadas, porém distantes. Não existem relatos de DNAs repetitivos conservados em regiões cromossômicas específicas, exceto sequências de DNA telomérico e de genes ribossomais. A presença de CR proveniente do genoma de milho em *B. ruziziensis* também é um indicativo da conservação desse retrotransposon, pois tratam-se de espécies inseridas taxonomicamente na mesma família, porém não estreitamente relacionadas.

O número de cromossomos $2n = 4x = 36$ encontrado para *B. brizantha* corrobora com o resultado reportado por outros autores (AKIYAMA; YAMADA-AKIYAMA; EBINA, 2010; BERNINI; MARIN-MORALES, 2001; DUJARDIN, 1979; GOULD; SODERSTROM, 1974; KAMMACHER et al., 1973; LOVE, 1981; MEHRA, 1982; SINHA; JHA, 1972; SOTOMAYOR-ROS; SCHANK; WOODBURY, 1970; TATEOKA, 1965).

A morfologia cromossômica verificada em *B. brizantha* coincide com as descrições realizadas por Bernini e Marin-Morales (2001), que relataram, em dois acessos, 18 pares cromossômicos, todos metacêntricos. Entretanto, em um terceiro acesso, um dos pares cromossômicos foi classificado como submetacêntrico. Nielen et al. (2010), em acessos tetraploides, classificaram os pares cromossômicos como metacêntricos, com exceção dos pares 3 e 14 que foram considerados submetacêntricos. Nos acessos diploides, cinco pares foram classificados como submetacêntricos, três como metacêntricos e um como subtelocêntrico.

Bernini e Marin-Morales (2001) e Nielen et al. (2010), utilizaram os critérios estabelecidos por Levan, Fredga e Souberg (1964) para classificação da

morfologia cromossômica e propuseram diferentes fórmulas cariotípicas para diferentes acessos de *B. brizantha*. No presente trabalho, foram utilizados os mesmos critérios, no entanto, há que se considerar que diferentes fórmulas cariotípicas podem ser atribuídas à diferenças intraespecíficas, conforme já havia sido relatado por Bernini e Marin-Morales (2001) em *Brachiaria* spp.

Com relação aos sítios de DNAr 5S, a amplitude da variação intraespecífica observada nesse estudo para *B. brizantha*, com quatro, cinco e seis sítios e, em algumas metáfases, ausência ou estado hemizigoto do sítio no cromossomo do par 15, ainda não havia sido relatada para a espécie. Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010) descreveram seis e quatro sítios de DNAr 5S, sem mencionar a posição dos mesmos, para o acesso CIAT 6294-cultivar Marandú e para o acesso CIAT16306, respectivamente. No acesso CIAT 6294-cultivar Marandú, um dos sítios de DNAr 5S estava em sintenia com o de DNAr 45S. Nielen et al. (2010) relataram que a mais surpreendente diferença encontrada entre acessos de diferentes ploidias em *B. brizantha* é que nos diploides, apenas um par cromossômico era portador do sítio de DNAr 5S, e nos tetraploides dois pares eram esperados, no entanto, encontraram três, resultado que no caso foi relacionado com a ocorrência de aloploidia para a espécie. Análises com marcadores moleculares do tipo RAPD também mostraram maior variabilidade genética em *B. brizantha* (AMBIEL et al., 2008).

B. brizantha parece conter diferentes proporções de nucleotídeos C-G na composição dos sítios de DNAr 45S, uma vez que apenas dois dos sinais foram evidenciados por meio do bandamento CMA. A posição dos sítios de DNAr 45S localizados nos pares 7 e 13 está de acordo com os resultados obtidos por Nielen et al. (2010) para os acessos tetraploides. Entretanto, os resultados obtidos nesse estudo revelam variação para os sítios de DNAr, com metáfases apresentando sinais em hemizigose e até redução no número de sítios no cariótipo. Bernini e Marin-Morales (2001), por meio de análises de citogenética convencional em

plantas tetraploides, identificaram a posição do satélite no par cromossômico 12 em apenas um dos acessos avaliados. Para os outros dois acessos estudados, os satélites não foram identificados, por não apresentarem constrição secundária. Akiyama, Yamada-Akiyama e Ebina (2010) encontraram quatro sítios de DNAr 45S em dois acessos tetraploides da espécie, sem indicar a posição no cariótipo.

A fórmula cariotípica de *B. decumbens* (17M+1M/SM) também foi encontrada por Bernini e Marin-Morales (2001), os autores ainda relataram a existência de um acesso com todos os cromossomos metacêntricos.

A descrição de número e posição dos sítios de DNAr, via FISH, é inédita para essa espécie e demonstrou divergências com os resultados obtidos por Bernini e Marin-Morales (2001) em cromossomos corados por técnicas convencionais. Os quatro sinais de DNAr 45S/CMA⁺ evidenciados nesse estudo estavam posicionados nos pares cromossômicos 9 e 11, sendo o par 11 nitidamente heteromórfico. Bernini e Marin-Morales (2001), relataram a presença de satélites nos pares 7 e 11 em um dos acessos, no par 3 em um segundo acesso, e no terceiro acesso, a posição do satélite não foi determinada. Há que se ressaltar que estes autores também indicaram a ocorrência de diferenças entre acessos, as quais foram atribuídas às alterações estruturais ou possível hibridação entre diferentes acessos da espécie.

Os sinais de CRM1 dispersos nos centrômeros de *B. decumbens* e ainda mais raros em *B. brizantha* podem ser um indicativo de maior atividade transponível no genoma o que dissiparia as sequências a ponto de não serem detectadas pela FISH, ou ainda por terem sido eliminadas. Essa classe de retrotransposons é típica de centrômeros de gramíneas, no entanto existem diversas derivações de CR já identificadas em espécies como cevada, trigo, centeio e arroz (PRESTING et al., 1998). Para milho, até o momento, foram relatadas seis subfamílias de CRM (NEUMANN et al., 2011; SHARMA; PRESTING, 2008, 2014). *B. brizantha* e *B. decumbens* provavelmente possuem

alguma forma diferente de CR mais abundante e responsável pela organização do centrômero. Sequências repetidas de CRM também foram estudadas nos cromossomos de espécies de *Brachiaria* por Santos et al. (2015). Foram identificados sinais discretos na região pericentromérica-intersticial em diploides de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*. Em *B. humidicola* poliploide, nenhuma evidência de sinais dispersos foi detectada ao longo de braços cromossômicos e os cromossomos de *B. brizantha* poliploide apresentaram sinais proximais, além de alguns pontos intersticiais.

4.2 Atividade transcricional dos sítios de DNAr 45S

Em *B. ruziziensis*, entre os dois sítios de DNAr 45S identificados, por vezes, um deles não se apresentou ativo durante a interfase precedente. A inatividade de um dos sítios pode ser explicada pelo fato de eucariotos possuírem genes ribossomais altamente repetidos no genoma, muitas vezes em quantidade maior que o necessário para a síntese de ribossomos. Assim, apenas um pequeno conjunto de genes ribossomais são ativos. A chave para ativação ou silenciamento dos genes ribossomais é o remodelamento da cromatina, que é regulado por mecanismos genéticos e epigenéticos (GRUMMT; PIKAARD, 2003). Segundo Lawrence et al. (2004), a metilação do DNA desempenha um papel importante na ativação/silenciamento dos genes ribossomais e a dominância nucleolar seria uma manifestação do controle de dosagem desses genes. O controle foi observado tanto em híbridos de *Arabidopsis* Heynhold, 1842 como também em não-híbridos. No caso de híbridos, os genes que são expressos são aqueles procedentes de um dos parentais por meio de mecanismos desconhecidos.

Estudos realizados por Paula (2015) mostram que algumas RONS apresentam imunomarcagem da 5-metilcitosina e da dimetilação da H3K9,

evidenciando silenciamento gênico e a sua natureza heterocromática em *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha*, *B. ruziziensis* e seus híbridos.

A atividade transcricional dos genes ribossomais tanto em *B. brizantha* como em *B. decumbens* é típica de espécies alopoliploides e de híbridos, devido a ativação de apenas parte dos sítios de DNAr 45S presentes na espécie. Os sítios de DNAr 45S podem ser suprimidos ou eliminados como consequência do processo de poliploidização. Esse fenômeno já foi reportado para *Scilla autumnalis* Linnaeus, 1753 (VAUGHAN et al., 1993), *Aegilops squarrosa* Linnaeus, 1753 (GERLACH; MILLER; FLAVELL, 1980), *Triticum dicoccum* Schrank, 1789 (HUTCHINSON; MILLER, 1982), *Triticum spelta* Dumortier, 1824 (MILLER; GERLACH; FLAVELL, 1980), espécies que perderam a capacidade de organizar nucléolos por um dos genomas parentais durante ou após a poliploidização.

O silenciamento ou ativação de alguns dos sítios de DNAr 45S varia de acordo com as necessidades fisiológicas da célula. Genes ribossomais são altamente conservados, de modo que seja improvável que diferenças funcionais sejam expressas entre esses genes provenientes de diferentes genomas (PREUSS; PIKAARD, 2007). No entanto, a decisão de qual genoma tem a região organizadora de nucléolo (RON) ativada ainda não foi completamente elucidada. O que se sabe é que a escolha parece ser não-aleatória e que o número de genes envolvidos na expressão gênica não está relacionado com a ativação ou silenciamento da RON, uma vez que sítios menores de DNAr 45S podem ser dominantes (CHEN; PIKAARD, 1997).

A constrição secundária é definida como uma região de afrouxamento da cromatina devido à atividade transcricional ocorrida durante a interfase precedente (BATTAGLIA, 1955). Em plantas poliploides, a dominância nucleolar pode ativar ou silenciar sítios de DNAr 45S diferentemente, dependendo da interação entre os genomas, assim como de fatores genéticos e

epigenéticos (GRUMMT; PIKAARD, 2003). Desta forma, a não identificação de constrição secundária não implica necessariamente na ausência de DNA ribossomal, mas sim que naquele momento um determinado sítio não estava ativo, ou ainda que a espécie tenha o sítio, mas não exibe constrição secundária bem definida.

4.3 Rearranjos cromossômicos moldam o cariótipo em *Brachiaria* spp.

A variação quanto ao número e posição dos sítios de DNAr 45S e 5S inter e intraespecífica identificada nas espécies poliploides de *Brachiaria* indica que o período de tempo subsequente à poliploidização pode ter sido muito dinâmico com extensivos rearranjos envolvendo os sítios de DNAr. Segundo Kovarik et al. (2008), o processo de formação de aloploiploides se inicia com o choque genômico decorrente da mistura de genomas distintos. Mecanismos epigenéticos então são acionados e aceleram a homogeneização dos genomas. Durante esse processo, sequências podem ser perdidas como consequência do fenômeno de diploidização, comum em espécies poliploides como uma estratégia de eliminação de doses gênicas que estão em excesso, especialmente sequências altamente repetitivas como as de genes ribossomais.

Segundo Comai (2000), as regras da genética convencional são inadequadas para explicar totalmente a instabilidade que ocorre no genoma de aloploiploides. Interações epigenéticas também podem ativar ou suprimir transposons, que constituem grande parte do genoma de plantas, afetando a estrutura e função do genoma. Desta forma, não apenas deleções de fragmentos cromossômicos podem ocorrer como aborda Kovarik et al. (2008), mas também, como salienta Comai (2000), que aumentos no comprimento de alguns cromossomos podem ser causados em aloploiploides como consequência da ativação dos retrotransposons dormentes. Assim, os heteromorfismos no par 7

de *B. brizantha* e no par 11 em *B. decumbens*, podem ter suas origens a partir desses ajustes estruturais.

Contudo, a respeito do par 11 em *B. decumbens*, outro fator que deve ser levado em consideração é a presença de constrição terciária no braço longo de um dos cromossomos homólogos. A presença de constrição terciária já foi relatada para outras espécies de gramíneas como cevada (GECHEFF, 1976), *Thinopyrum intermedium* (Host, 1805) Barkworth, Dewey, 1985 (CHEN et al., 1998), *Secale cereale* Linnaeus, 1753 (JENKINS et al., 2005) e *Hordeum parodii* Covas, 1951 (TAKETA et al., 2005). Em *Tripsacum dactyloides* (Linnaeus, 1753) Linnaeus, 1759, a constrição terciária frequentemente causa quebras gerando fragmentos cromossômicos. Em busca do tipo de sequência que compunha o fragmento cromossômico os autores utilizaram sonda pTd-8 e observaram que todos os cromossomos foram marcados com um bloco em ambas extremidades cromossômicas ou em apenas uma delas. Assim, foi possível dividir os cromossomos em dois tipos sendo o tipo I, aquele que portava dois Knobs, o qual sofreu uma quebra e, ao longo do tempo evolutivo, gerou o tipo II, que apresentava apenas uma das extremidades com a presença de Knob (KOO; JIANG, 2008).

A função da constrição terciária ainda é desconhecida e é descrita para *S. sereale* como uma região heterocromática relacionada com a sensibilidade ao frio (GILL; SEARS, 1988). Constrições na estrutura dos cromossomos são caracterizadas como regiões fracamente coradas pelo fato de a cromatina ser menos condensada (BATTAGLIA, 1955; OHNUKI, 1968), o que pode representar uma região de fragilidade cromossômica passível de quebra. Desta forma, um dos cromossomos homólogos do par 11 teria perdido um fragmento por uma quebra na constrição terciária e o par homólogo teria mantido a estrutura original (Figura 4C). Essa parece ser uma explicação razoável para a causa do heteromorfismo do referido par em *B. decumbens*, uma vez que,

desconsiderando o segmento cromossômico a partir da constrição terciária (0,67 μ m), o braço longo do menor cromossomo do par (0,57 μ m) possuiria comprimento semelhante ao braço longo do cromossomo homólogo (0,52 μ m).

Com relação à assimetria cariotípica, os cariótipos de *B. ruziziensis* e *B. brizantha*, segundo as categorias estabelecidas por Stebbins (1958), estão classificados como simétricos e inseridos na categoria 1A. *B. decumbens* por sua vez, teve seu cariótipo incluído na categoria 2B, também considerado simétrico. O nível de assimetria para *B. decumbens* foi mais expressivo devido às diferenças intracromossômicas, ou seja, maior variação na posição do centrômero. Esse mesmo comportamento também foi identificado por Bernini e Marin-Morales (2001). Apesar das pequenas tendências à assimetria identificadas, os cariótipos das três espécies estudadas apresentam diferenças graduais quanto ao comprimento total dos cromossomos, e de acordo com Stebbins (1971), cariótipos menos especializados e filogeneticamente mais basais são caracterizados pela predominância de cromossomos metacêntricos de tamanhos semelhantes. Zuo e Yuan (2011) utilizaram os diversos parâmetros disponíveis para análises da assimetria intracromossômica e os autores relatam que assimetria aumenta proporcionalmente com a mudança do centrômero da região mediana para a posição terminal e que a assimetria atinge o máximo quando a posição do centrômero atinge a posição terminal.

Diferentes formas de avaliar a assimetria cariotípica também foram comparadas por Peruzzi e Eroğlu (2013), e segundo os autores, o cálculo de coeficiente de variação elaborado por Sokal e Rohlf (1981) utilizado para análises do comprimento dos cromossomos é estatisticamente correto e avalia muito bem a variação intercromossômica. Os autores ainda afirmam que o cálculo da média da assimetria centromérica é o que melhor expressa a assimetria intracromossômica.

Usando a abordagem de Peruzzi e Eroğlu (2013) para aferir a assimetria cariotípica, *B. decumbens* apresentou o maior valor de assimetria intracromossômica, pelo fato de a espécie apresentar maior variação quanto a posição do centrômero, enquanto *B. ruziziensis* e *B. brizantha* apresentaram os menores valores de assimetria intercromossômica, uma vez que os cromossomos apresentaram pouca variação no comprimento cromossômico. De acordo com Bernini e Marin-Morales (2001), o aumento da assimetria cariotípica em *Brachiaria* spp. ocorreu com o aumento do número de cromossomos no processo de poliploidização.

Ao contrário da pretensa aplicação para taxonomia, os sítios de rDNA em *Brachiaria* spp. mostram ser marcadores importantes para detectar rearranjos, porque eles dão sinais distintos nos cromossomos e parecem mostrar esta dinâmica/mobilidade dos ajustes genômicos pós-poliploidização.

Os resultados obtidos nesse trabalho com o estudo cariotípico em espécies de *Brachiaria* mostram que o processo de aloploidização envolve mudanças na morfologia cromossômica, bem como expressa a dinamicidade de sequências repetitivas no genoma. Contudo, as forças que conduzem o processo de variação cariotípica ainda são desconhecidas.

5 CONCLUSÕES

Brachiaria ruziziensis e *Brachiaria decumbens* não apresentam variação intraespecífica em relação ao número e posição dos sítios de DNAr.

As variações intraespecíficas para os sítios de DNAr em *Brachiaria brizantha* ocorrem em número, mas não em relação à posição, e são típicas do processo de aloploidização.

Quebra cromossômica, com subsequente eliminação, pode ser a causa do heteromorfismo cromossômico detectado para *Brachiaria decumbens*.

Os cariótipos das espécies de *Brachiaria* analisados são simétricos, contudo, para as espécies poliploides, os cariótipos estão sujeitos a aumento da assimetria cariotípica devido às variações intraespecíficas decorrentes do processo de poliploidização.

REFERÊNCIAS

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. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 4, p. 457-464, 2008.

ARAGÓN-ALCAIDE, L. et al. A cereal centromeric sequence. **Chromosoma**, Berlin, v. 105, p. 261–268, 1996.

BARROS E SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**. Baltimore, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2010.

BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA M.; CHINNAPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2297-2309, 1987.

BATTAGLIA, E. Chromosome morphology and terminology. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, Firenze, v. 8, n. 1, p. 179-187, 1955.

BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, Cambridge, v. 104, p. 157-171, 2001.

BOLDRINI, K. R.; PAGLIARINI, M. S.; DO VALLE, C. B. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses $x = 6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 1444-1450, 2009.

CHEN, Q. et al. Molecular cytogenetic characterization of Thinopyrum intermedium –derived wheat germplasm specifying resistance to wheat streak mosaic virus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n.1-7, 1998.

CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, p. 3442–3447, 1997.

COMAI, L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 387–399, 2000.

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

DE WET, J. M. J. Chromosome numbers and some morphological attributes of various South African grasses. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 47, n. 1/2, p. 44-50, 1960.

DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical Applied Genetics**, Switzerland, v. 101, p. 1001-1007, 2000.

DUJARDIN, M. Additional chromosome numbers and meiotic behaviour in tropical African grasses from western Zaire. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 864-876, 1979.

FERGUSON, J. E.; CROWDER, L. V. Cytology and breeding behavior of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. **Crop Science**, Madison, v. 14, p. 893-895, 1974.

GECHEFF, K. I. A New translocation in Barley resulting in a Cytologically Marked Karyotype. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 36, 241-244, 1976.

GERLACH, W. L.; MILLER, T. E.; FLAVELL, R. B. The nucleolus organisers of diploid wheats revealed by in situ hybridisation. **Theoretical Applied Genetics**, Switzerland, v. 58, p. 97-100, 1980.

GILL, B. S.; SEARS, R. G. **The current status of chromosome analysis in wheat**. New York: Plenum, 1988. p. 299-321.

GOULD, F. W.; SODERSTROM, T. R. Chromosome numbers of some Ceylon grasses. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, p. 1075-1090, 1974.

GRISEBACH, A. Brachiaria. In: LEDEBOUR, C. F. (Ed.). **Flora rossica**. Stuttgart: Sumtibus Librariae E. Schweizerbart, 1853. v. 4, p. 469.

GRUMMT, I.; PIKAARD, C. S. Epigenetic mechanisms controlling RNA polymerase I transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 4, p. 641-649, 2003.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p.1029-1041, 2000.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.

HUANG, M. et al. Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2012.

HUTCHINSON, J.; MILLER, T. E. The nucleolar organisers of tetraploid and hexaploid wheats revealed by *in situ* hybridisation. **Theoretical Applied Genetics**, Switzerland, v. 61, p. 285-288, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>>. Acesso em: 18 jun, 2015.

JENKINS, G. et al. Strategies for the study of meiosis in rye. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 221–227, 2005.

JIANG, J. et al. A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 14210–14213, 1996.

JIANG, J. et al. A molecular view of plant centromeres. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 570–575, 2003.

KAMMACHER, P. et al. Nombres chromosomiques de graminees de Cote-d'Ivoire. **Candollea**, Geneve, v. 28, p. 191-217, 1973.

KATO, A.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 37, p. 13554–13559, 2004.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B. L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germoplasma collections. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT/Embrapa, 1996. p. 17–42.

KOO, D. H.; JIANG, J. Extraordinary tertiary constrictions of *Tripsacum dactyloides* Chromosomes: Implications for Karyotype Evolution of Polyploids Driven by segmental chromosome Losses. **Genetics**, Austin, v. 179, p. 1119–1123, 2008.

KOVARIK, A. et al. Evolution of rDNA in Nicotiana Allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics. **Annals of Botany**, London, v. 101, p. 815–823, 2008.

LAWRENCE, R. J. et al. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 13, p. 599–609, 2004.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Landskrona, v. 52, p. 201-220, 1964.

LOVE, A. Chromosome number reports. **Taxon**, Utrecht, n. 30, p. 694-708, 1981.

MEHRA, P. N. **Cytology of East Indian Grasses**. Chandigarh: P. N. Mehra, 1982.

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

MILLER, J. T. et al. Retrotransposon-related DNA sequences in the centromeres of grass chromosomes. **Genetics**, Austin, v. 150, p. 1615–1623, 1998.

MILLER, T. F.; GERLACH, W. L.; FLAVELL, B. B. Nucleolus organiser variation in wheat and rye revealed by in situ hybridisation. **Heredity**, London, v. 45, p. 377-382, 1980.

MITIDIERI, J. **Manual de gramíneas e leguminosas para pastos tropicais.** São Paulo: Nobel, 1988. 198 p.

NANI, T. F. et al. Ribosomal DNA in diploid and polyploid *Setaria* species: number, distribution and rearrangements. **Comparative Cytogenetics**, St. Petersburg, v. 9, n. 4, p. 645-660, 2015.

NEUMANN, P, et al. Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective. **Mobile DNA**, London, v. 2, p. 4, 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.

OHNUKI, Y. Structure of Chromosome. **Chromosoma**, Berlin, v. 25, p. 402-428, 1968.

PAULA, C. M. P. **Citogenômica comparativa e aspectos epigenéticos em Espécies de *Brachiaria* e híbridos interespecíficos.** 2015. 113 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramentos de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PERUZZI, L.; EROĞLU H. E. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? **Comparative Cytogenetics**, St. Petersburg, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2013.

PRESTING, G. G. et al. Ty3/gypsy retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 16, p. 721-728, 1998.

PREUSS, S.; PIKAARD, C. S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1769, n. 5/6, p. 383-392, 2007.

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. (Ed.). *Brachiaria: biology, agronomy, and improvement*. Cali: CIAT, 1996.

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 Resources and Crop Evolution**, Switzerland, v. 53, p. 7-10, 2006.

ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 12, n. 225, p. 1-13, 2012.

ROCHA, L. C. et al. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, New York, v. 252, n. 2, p. 451-60, 2015.

SANTOS, F. C. et al. Chromosome distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. **Chromosome Research**, Oxford, Sept. 2015. Disponível em: <https://molcyt.files.wordpress.com/2015/09/brachiaria_fabiola_authorversion.pdf>. Acesso em: 22 out. 2015.

SHARMA, A.; GERNOT, G. Presting evolution of centromeric retrotransposons in grasses. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 6, p. 1335-1352, 2014.

SHARMA, A.; PRESTING, G. G. Centromeric retrotransposon lineages predate the maize/rice divergence and differ in abundance and activity. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 279, p. 133-147, 2008.

SINHA, R. R. P.; JHA, R. P. Cytological studies in some grasses of Bihar. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, Bangalore, v. 59, p. 352-353, 1972.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. New York: W. H. Freeman, 1981.

SOTOMAYOR-ROS, A.; SCHANK, S. C.; WOODBURY, R. Cytology and taxonomic description of two *Brachiaria* (Congograss and Tannergrass). **Journal Agriculture of the University of Puerto Rico**, San Juan, v. 54, p. 390-400, 1970.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: E. Arnold, 1971.

STEBBINS, G. L. Longevity habitat, and release of genetic variability in the higher plants. Cold Spring Harbor Symp. **Cold Spring harbor symposia on quantitative biology**, New York, n. 23, p. 365-378, 1958.

TAKETA, S. et al. Ancestry of American Polyploid *Hordeum* Species with the I Genome Inferred from 5S and 18S–25S rDNA. **Annals of Botany**, London, v. 96, p. 23–33, 2005.

TATEOKA, T. Chromosome numbers of East African grasses. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 52, p. 864-869, 1965.

TIMBÓ, A. L. O. et al. Obtaining tetraploid plants of ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 3, p. 127-131, 2014.

TRINIUS, C. B. *Panicarum* genera. **Mémoires de l'Academie Imperiale des Sciences de Saint-Petersbourg**, Saint-Petersbourg, v. 6, n. 3, p. 194, 1834.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. H.; JANK, L. Pachytene chromosome of *Brachiaria ruziziensis*. Ger. Et Evrad. **Plant Breeding**, Berlin, v. 78, p. 75-78, 1987.

VAUGHAN, H. E. et al. Loss of nucleolar organizer regions during polyploid evolution in *Scilla autumnalis*. **Heredity**, London, v. 71, p. 574-580, 1993.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of perennial oats (Poaceae: Aveneae Botanical). **Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, p. 193–210, 2007.

WOLFGRUBER, T. K. et al. Maize centromere structure and evolution: sequence analysis of centromeres 2 and 5 reveals dynamic Loci shaped primarily by retrotransposons. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 5, n. 11, 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000743>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

ZUO, L.; YUAN, Q. The difference between the heterogeneity of the centromeric index and intrachromosomal asymmetry. **Plant Systematic and Evolution**, Switzerland, v. 297, p. 141-145, 2011.

Artigo 2

Localização de genes conservados em espécies de *Brachiaria* spp.

RESUMO

Sequências de DNA repetitivo têm sido amplamente utilizadas em análises citogenéticas. O uso de sequências de genes de baixo número de cópias, no entanto, é pouco explorado principalmente em plantas. Até o momento, o detalhamento cariotípico em *Brachiaria* spp. se limita à localização de sítios de DNAr. O desafio reside no desenvolvimento de novas sondas, baseadas em dados incompletos de sequenciamento no gênero ou de sequenciamento completo de espécies afins, uma vez que em *Brachiaria* spp. ainda não há uma espécie modelo com o genoma sequenciado. O presente trabalho teve por objetivo a localização física de genes conservados nos cromossomos de *Brachiaria ruziziensis*, *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens* utilizando-se dados de RNAseq e de sequenciamento de *Setaria italica* e *Sorghum bicolor* por meio da técnica de FISH. Dentre, aproximadamente, 90 sequências selecionadas, cinco geraram clusters nos cromossomos das espécies de *Brachiaria* estudadas. Foram identificados genes em sintonia com os sítios de DNAr 5S e 45S, o que contribuiu para a identificação dos pares cromossômicos portadores de alguns desses genes. As espécies de *Brachiaria* estudadas apresentam alguns cromossomos com segmentos em sintonia conservados. O uso de dados de sequenciamento genômico é de fundamental importância para o enriquecimento de análises citogenéticas.

Palavras chave: Forrageiras. Genes de cópia única. FISH. Citogenética molecular.

ABSTRACT

Repetitive DNA sequences have been widely used in cytogenetic analysis. However, the use of low copy number genes is underexplored in plant species. To date, the karyotypic study of *Brachiaria* spp. is limited to the location of rDNA sites. The challenge is developing new probes based on incomplete sequencing data of *Brachiaria* species, or based on complete sequencing of related species from different genera, since *Brachiaria* does not have a species with a full genome sequenced. This work aimed to identify the physical locations of conserved genes in *Brachiaria ruziziensis*, *Brachiaria brizantha* and *Brachiaria decumbens* using RNAseq and sequencing data from *Setaria italica* and *Sorghum bicolor*. Sequences of interest were then used to perform FISH on the three *Brachiaria* species. From 90 selected sequences, five sequences generated clusters of signals in the chromosomes of the *Brachiaria* species analyzed in the present work. Some of the genes have been identified in synteny, which was useful for the identification of several chromosome pairs. The *Brachiaria* species studied have some chromosomes with conserved syntenic segments of DNA. The use of genomic sequencing data has great importance for the enrichment of cytogenetic analysis.

Key words: Forage. Single copy genes. FISH. Molecular cytogenetics.

1 INTRODUÇÃO

Mapas citogenéticos são compostos comumente por marcas centroméricas, teloméricas, de heterocromatina e de DNA ribossomais. Com o advento era genômica, esses mapas permitiram agregar informações no que diz respeito à organização molecular e citológica, como também à organização do genoma em nível cromossômico (WANG; HARPER; CANDE, 2006). Parte do sucesso da construção de mapas físicos se deve ao detalhamento dos cromossomos cada vez mais criterioso com a localização de genes de baixo número de cópias ou de cópia única (DONG, QUICK, 1995; FRANSZ et al., 1996; HUANG; HAHLBROCK; SOMSSICH, 1988; LAMB et al., 2007).

A localização cromossômica de pequenas sequências de DNA é mais facilmente reproduzida em espécies de mamíferos (GERHARD et al., 1981; HARPER; MARSELLE, 1985; HARPER; ULLRICH; SAUNDERS, 1981; HENRY; HENG; TSUI, 1992; LAWRENCE; VILLNAVE; SINGER, 1988). Em cromossomos de plantas, no entanto, a localização de genes de cópia única é dificultada devido à presença da parede celular, que confere muitas vezes uma barreira para as sondas (FRANSZ et al., 1996; HUANG; HAHLBROCK; SOMSSICH, 1988; JIANG et al, 1995; LAMB et al., 2007; LEHFER et al., 1993). Outros fatores também podem contribuir para o atraso no desenvolvimento desse tipo de análise, o que faz com que a construção de cariótipos em plantas seja uma tarefa mais dispendiosa, como a pronunciada condensação dos cromossomos quando comparada com cromossomos de mamífero (GREILHUBER, 1977), alta taxa de polimorfismos em plantas (SCHUBERT; RIEGER; DÖBEL, 1984), além da alta proporção de DNA altamente repetitivo em plantas comparada ao DNA de animais (MEHROTRA; GOYAL, 2014).

A primeira tentativa em se localizar genes de cópia única em cromossomos de plantas usando hibridização *in situ* foi realizada em *Petroselinum crispum* (Miller, 1768) Mansfeld 1939 (salsa) por Huang, Hahlbrock e Somssich (1988) com a identificação do locus para o gene Chalcona Sintase (CHS).

Em gramíneas, os exemplos mais conhecidos são em arroz e milho. Sequências desde 1,29 a 399 kb de tamanho foram localizadas em cromossomos de arroz (OHMIDO; AKIYAMA, Y.; FUKUI, 1998). Em milho sondas de 4 kb detectaram sítios em núcleos interfásicos (JIANG et al., 1995). Em cromossomos paquitênicos da espécie, a sonda relacionada ao marcador molecular (umc105a) para a resistência à broca da cana contribuiu para o detalhamento do mapa físico do par cromossômico 9. Em cromossomos metafásicos também em milho, dados públicos de sequenciamento foram utilizados para o desenvolvimento de uma coleção de sondas que permitiram a diferenciação de todos os cromossomos individualmente (LAMB et al., 2007).

A caracterização de cromossomos em espécies de *Brachiaria* foi realizada utilizando-se recursos de citogenética convencional (BERNINI e MARIN-MORALES, 2001), além de sondas de sequências de DNA altamente repetitivo como as de DNAr (AKIYAMA; AKIYAMA-YAMADA; EBINA, 2010; NIELEN et al., 2010; NANI, 2015, p. 41) e de retrotransposons centroméricos do tipo CRM (NANI, 2015, p. 41; SANTOS et al., 2015). Apesar dos avanços já obtidos com estudos de citogenética molecular em *Brachiaria* spp., o mapa físico cromossômico das espécies do gênero ainda é incompleto. O tamanho reduzido e a similaridade morfológica dos cromossomos associado a condensação tardia das regiões terminais, constituem limitações para a identificação precisa dos cromossomos.

A localização de sequências nos cromossomos pode estar atrelada ao uso de dados de sequenciamento genômico. Contudo, a busca por sequências

candidatas a sonda, muitas vezes, é realizada com base em banco de dados de espécies afins por dois motivos: quando o sequenciamento da espécie em interesse ainda não foi realizado, ou quando o genoma é, em sua maior parte, composto por elementos repetitivos. Nesse último caso, muitas das sequências selecionadas poderiam ser homólogas a diversas regiões do cromossomo, ou até mesmo de vários ou todos os cromossomos, assim, a busca por marcas específicas seria uma prática extremamente laboriosa.

Apesar da importância econômica de espécies de *Brachiaria* (Trinius, 1826) Grisebach, 1853, o mapa físico cromossômico se limita ao uso de sequências altamente repetitivas como as de DNA ribossomais e de retrotransposons centroméricos (CRs) (NANI, 2015, p. 41). Pelo fato de o gênero ainda não possuir uma espécie modelo de genoma totalmente sequenciado, o estudo de localização de outros tipos de genes se limita ao uso de dados de sequenciamento de espécies taxonomicamente relacionadas. Os genomas de *Setaria italica* (Linnaeus, 1753) Beauvois, 1812) (BENNETZEN et al., 2012) e *Sorghum bicolor* (Linnaeus, 1771) Moench, 1794) (PATERSON et al., 2009), por serem espécies de genoma sequenciado e taxonomicamente mais próximas as de *Brachiaria* spp. (GIUSSANI et al., 2001), podem ser utilizados como ponto de partida para a busca de genes conservados.

A identificação da posição gênica em cromossomos de espécies de *Brachiaria* pode contribuir para trabalhos evolutivos com o detalhamento cariotípico, ou ainda sobre a atividade de elementos transponíveis, e futuramente pode oferecer subsídios também para trabalhos de melhoramento visando à inserção de genes no genoma das espécies do gênero.

Nesse estudo foram feitas abordagens sobre sequências que podem ser utilizadas como sondas que marcam cromossomos em específico em espécies de *Brachiaria*, como *Brachiaria ruziziensis* Germain, Evrard, 1953, *Brachiaria brizantha* (Hochstetter, Richard, 1851) Stapf, 1919, e *Brachiaria decumbens*

Stapf, 1919 tomando como base dados de RNAseq de *Brachiaria brizantha* e de sequenciamento de especies afins como *Setaria italica* e *Sorghum bicolor*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como objeto de estudo as espécies *B. brizantha* cultivar Marandú ($2n = 4x = 36$), *B. decumbens* cultivar Basilisk ($2n = 4x = 36$) e *B. ruziziensis* cv. Kennedy ($2n = 2x = 18$). Sementes de *Brachiaria* spp. foram cedidas pela EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. A seleção de sequências candidatas a sonda foi baseada em banco de dados de sequenciamento de *Setaria italica* e *Sorghum bicolor* e de RNAseq de *B. brizantha*.

2.1 Seleção de sequências candidatas a sonda

A partir de um conjunto de genes ortólogos sintenticamente conservados entre *Setaria italica* e *Sorghum bicolor* (SCHNABLE; FREELING; LYONS, 2012), e por meio da ferramenta SynMap disponível no banco de dados CoGe (Accelerating Comparative Genomics) (LYONS et al., 2008) foi selecionado um subconjunto de genes que fazem parte de um cluster gênico com pelo menos 7 cópias em tandem em ambas as espécies, uma vez que muitas sequências candidatas a sonda tinham tamanho muito reduzido o que impossibilitaria a identificação de sinais das sequências isoladas por meio de técnicas citogenéticas. Para cada parte conservada do grupo de genes, sequências similares de *B. brizantha* (Tabela 1 - informação suplementar) foram identificadas a partir de uma montagem do transcriptoma da espécie com ~ 20M

reads de uma única biblioteca de RNA-seq obtida por meio de RNA extraído de tecido de folhas maduras da espécie. A construção da biblioteca de RNA-seq foi feita pelos métodos descritos por Wang et al. (2011), e para montagem do transcriptoma foi utilizado o software Trinity (GRABHERR et al., 2011). Os dados da biblioteca de RNA-seq podem ser acessados em: <http://de.iplantcollaborative.org/dl/ad01a1c9-ec58-4850-9170-5d42b245aa11>. Cada sequência selecionada recebeu um código para melhor organização dos dados (Tabela 1 - informação suplementar).

Além disso, foram selecionados genes de função conhecida ou suposta em *Setaria italica* e *Sorghum bicolor*, cujas sequências estavam depositadas em Bancos de dados como NCBI (National Center for Biotechnology Information) ou Phytosome (Tabela 2 – informação suplementar). Como critério de seleção, as sequências deveriam apresentar tamanho aproximado ao de 4 Kb, ou em caso de tamanho inferior, cópias repetidas em tandem. A verificação da similaridade entre as sequências conservadas entre as espécies supracitadas foi realizada por meio da ferramenta de BLAST do banco de dados NCBI e os detalhes da similaridade entre as sequências foram verificados por meio das ferramentas do software DNASTAR.

Primers para a amplificação das sequências selecionadas foram desenhados para regiões que apresentavam ser altamente conservadas entre as sequências do gene em *Setaria italica*, *Sorghum bicolor* e/ou *B. brizantha*, por meio das ferramentas disponíveis no website PRIMER3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e a verificação sobre a possibilidade de formação de grampos ou dímeros de primers foi realizada por meio da ferramenta online OligoCalc (KIBBE, 2007). As sequências utilizadas como base para o desenho de primers foram as provenientes do transcriptoma de *B. brizantha*, e para o caso de genes conservados de sequência conhecida/suposta, o genoma de *Setaria italica*.

2.2 Preparo de sondas

Para a extração de DNA genômico de *Setaria italica* e *B. brizantha* foram coletadas folhas jovens de três genótipos de cada espécie. Aproximadamente 0,5g de cada amostra foram maceradas separadamente com auxílio de gral, pistilo e nitrogênio líquido. O tecido macerado foi colocado em tubos de 2 ml no qual foram adicionados 700 µL de tampão de extração Uréia. Os tubos foram agitados e mantidos a 37° C por 15 min. sob agitação (150 rpm). Em seguida adicionou-se 750 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamil (25:24:1) às amostras, as quais foram agitadas por 30 seg. no vortex e mantidas sob agitação por 15 min. a 37°C. Seguiu-se a centrifugação por 10 min. a 11.000 rpm, removeu-se o sobrenadante ao qual adicionou-se 70,3 µL de acetato de sódio e 700 µL de isopropanol, agitando-se gentilmente. Centrifugação por 3 min. a 13.000 rpm para a separação do DNA precipitado.

A amplificação das sequências provenientes dos dados de RNAseq foi realizada em um volume de 10 µL de reação contendo 10 ng de DNA genômico de *B. brizantha*, 2 µL do par de primers (forward e reverse) específico para cada sequência (Tabela 1 – informação suplementar), 5 µL de JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix e o volume completado com água miliq.

As condições de amplificação programadas no termociclador foram de 94° C por 3 min.; 35 ciclos de 94° C por 20 seg., 60° C por 20 seg., extensão a 72° C por 1 a 2:45 min. (variável dependendo do tamanho da sequência a ser amplificada), e finalização à 72° C por 10 min.

A amplificação das sequências de genes conservados de função conhecida ou suposta provenientes do banco de dados phytozome foi realizada em um volume de 20 µL de reação contendo 25 ng de DNA genômico de *Setaria italica*, 3 µL do par de primers (forward e reverse) específico para cada

sequência (Tabela 2 - informação suplementar), 0,2 µL de Phusion High-Fidelity DNA polimerase (Thermo Scientific), 4 µL tampão HF Phusion 5x, 0,4 µL dNTPs 10 mM e o volume completado com água miliq.

A programação da reação em termociclador foi de 98° C por 30 seg., 35 ciclos de 98° C por 10 seg., 58° C por 30 seg., extensão a 72° C por 2:30 min. e finalização à 72° C por 10 min.

Os produtos de PCR foram verificados por meio de eletroforese de gel de agarose (1%) por 60 min. a 100 V. As reações positivas das sequências foram repetidas em 400 µL de mix com as mesmas proporções dos componentes da reação de PCR. Os produtos da PCR foram separados por meio de gel de agarose (1%). As bandas obtidas foram extraídas do gel, purificadas por meio do Kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen®) o DNA resultante deste processo foi marcado por meio de reação “nicktranslation” padrão. A reação foi feita em 22,9 µL de mix contendo 2 µL de tampão de reação 10 x; 2 µg de DNA; 2 µL nucleotídeos não marcados (dCTP, dGTP, dTTP, 2 mM cada); nucleotídeos marcados Texas-red-5-dATP 1 mM (Invitrogen); 0,4 µL de DNase (100 mU/µL) e 8 µL de DNA Polimerase I (10 U/µL), a 15° C por 2 h. Após a reação foram adicionados 2 µL de tampão de parada (0,5 M EDTA, pH 8,0). As sondas passaram pela etapa de purificação na coluna de Bio-Gel P-60 e posteriormente o DNA resultante foi precipitado com 30 µg de DNA de esperma de salmão (10 mg/ml), 2,5 volumes de solução de álcool 90% e acetato de sódio (3 M, pH 5,2) à -20° C overnight. Posteriormente as sondas foram centrifugadas a 16.000 rcf por 30 min. O sobrenadante foi descartado, o pelet foi lavado com álcool 70 %, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 10 µL de tampão SSC 2 x, TE 1 x (pH 7,6) para a concentração final da sonda de 200 ng/µL. Como controle positivo foram utilizadas sondas de DNAr 45S (clone: NOR-173) e 5S (clone 2-3-3) e de CRM1 marcada com Fluoresceína-dCTP e/ou Texas-red-5-dATP

(1mM, Invitrogen) preparadas de acordo com Kato, Lamb e Birchler (2004). As sondas foram armazenadas à -20° C protegidas da luz até o momento de uso.

2.3 Coleta de material biológico e preparo de lâminas

Pontas de raízes das espécies de *Brachiaria* foram tratadas com colchicina 0,1% por 4 h a 0-4° C para o bloqueio de ciclo celular. Posteriormente o material biológico foi fixado em ácido acético 90% por 10 min. e armazenado em álcool 70% a 4° C até o momento de uso.

No preparo de lâminas, pontas de raiz foram mantidas em água por 15 min. e posteriormente em tampão citrato fosfato por 15 min. A região meristemática foi extraída e colocada em solução enzimática com 40 µL de celulase: pectinase (200u:100u) e 5 µL de pectoliase (5%) por 1 h a temperatura de 37° C. Em seguida, o material foi lavado em álcool 70% e macerado em 20µL de solução contendo ácido acético glacial e metanol (9:1). Finalmente, 6µL da suspensão celular foram gotejados em uma lâmina a qual foi mantida em câmara úmida até que as células fossem espalhadas.

As lâminas que continham metáfases completas com cromossomos espalhados foram submetidas à luz ultravioleta por 1 min. (cross-link) e utilizadas imediatamente na etapa de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

2.4 Hibridização *in situ* Fluorescente

A mistura de hibridização foi feita com 0,5 µL de sonda dos genes selecionados (uma por vez), 0,5 µL de sonda de DNAr 45S e 5S, 0,5 µL de sonda de CRM1 e o volume foi completado para 8 µL com 2 x SSC, 1 x TE.

A desnaturação do DNA cromossômico e da sonda foi realizada simultaneamente. Desta forma, a mistura de sonda foi gotejada sobre o material

na lâmina e em seguida coberta com uma lamínula de plástico. Posteriormente a lâmina foi colocada em um suporte de alumínio coberto, o qual foi submetido à temperatura de 100° C em banho Maria, por 5 min.

As lâminas foram mantidas à temperatura de 55° C, em câmara úmida, overnight, para a hibridização da sonda nos cromossomos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com SSC 2 x à 55° C por 20 min. e foram montadas com Vectashield com DAPI para posterior análise.

As sequências que geraram sinal nos cromossomos de espécies de *Brachiaria* foram clonadas utilizando vetor 2.1 TOPO®TA (Cloning® Kits Invitrogen).

As imagens foram capturadas por meio do sistema Applied Spectral Imaging (ASI) com câmera equipada com dispositivo cooled charge-coupled/Cool- 1300QS acoplada ao microscópio Olympus BX61e. Imagens foram processadas com auxílio do software Photoshop CS6.

A identificação dos pares cromossômicos portadores dos sítios das sequências selecionadas e o detalhamento do idiograma nas espécies de *Brachiaria* estudadas no presente trabalho foram realizados com base no cariograma/idiograma elaborado por Nani (2015, p. 41).

3 RESULTADOS

A maior parte dos genes selecionados da biblioteca de RNAseq (Tabela 1-Suplementar) apresentou sinais espalhados ao longo de todos ou quase todos os cromossomos das espécies estudadas. Contudo, alguns clusters desses genes foram verificados (Tabela 1). O gel de eletroforese mostrou o tamanho dos

segmentos de DNA amplificados a partir do DNA genômico de *B. brizantha* (Figura 1).

Tabela 1 Sequências selecionadas que apresentaram sinais nos cromossomos de espécies de *Brachiaria*

Nome da sequência	DNA genômico	Código da sequência	Banco de dados
Adh1	<i>Setaria italica</i>	Setaria: XM_004979060.1 Sorgo: XM_002449348.1	NCBI
5E	<i>B.brizantha</i>	U_b_comp4718_c0_seq1	CoGe
11A		U_b_comp2908_c0_seq1	
27A		U_b_comp762_c0_seq1	
7A		U_b_comp12506_c0_seq1	

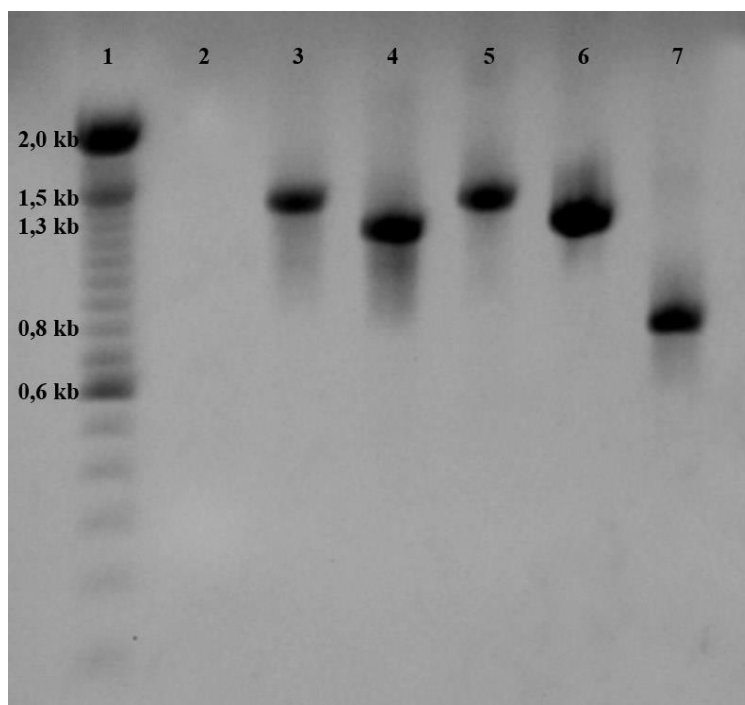


Figura 1 Eletroforese em gel de agarose a 1% com 5 μ L de produtos de PCR da amplificação de fragmentos dos genes selecionados (DNA genômico de *Brachiaria brizantha*). 1- Marcador de DNA de 100 pb. 2- Controle negativo. 3- Gene ADH1. 4- Gene 5E. 5- Gene 7A. 6- Gene 11A. 7- Gene 27A

Sinais do gene 11A foram identificados em *B. ruzizensis* na posição distal no braço longo de quatro cromossomos, sendo dois em par cromossômico não identificado e outros dois no par cromossômico 8 em sintenia com os sinais de DNAr 45S (Figuras 2C e 3A). Os sinais do gene 27A estavam localizados na posição intersticial do braço curto de dois cromossomos não identificados (Figura 2D).

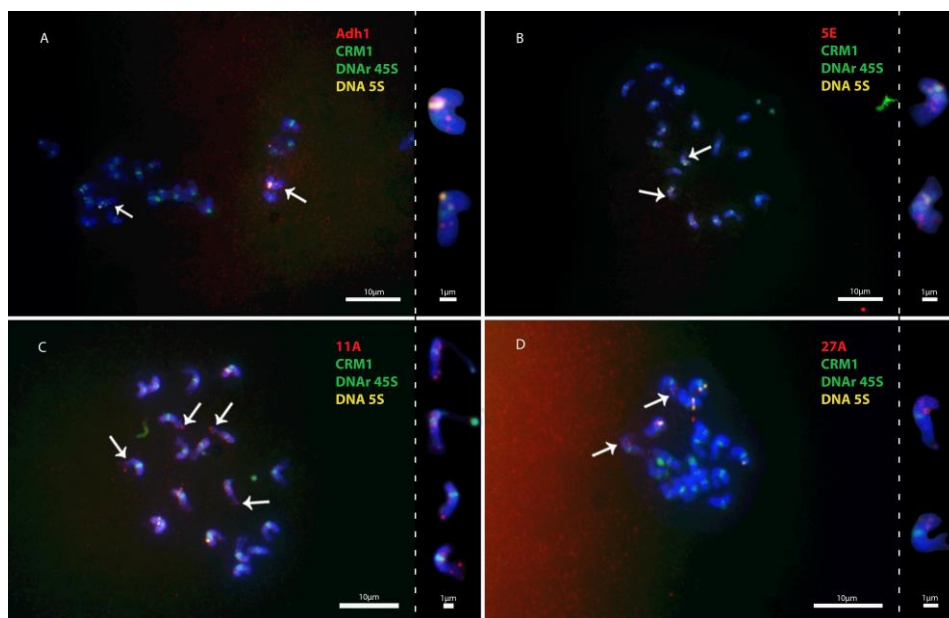


Figura 2 Sinais das sequências selecionadas em cromossomos de *Brachiaria ruzizensis*. A-Gene ADH1; B-Gene 5E; C-Gene 11A; D-Gene 27A. À direita, cromossomos portadores de sinal em destaque. Setas indicam o posicionamento dos sítios dos genes conservados (em vermelho). Em amarelo, sítios de DNAr 5S, e em verde, sítios de DNAr 45S (sinais terminais) e de CRM1 (sinais centroméricos)

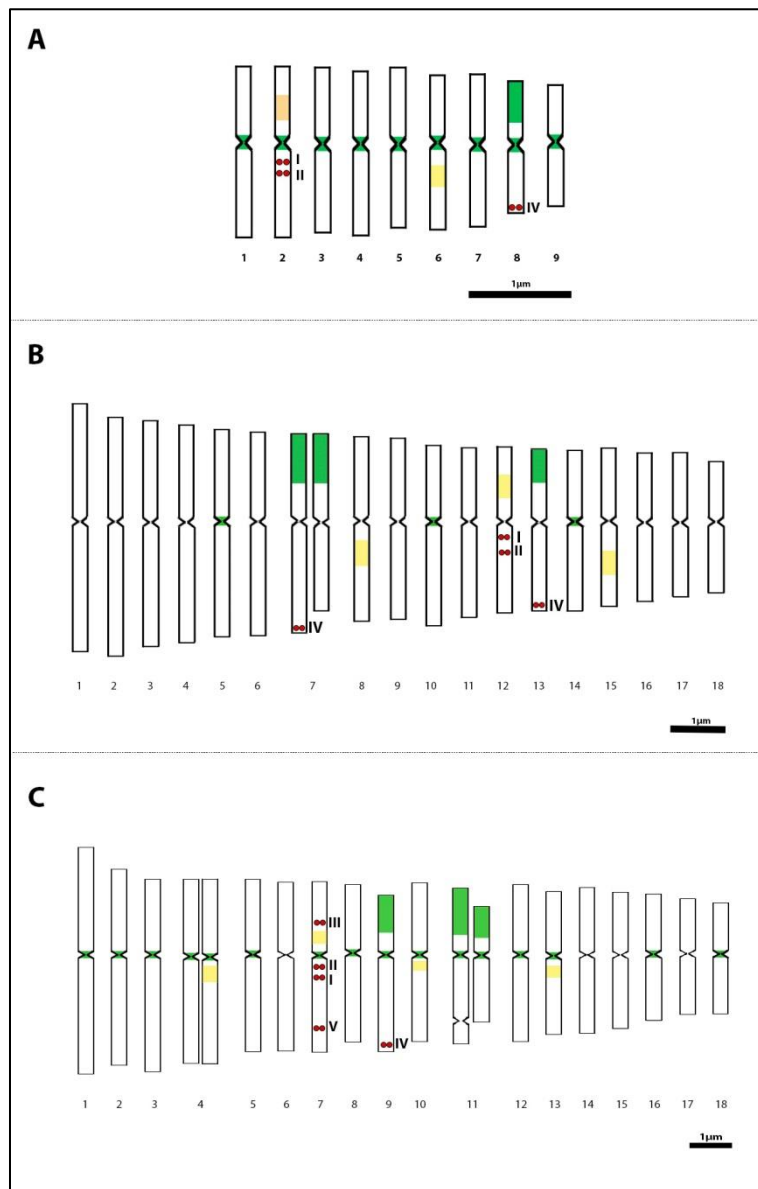


Figura 3 Idiograma com a localização de genes em cromossomos de espécies de *Brachiaria*. A) *Brachiaria ruziziensis*. B) *Brachiaria brizantha*. C) *Brachiaria decumbens*. I=ADH1; II= gene 5E; III= gene 7A; IV= gene 11A; V= gene 27A. Em verde, sinais centroméricos - CRM1, sinais distais - DNAr 45S. Em amarelo, sinais de DNAr 5S. Em vermelho, sinais de genes de cópia única/baixo número de cópia. Fonte: Adaptado de Nani (2015, p. 41)

A sintonia do gene ADH1 com o sítio de rDNA 5S também foi verificada em *B. brizantha* (par 12) (Figuras 4A e 3B) e *B. decumbens* (par 7) (Figura 5A e 3C). A identificação desses pares foi possível por serem os que apresentaram sinal de DNAr 5S no braço curto. Dois sinais extras de ADH1 estavam em localização intestinal no braço curto de pares cromossômicos não identificados em *B. brizantha* (Figura 4A) e *B. decumbens* (Figura 5A).

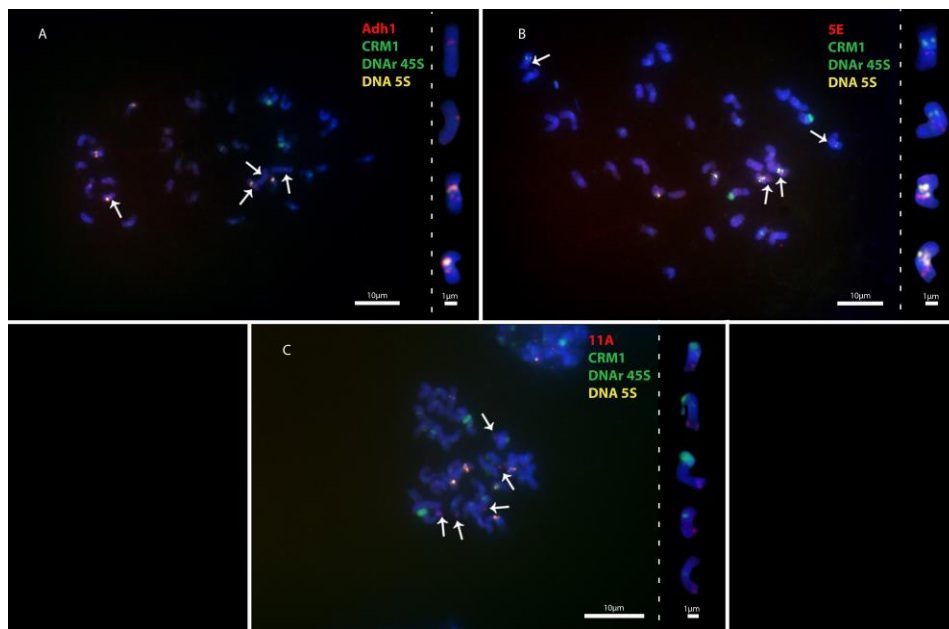


Figura 4 Sinais das seqüências selecionadas em cromossomos de *Brachiaria brizantha*. A-Gene ADH1; B-Gene 5E; C-Gene11A. À direita, cromossomos portadores de sinal em destaque. Setas indicam o posicionamento dos sítios dos genes conservados (em vermelho). Em amarelo, sítios de DNAr 5S, e em verde, sítios de DNAr 45S (sinais terminais) e de CRM1 (sinais centroméricos)

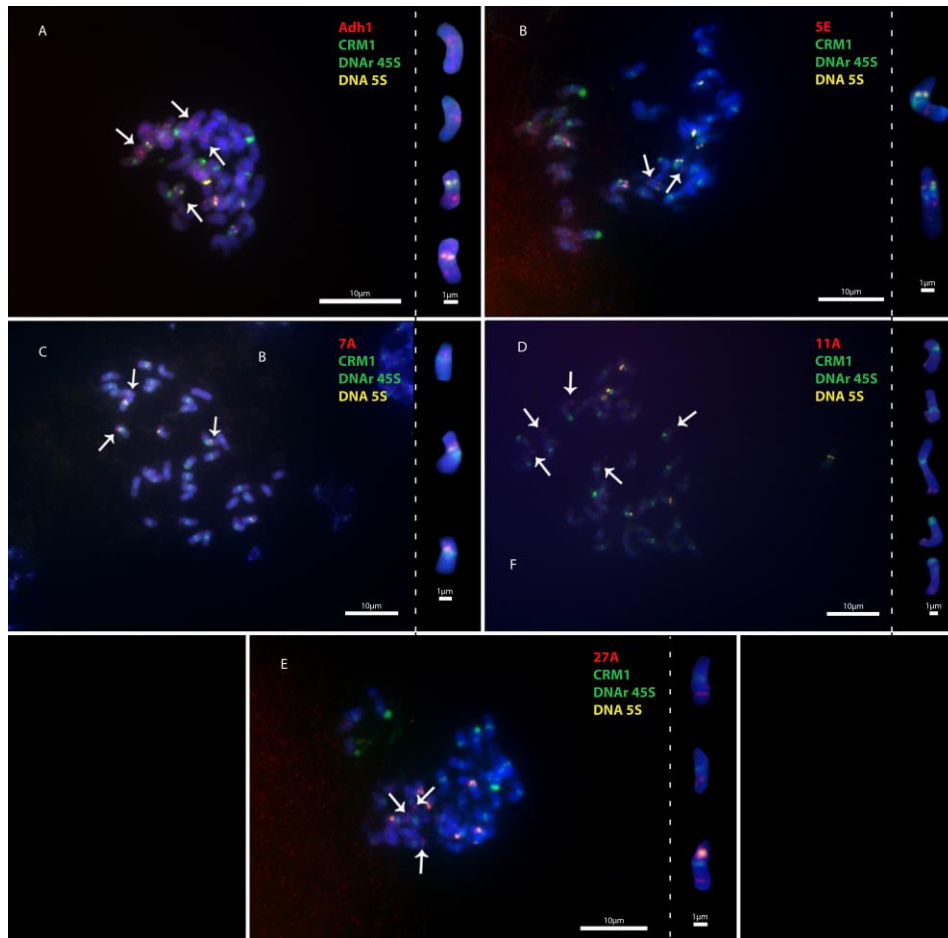


Figura 5 Sinais das seqüências selecionadas em cromossomos de *Brachiaria decumbens*. A-Gene ADH1; B-Gene 5E; C-Gene7A. D-Gene11A; E-Gene 27A. À direita, cromossomos portadores de sinal em destaque. Setas indicam o posicionamento dos sítios dos genes conservados (em vermelho). Em amarelo, sítios de DNAr 5S, e em verde, sítios de DNAr 45S (sinais terminais) e de CRM1 (sinais centroméricos)

Em *B. brizantha*, sítios do gene 5E em sintenia com o sítio de DNAr 5S foram localizados intersticialmente no braço longo do par cromossômico 12 (Figura 4B e 3B), uma vez que é o único par portador do sítio de DNAr 5S localizado no braço curto. O segundo par de sinais do gene 5E foi localizado intersticialmente no braço longo do par cromossômico não identificado.

A espécie também apresentou sinais do gene 11A posicionados na região distal do braço longo de cinco cromossomos, dois deles em par cromossômico não identificado e três dos sinais em cromossomos portadores de DNAr 45S (Figura 4C e 3B). Os cromossomos de tamanho inferior com sinais sintênicos provavelmente são do par 13 (Figuras 4C e 3B). O cromossomo de maior comprimento portador dos sítios de DNAr 45S é pertencente ao par 7, o qual está em estado hemizigoto para o gene 11A (Figuras 4C e 3B).

Em *B. decumbens*, sítios do gene 5E foram identificados no braço longo em posição proximal no par cromossômico 7, e assim como em *B. ruziziensis* e *B. brizantha*, em sintenia com o sítio de DNAr 5S (Figuras 5B e 3C). Sítios do gene 7A foram identificados no braço curto posicionados na região proximal de três cromossomos, sendo dois sintênicos com sítios de DNAr 5S, o qual está posicionado no braço curto, identificado como par cromossômico 7 (Figuras 5C e 3C). Cinco loci do gene 11A estavam localizados na posição distal, distribuídos em cinco cromossomos, sendo dois portadores também de DNAr 45S (Figura 5D). Aparentemente, trata-se do par cromossômico 9, uma vez que não há assimetria entre os cromossomos homólogos, como ocorre no par 11 (Figuras 5D e 3C).

O gene 27A foi encontrado na posição intersticial do braço longo em três cromossomos. Um dos sinais se encontra em um dos homólogos do par 7, pois também é portador do locus de DNAr 5S no braço curto (Figuras 5E e 3C).

4 DISCUSSÃO

4.1 Localização de genes de cópia única/baixo número de cópias

Sondas utilizadas em estudos citogenéticos são geralmente baseadas em genes altamente conservados. Desta forma é provável que sondas de genes de cópia única podem ser usadas também em espécies até mesmo não estreitamente relacionadas (LAMB et al., 2007). A família Poaceae Barnhart, 1895 é dividida em dois clados. Espécies do gênero *Brachiaria* juntamente com espécies de *Setaria* Beauvois, 1812 e parte das espécies de *Panicum* Linnaeus, 1929 e *Pennisetum* Richard, 1805 fazem parte do clado Paniceae Reichenbach, 1828. Sorgo e milho por sua vez, compõem o clado Andropogoneae Dumortier, 1824 (GIUSSANI et al., 2001).

As sequências candidatas a sonda no presente trabalho foram selecionadas conforme a capacidade de formar clusters em *Setaria italica* e *Sorghum bicolor* e a similiaridade dessas espécies com as sequências de *B. brizantha*. Cinco das sequências selecionadas formaram clusters nos cromossomos de *Brachiaria* spp. (Tabela 1). O fato de apenas uma pequena parte delas ter sido capaz de gerar sinais por meio da técnica de FISH não exclui o fato de essas espécies serem relacionadas. As sequências que não geraram sinais detectáveis nas espécies de *Brachiaria* podem possuir similaridade genética entre as espécies de diferentes gêneros, contudo tratam-se de sequências dispersas no genoma de *Brachiaria* spp.

Em milho, sondas que hibridizam todos os cromossomos também foram consideradas inadequadas para o desenvolvimento de mapas físicos, uma vez que eram compostas por sequências de DNA repetitivo (LAMB; BIRCHLER, 2006; LAMB et al., 2007). A montagem do genoma parcial de *B. ruziziensis*

sequenciado por meio da plataforma Illumina por Silva et al. (2013) mostrou diferença entre o tamanho esperado do genoma e o obtido. Os autores relacionaram o aumento do genoma com alta frequência de sequências repetitivas.

O gene ADH1 foi o que se apresentou mais conservado, uma vez que foi isolado do genoma de *Setaria italica*, e gerou sinais nas três espécies avaliadas de *Brachiaria*. O referido gene foi encontrado nos mesmos cromossomos portadores de sítios de DNAr 5S e do gene 5E. Os cromossomos 2, 12 e 7, respectivamente para *B. ruziziensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens*, apresentam similaridades quanto à sintenia desses sítios, o que representa a conservação desse segmento nos cromossomos desse grupo de espécies. Sintenia entre loci também foi verificada para o sítio de DNAr 45S e sítio do gene 11A nas três espécies avaliadas. Os pares cromossômicos 8 de *B. ruziziensis*, 7 e 13 de *B. brizantha* e 9 *B. decumbens* apresentam esses segmentos conservados.

Essas observações indicam que a poliploidização natural de *B. brizantha* e *B. decumbens* manteve determinados segmentos conservados em alguns cromossomos, o que pode ser verificado pela constância da sintenia entre loci para as espécies estudadas. A origem do genoma de espécies do gênero *Brachiaria* ainda não foi completamente elucidada, contudo sabe-se que os genomas são afins (PAULA, 2015) e que a alopoliploidia segmental está presente no gênero (MENDES et al., 2006; PAULA, 2015). Segundo Sumner (2008), a ordem de genes pode ser conservada entre as espécies sem ocorrência de rearranjos ou inserção de segmentos e, nesse caso, a sintenia é conservada, evento verificado para esses genes nos genótipos de *Brachiaria* avaliados.

A proposta de posição dos referidos genes nos cromossomos das espécies de *Brachiaria* avaliadas tem como referência dados de comprimento cromossômico, posição de centrômero e de sítios de DNAr. *B. ruzizienses* e *B. decumbens* não apresentaram variação cariotípica intraespecífica para os sítios

de DNAr. Contudo, para *B. brizantha* foi observada mobilidade de sítios de DNAr (NANI, 2015, p. 41), que pode interferir também no posicionamento de outros genes nos cromossomos da espécie. A detecção de regiões cromossômicas adicionais permitirá melhor compreensão do comportamento cromossômico em *B. brizantha*.

Genes que conferem resistência (SMITH et al., 2004; WEBB et al., 2002), que codificam armazenamento (WOO et al., 2001), ou proteínas da parede celular (WU et al., 2001) também são exemplos que contribuíram para detalhamento de mapas físicos de cromossomos de plantas. Em *Brachiaria* spp., dos genes conservados provenientes de *Setaria italica* e *Sorghum bicolor*, apenas ADH1 gerou sinais detectáveis. Os demais genes conservados podem ter sofrido pequenos rearranjos no processo de diversificação das espécies de gramíneas ou não apresentam o número de repetições detectáveis pela técnica de FISH.

Segundo Abrouk et al. (2010), projetos de sequenciamento de espécies de gramíneas e leguminosas que já foram realizados, bem como os que ainda não foram concluídos poderão contribuir para o refinamento de análises de grau de colinearidade entre o genoma de plantas e assim entender melhor o caminho evolutivo que levou a diversificação das espécies de plantas.

O detalhamento do idiograma das espécies de *Brachiaria* sugere também a ocorrência de quebra devido a ausência de sinal do gene 11A em um dos cromossomos homólogos do par 7 em *B. brizantha*.

A localização de genes em espécies de plantas é complexa, entretanto das espécies pertencentes à família Poaceae, *Zea mays* Linnaeus, 1753 teve o desenvolvimento de mapas físico intensamente explorado. Lamb et al. (2007) foram capazes de detalhar o cariótipo da espécie com sondas que indicaram a localização de genes de baixo número de cópias ou genes de cópia única em cromossomos de diversas linhagens. Transposons do tipo En/Spm, Ac-Ds, e

MuDR/Um, além de sua atividade, já foram descritos em três linhas puras (YU et al., 2007). Nos trabalhos de Song e Messing (2003) e Brunner et al. (2005), estudos com genes de cópia única permitiram detectar variação de sequências entre diferentes linhas puras que em trabalhos posteriores foi relacionada ao grande número de elementos transponíveis no genoma, como os HELITRONS, que podem capturar e mover fragmentos de gene (GUPTA et al., 2005; LAI et al., 2005; MORGANTE et al., 2005). Para regiões homólogas de diferentes linhagens, genes que são colineares com regiões ortólogas em arroz, não foram detectadas diferenças de posicionamento gênico entre variedades. Esses resultados sugerem que muitos dos polimorfismos que envolvem a posição de genes em milho envolvem genes não funcionais ou fragmentos deles (LAI et al., 2005).

É notável que o mapeamento físico dos cromossomos de milho subsidiou trabalhos de aplicação direta ao melhoramento de plantas. A capacidade de identificar cromossomos em qualquer planta da espécie também auxilia o entendimento do comportamento do genoma, das consequências de transgenes, novas inserções de transposons, e outras características genômicas citologicamente detectáveis. Em *Brachiaria* spp., o presente trabalho é o início de avanços em estudos citogenéticos no gênero que ainda estão por vir.

4.2 Relação da posição gênica com a estrutura da cromatina

A expressão gênica está diretamente relacionada com a posição que o gene se encontra no cromossomo e o estado de compactação da cromatina. Genes localizados em porções heterocromáticas tendem a estarem silenciados (LOHE; HILLIKER, 1995; ZUCKERKANDL; HENNIG, 1995). Ao contrário, quando o DNA se encontra no estado de eucromatina, menos condensado, os

genes geralmente são ativos por estarem mais acessíveis aos fatores de transcrição (GREWAL; ELGIN, 2002).

Nas espécies de *Brachiaria* estudadas no presente trabalho, sinais do gene 11A nas três espécies de *Brachiaria* e dos genes 7A e 27A em *B. decumbens* foram detectados na região distal cromossômica. Em uma abordagem epigenética do comportamento do genoma nas mesmas espécies de *Brachiaria* avaliadas nesse estudo, foi relatado que essa região cromossômica constitui um domínio, predominantemente, eucromático (PAULA, 2015), portanto, o fato dos genes 11A, 7A e 27A estarem posicionados na região distal indica que se tratam genes que podem estar ativos.

Os demais genes como ADH1 e 5E foram detectados da região proximal cromossômica e podem estar inseridos em domínios heterocromáticos, uma vez que Paula (2015) observou que os centrômeros e pericentrômeros e, em alguns cromossomos, a extensão dessas regiões, são tipicamente hipermetiladas e marcadamente heterocromatinizadas nessas espécies de *Brachiaria*. Os fatores que definem as regiões de heterocromatina no cromossomo ainda não são muito bem compreendidos, mas a sua formação tem sido relacionada mais com a presença de DNA altamente repetitivo do que com outros tipos de sequências (GREWAL; ELGIN, 2002). Embora a heterocromatina não seja desprovida de genes, estas regiões são tipicamente deficientes deles (LU et al., 2000).

Um dos motivos que restringe a atividade da expressão gênica é o fato de a heterocromatina em geral ser mais densa e mais difícil de ser acessada pelos fatores de transcrição, por esse motivo, comumente os genes localizados em domínios heterocromáticos dos cromossomos estão sujeitos ao silenciamento (GREWAL; ELGIN, 2002), o que, a princípio, tal correlação poderia ser feita com os genes encontrados nessa região no presente trabalho. No entanto, principalmente para o gene ADH1 (Álcool Desidrogenase), que tem função conhecida, o silenciamento parece ser improvável, pois o referido gene é

responsável pela produção de enzimas que facilitam a interconversão entre álcoois e aldeídos ou cetonas (de NAD^+ para NADH), função vital para todos os organismos vivos (JÖRNVALL et al., 1995). Apesar da localização de genes na região tipicamente heterocromática, estas podem ser interrompidas por segmentos relativamente descondensados de eucromatina ao longo do comprimento do cromossomo (GREWAL; ELGIN, 2002). Segundo Paula (2015), alguns cromossomos de *B. brizantha* e *B. decumbens* possuem pontos de eucromatina nas regiões proximais. Portanto, o fato dos genes ADH1 e 5E terem sido localizados na região proximal não garante o silenciamento.

Em geral, pouco se sabe a respeito da estrutura da cromatina do segmento no qual um gene qualquer está inserido ou translocado. Também não é muito bem compreendido se existem diferenças na estrutura da região regulatória da expressão de genes eu e heterocromáticos. Os dois ambientes da cromatina podem exigir tipos ou balanços distintos de proteínas que efetivamente participam da expressão (WEILER; WAKIMOTO, 1995).

Desta forma, a localização de genes nos cromossomos é de fundamental importância para futuros trabalhos relacionados com análises da resposta dos organismos frente às modificações que ocorrem no genoma. Alterações na organização da eu e heterocromatina no cromossomo por meio de rearranjos ou de inserção de genes podem levar a mudanças na expressão gênica (LOHE; HILLIKER, 1995). A translocação de genes para a porção adjacente à heterocromatina, ainda que seja eucromatina, ativa a expansão do estado heterocromatinizado do DNA, silenciando genes nas regiões proximais. Ou ainda o gene pode ser translocado diretamente para uma região de heterocromatina e ser silenciado devido à inacessibilidade das proteínas de transcrição à informação genética (MARSHALL; FUNG; SEDAT, 1997). Além disso, a transposição de genes proximalmente a outra região rica em genes ativos

gera competição por elementos regulatórios entre os genes que pode resultar na redução dos níveis de expressão (KLEINJAN; HEYNINGEN, 1998).

A detecção simultânea de diferentes loci implica em avanços significativos no desenvolvimento de mapas físicos e são importantes para o entendimento de questões sobre as consequências ocasionadas por mudanças no genoma (FRANSZ et al., 1996). Estudos básicos a respeito da localização de genes e da configuração da cromatina em *Brachiaria* spp. serão fundamentais para trabalhos futuros que permitam o entendimento do comportamento do genoma atrelado à expressão gênica/silenciamento e as consequências a respeito dos rearranjos em nível cromossômico e gênico.

4.3 Desafios e avanços com estudos de genes de cópia única/baixo número de cópias

Para a detecção de sinais pela técnica de FISH é recomendável que o tamanho da sequência a ser localizada seja da ordem de 1 a 2kb. Trabalhos com a localização de sequências desse tamanho ou até mesmo da ordem de 0,25 kb têm sido mais bem sucedidos em cromossomos humanos (RICHARD et al., 1994). Em milho, a detecção de sequências de aproximadamente 3 kb foi possível (LAMB et al., 2007). Em *P. hybrida* sonda de cDNA do gene para Chalcona Sintase tinha 1,4 kb (FRANSZ et al., 1996). Huang, Hahlbrock e Somssich (1988) localizaram esse gene em salsa, porém de 6,6 kb de extensão.

As sequências que geraram sinais em cromossomos das espécies de *Brachiaria* apresentaram tamanho variando de aproximadamente 0,8 a 1,5 Kb. Desta forma, é provável que as sequências selecionadas como sonda estejam repetidas em tandem, dada as dificuldades de detecção de genes desse tamanho pela técnica de FISH em espécies de plantas.

Muitas sondas com fragmentos de DNA não formaram clusters, provavelmente pelo fato de as sequências não estarem repetidas em tandem o suficiente para que pudessem ser detectadas pela técnica de FISH. Nesses casos, o background era intenso dificultando a visualização de pequenos sinais isolados nos cromossomos das espécies estudadas. A ocorrência de background pronunciado também foi relatada por Huang, Hahlbrock e Somssich (1988); Peterson, Lapitan e Stack (1999) e Wang, Harper e Cande (2006) como fator complicador e parece ser comum em estudos de detecção de genes de cópia única em plantas.

Segundo Peterson, Lapitan e Stack (1999) cromossomos paquitênicos são altamente recomendáveis para a localização de genes de cópia única pelo fato dos cromossomos estarem mais livres de resíduos e mais descondensados quando comparados aos cromossomos mitóticos em metáfase, o que facilita a penetração das sondas, além de permitir o mapeamento físico dos cromossomos em alta resolução. O mapeamento físico de cromossomos paquitênicos foi realizado com sucesso em tomate (PETERSON; LAPITAN; STACK, 1999) e em milho (SADDER et al., 2000). Apesar de todas as vantagens, segundo De Jong, Fransz e Zabel (1999) a obtenção de células em paquíteno requer mais tempo e esforço do que simplesmente a germinação de sementes ou crescimento de plantas jovens para a obtenção de tecido meristemático. Além disso, a análise de cromossomos paquitênicos em espécies poliploides é particularmente difícil devido às inúmeras configurações complexas de pareamento, sinapses e aderências cromossômicas. Ademais, a identificação de possíveis polimorfismos entre cromossomos homólogos pode ficar prejudicada com esse tipo de análise. Em *Brachiaria* spp. a localização de genes de cópia única/baixo número de cópias é mais recomendada que seja realizada em cromossomos mitóticos metafásicos, uma vez que heteromorfismo entre cromossomos homólogos já foi relatado para espécies poliploides do gênero (NANI, 2015, p. 41), e a meiose

tende a formar multivantes em diferentes frequências em *B. brizantha* e *B. decumbens* (MENDES-BONATO et al., 2002a, 2002b).

É evidente que a importância de estudos de localização de genes nos cromossomos e que a montagem de mapas físicos com base em pequenos segmentos de DNA seja uma estratégia desafiadora. Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram o detalhamento de idiograma com apenas alguns dos genes estudados, devido à complexidade da hibridização do coquetel de sondas e detecção de genes de cópia única/ baixo número de cópias em espécies de plantas atrelada ao tamanho reduzido e similares de cromossomos de espécies de *Brachiaria* (NANI, 2015, p. 41). Contudo, os resultados obtidos mostram avanços relevantes no detalhamento dos cromossomos de espécies de *Brachiaria*, pois auxiliam o entendimento do comportamento cromossômico da espécie quanto à organização dos genes nos cromossomos. A inclusão de sondas adicionais permitirá o desenvolvimento do mapa citogenético de alta densidade em *Brachiaria* spp. que facilitará a identificação de rearranjos cromossômicos entre plantas e espécies. Avanços adicionais na construção de mapas físicos serão alcançados após o desenvolvimento de bibliotecas de BAC e sequenciamento de espécies do gênero.

5 CONCLUSÕES

Avanços importantes na construção de mapas físicos cromossômicos com o desenvolvimento de sondas de genes de cópia única/baixo número de cópias foram obtidos. As sondas desenvolvidas revelaram que os cromossomos 2, 12 e 7, respectivamente para *B. ruziziensis*, *B. brizantha* e *B. decumbens* apresentam sintenia conservada entre os sítios dos genes ADH1, 5E e de DNAr

5S. Os cromossomos 8 de *B. ruziziensis*, 7 e 13 de *B. brizantha* e 9 de *B. decumbens* também apresentaram sintonia conservada, porém entre os sítios dos genes de DNAr 45S e 11A.

Sondas de sequências de gene de cópia única/baixo número de cópias foram capazes de contribuir para o detalhamento de cromossomos ainda não caracterizados.

O uso de dados genômicos de espécies afins auxiliam a realização de comparações genômicas via citogenética, contudo, o sequenciamento de espécie modelo do gênero de interesse é de fundamental importância para a obtenção de resultados que permitam compreender melhor a relação entre os genomas presentes em *Brachiaria* spp.

REFERÊNCIAS

ABROUK, M. et al. Palaeogenomics of plants: syntenybased modelling of extinct ancestors. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.15, p. 479–487, 2010.

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.

BENNETZEN, J. L. et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, n. 6, p. 555–561, 2012.

BERNINI, C.; MARIN- MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios**, Cambridge, v. 104, p. 157-171, 2001.

BRUNNER, S. et al. Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 343–360, 2005.

DE JONG, J. H.; FRANSZ, P.; ZABEL, P. High resolution FISH in plants-techniques and applications. **Trends in plant Science**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 258-263, 1999.

DONG, H.; QUICK, J.S. Detection of 2.6 kb single-low copy DNA sequence on chromosomes of wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 246-249, 1995.

FRANSZ, P. F. et al. Detection of single-copy genes and chromosome rearrangements in *Petunia hybrida* by fluorescence *in situ* hybridization. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 9, n. 5, p. 767-774, 1996.

GERHARD, D. S. et al. Localization of a unique gene by direct hybridization *in situ*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 78, p. 3755-3759, 1981.

GIUSSANI, L. M. et al. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C4 photosynthesis. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 88, p. 1993-2012, 2001.

GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, p. 644–652, 2011.

GREILHUBER, J. Why plant chromosomes do not show Gbands. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 50, p. 121-124, 1977.

GREWAL, S. I. S.; ELGIN, S. C. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 12, p. 178-187, 2002.

GUPTA, S. et al. A novel class of Helitron-related transposable elements in maize contain portions of multiple pseudogenes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, p. 115–127, 2005.

HARPER, M. E.; MARSELLE, L. M. In situ hybridization: applicabon to gene localization and RNA detection. **Canadian Genetics and Cytogenetics**, London, v. 19, p. 73-80, 1985.

HARPER, M. E.; ULLRICH, A.; SAUNDERS, G. R. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 78, p. 4458-4460, 1981.

HENRY, H. Q.; HENG, J. S.; TSUI, L. C. High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 89, p. 9509-9513, 1992.

HUANG, P. L.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I. E. Detection of a single-copy gene on plant chromosomes by *in situ* hybridization. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 211, p. 143 147, 1988.

JIANG, J. et al. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 4487–4491, 1995.

JÖRNVALL, H. et al. The alcohol dehydrogenase system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 372, p. 281-294, 1995.

KATO, A.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 37, p. 13554–13559, 2004.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 43-46, 2007. Suppl.

KLEINJAN, D. J.; HEYNINGEN, V. V. Position effect in human genetic disease. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 7, n. 10, p. 1611-1618, 1998.

LAI, J. et al. Gene movement by Helitron transposons contributes to the haplotype variability of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 9068–9073, 2005.

LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Retroelement genome painting: cytological visualization of retroelement expansions in the genera *Zea* and *Tripsacum*. **Genetics**, Austin, v. 173, p. 1007–1021, 2006.

LAMB, J. C. et al. Single-gene detection and karyotyping using Small-Target Fluorescence *in Situ* Hybridization on Maize somatic chromosomes. **Genetics**, Austin, v. 175, p. 1047–1058, 2007.

LAWRENCE, J. B.; VILLNAVE, C. A.; SINGER, R. H. Sensitive, high resolution chromatin and chromosome mapping *in situ*: Presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. **Cell**, Cambridge, v. 52, p. 51–61, 1988.

LEHFER, H. et al. Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosoma**, Berlin, v. 102, p. 428–432, 1993.

LOHE, A. R.; HILLIKER, A. J. Return of the H-word (heterochromatin). **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 5, p. 746–755, 1995.

LU, B. Y. et al. Heterochromatin protein is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. **Genetics**, Austin, v. 155, p. 699-708, 2000.

LYONS, E. et al. The Value of Nonmodel Genomes and an Example Using SynMap Within CoGe to Dissect the Hexaploidy that Predates the Rosids. **Tropical and Plant Biology**, Berlin, v. 1, p. 181–190, 2008.

MARSHALL, W. F.; FUNG, J. C.; SEDAT, J. W. Deconstructing the nucleus: global architecture from local interactions. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 7, p. 259–263, 1997.

MEHROTRA, S.; GOYAL, V. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, Beijing, v. 12, n. 4, p. 164–171, 2014.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Chromosome numbers and microsporogenesis in *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 419–424, 2002a.

MENDES-BONATO, A. B. et al. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, London, v. 26, p. 641–646, 2002b.

MENDES, D. V. et al. Cytological evidence of natural hybridization in *Brachiaria brizantha* Stapf (Gramineae) **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, p. 441–446, 2006.

MORGANTE, M. et al. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. **Nature Genetics**, New York, v. 37, p. 997–1002, 2005.

NANI, T. F. Mapa físico dos sítios de DNA repetitivo em *Brachiaria*: polimorfismos intra e interespecíficos. In: -----, **Citogenética de espécies de *brachiaria***: contribuições para a construção de mapas físicos. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015. p. 41.

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.

OHMIDO, N.; AKIYAMA, Y.; FUKUI, K. Physical mapping of unique nucleotide sequences on identified rice chromosomes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 38, p. 1043–1052, 1998.

PATERSON, A. H. et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. **Nature**, London, v. 457, n. 29, p. 551-556, 2009.

PAULA, C. M. P. **Citogenômica comparativa e aspectos epigenéticos em espécies de *Brachiaria* e híbridos interespecíficos**. 2015. 113 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PETERSON, D. G.; LAPITAN, N. L. V.; STACK, S. M. Localization of Single- and Low-Copy Sequences on Tomato Synaptonemal Complex Spreads Using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). **Genetics**, Austin, v. 152, p. 427–439, 1999.

RICHARD, F. et al. Increased FISH efficiency using APC probes generated by direct incorporation of labelled nucleotides by PCR. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 65, p. 169-171, 1994.

SADDER, M. T. et al. Physical localization of single-copy sequences on pachytene chromosomes in maize (*Zea mays* L.) by chromosome *in situ* suppression hybridization. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 1081–1083, 2000.

SANTOS, F. C. et al. Chromosome distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. **Chromosome Research online**, Berlin, p. 1-15, Sept. 2015. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/282656647_Chromosomal_distribution_and_evolution_of_abundant_retrotransposons_in_plants_gypsy_elements_in_diploid_and_polyploid_Brachiaria_forage_grasses>. Acesso em: 23 out. 2015.

SCHNABLE, J. C.; FREELING, M.; LYONS, E. Genome-Wide analysis of syntenic gene deletion in the grasses. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 265–277, 2012.

SCHUBERT, I.; RIEGER, R.; DÖBEL, P. G and/or C-bands in plant chromosomes? **Journal of Cell Science**, London, v. 71, p. 11-120, 1984.

SILVA et al. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **Genomics**, Austin, v. 14, n. 17, p. 2-9, 2013.

SMITH, S. M.; PRYOR, A. J.; HULBERT, S. H. Allelic and haplotypic diversity at the rp1 rust resistance locus of maize. **Genetics**, Austin, v. 167, p. 1939–1947, 2004.

SONG, R.; MESSING, J. Gene expression of a gene family in maize based on noncollinear haplotypes. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 100, p. 9055–9060, 2003.

SUMNER, A. T. **Chromosomes, the karyotype and evolution, in Chromosomes: organization and function**. Oxford: Blackwell Science, 2008. 304 p.

WANG, C. J.; HARPER, L.; CANDE, W. Z. High-resolution single-copy gene fluorescence in situ hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 529–544, 2006.

WANG, L. et al. A Low-Cost library construction protocol and data analysis pipeline for Illumina-Based Strand-Specific Multiplex RNA-Seq. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026426>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

WEBB, C. A. et al. Genetic and molecular characterization of the maize rp3 rust resistance locus. **Genetics**, Austin, v. 162, p. 381–394, 2002.

WEILER, S. K.; WAKIMOTO, B. T. Heterochromatin and gene expression in drosophila. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 29, p. 577-605, 1995.

WOO, Y. M. et al. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 2297–2317, 2001.

WU, Y.; MEELEY, R. B.; COSGROVE, D. J. Analysis and expression of the alpha-expansin and beta-expansin gene families in maize. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, p. 222–232, 2001.

YU, W. et al. Cytological visualization of transposable elements and their transposition pattern in somatic cells of maize. **Genetics**, Austin, v. 175, p. 31–39, 2007.

ZUCKERKANDL, E.; HENNIG, W. Tracking heterochromatin. **Chromosoma**, Berlin, v. 104, p. 75–83, 1995.

INFORMAÇÃO SUPLEMENTAR

Tabela 1 Lista das sequências de genes conservados que formam prováveis clusters nos cromossomos das espécies de *Brachiaria brizantha*, *Setaria italica* e *Sorghum bicolor*

<i>Setaria italica</i>	Nº de cópias	<i>Sorghum bicolor</i>	Nº de cópias	Código da sonda	Transcritos de <i>B. brizantha</i> selecionados	Par de Primer
Si000910m	9	Sb03g041220	8	1A	U_b_comp3453_c0_seq1	L:cagctacgtccaggacaaca F:actgtgggtgggagggtgta
				1B	U_b_comp10127_c0_seq1	L:accaccgcaaatcatggac R:ccggtcaggtatcatcagg
				2A	U_b_comp1923_c0_seq1	L:gagcaaaataagacgccattg R:aaccatgtgaccatttgag
				2B	U_b_comp10937_c0_seq1	L:tcgtcctcgaacttctctgc R:ctgcagcactccacctg
Si001251m	11	Sb03g033830	7	2C	U_b_comp10962_c0_seq1	L:ggagagcgcaggatgatg R:acacatccatcactggagca
				2D	U_b_comp15088_c0_seq1	L:cgccatcgatcttgggg R:gcccagcagctatatacttt
				2F	U_b_comp90_c0_seq1	L:agccaaggacaccgtcac R:ttcatttgaccatctccaa
Si001862m	9	Sb03g001830	8	3A	U_b_comp3241_c0_seq1	L:agctctgctctctctctgc R:tcacccctgaagtgaactcag
				4A	U_b_comp13912_c0_seq1	L:gtcaatatccgtccgtcgtc R:cgcgccacagtttctagt
Si002456m	8	Sb03g045040	8	4B	U_b_comp16283_c0_seq1	L:aggttccgagcaaggtc R:gtctgccactcaccgtttct
				4C	U_b_comp8563_c0_seq1	L:cttctcctggggctctc R:gaagttggatggacacaatga
				5A	U_b_comp10987_c0_seq1	L:tgaccggatcatcaaaaac R:ttgtccatctgccctatc
				5B	U_b_comp16330_c0_seq1	L:ctgcactcctctcctctc R:gtagctccataaatgctga
				5C	U_b_comp11255_c0_seq1	L:gtgtgctgacatgaaaca R:atgctcgagcgaataagat
Si003904m	13	Sb03g028590	17	5E	U_b_comp4718_c0_seq1*	L:tgacagagctgtagatcg R:gaggatgcagcgtaatgaca
				5F	U_b_comp8386_c0_seq1	L:ctccattgtgctgctgacat R:catgggcaagttcctcctaa
				6A	U_b_comp10487_c0_seq1	L:agttgctgatttgggcttg R:ttcatcctcagatattgctgca
				6B	U_b_comp18188_c0_seq1	L:attgcacttcgacatcaagc R:ctcactattgctgctgat
				6C	U_b_comp19664_c0_seq1	L:tccacgaagaagctgaaagg R:tctcagattgtgtgacctgaa
				6D	U_b_comp19740_c0_seq1	L:ttggtgactctttgcatcc R:gcatattgacagccacagg
Si004458m	13	Sb03g008100	10	7A	U_b_comp12506_c0_seq1*	L:cgatcatggcaagcaagg R:agtgtcctgattgcgcaa
				7B	U_b_comp2724_c0_seq1	L:cacctcaggattcaggaagg R:acgtgtcaggatggagAAC

Tabela 1, Continua

Si006652m	7	Sb10g007290	7	8A	U_b_comp17648_c0_seq1	L:cttcagctctcccacagag R:tccttgaggaaactgtcgcgag
				9A	U_b_comp8602_c0_seq1	L:actcctctcctccgtttc R:gcgagttgttaaatgatgaacg
Si007932m	8	Sb10g007110	7	9B	U_b_comp7375_c0_seq1	L:gcctcaacggaatcctctc R:tctgactgacaaggtaaccaa
				10A	U_b_comp13342_c0_seq1	L:cacttcaggatggcatttt R:aaccaccaatctgcaaac
				10B	U_b_comp4374_c0_seq1	L:ctacatgctcggcacctacc R:aagctttggaggaacctttg
Si009837m	13	Sb06g022450	13	10C	U_b_comp8434_c0_seq1	L:acattcagtcgccgttacc R:tcattcatggatggcaaat
				10D	U_b_comp9372_c0_seq1	L:agattccaccaactccaacg R:caaccatcttctccc
				11A	U_b_comp2908_c0_seq1*	L:catcagcgtctgtaagat R:cttcccgtactcgaccatgt
Si010518m	9	Sb06g029540	13	11B	U_b_comp3817_c0_seq1	L:taccccagaaaaatgggatg R:gcaattccatgcgagtgtta
				11C	U_b_comp9986_c0_seq1	L:gtaaatgcggcgcgtactg R:gggtcatggactacacagta
Si011333m	17	Sb06g019480	10	12A	U_b_comp2072_c0_seq1	L:cacaggtccaccgaagctca R:aagtttggcctggcacataga
				13A	U_b_comp1290_c0_seq1	L:ctctgtctttcgccttgag R:gagaggaactagaagccagca
				13B	U_b_comp13535_c0_seq1	L:caggaacgtcatggaagac R:ggaatttgaaatggtctgg
Si012447m	12	Sb06g023590	7	13C	U_b_comp5255_c0_seq1	L:cgggaagaaggcaacataga R:tgtgttagcctcacgaaaa
				13D	U_b_comp9876_c0_seq1	L:ggatttcgtcaggctcagt R:gcctgactagttgtgaacattcc
				14A	U_b_comp13583_c0_seq1	L:gtcgaacaaacagttcca R:cgaacaaagtcagtgttagcg
Si012795m	17	Sb06g029725	13	14B	U_b_comp16672_c0_seq1	L:gaagatggcaaggagtgc R:cggcctctagaatcgacag
				14C	U_b_comp9311_c0_seq1	L:ggccacggaattttgcag R:aaacacaagcataacgtaaaagtcg
				15A	U_b_comp10957_c0_seq1	L:cttccatctccaaagcaaa R:ccctcaggcctcaacataga
				15B	U_b_comp17399_c0_seq1	L:ctttctgcagcaggagtg R:cgaaccaacacatcaggtaa
Si012978m	8	Sb06g026630	9	15C	U_b_comp7547_c0_seq1	L:cccaaccagaaaagagaagc R:cacggcaaaactcacaacac
				15D	U_b_comp14349_c0_seq1	L:ggggacgaggagagtctga R:tactctaggccgttcatca
				16A	U_b_comp113_c0_seq1	L:gtttttacgcagcttaagc R:aactggctactaggctcg
Si022557m	8	Sb09g002740	7	16B	U_b_comp1697_c0_seq1	L:gacggaagggttctacatgc R:ccggaaggaggagcagtgc
				16C	U_b_comp2662_c0_seq1	L:cgggaagggttctacatgcac R:cgggaaggaggagcagtgg
				17A	U_b_comp7514_c0_seq1	L:ggcgaaaaatttctcatgc R:ggaggcgatctcatcagtg
Si026012m	8	Sb05g008360	8	17B	U_b_comp7360_c0_seq1	L:tcatgatcaacaaatctatgg R:atgcatgctctcacttgcgtg

Tabela 1, Continua

Si028878m	7	Sb02g022630	8	18A	U_b_comp7864_c0_seq1	L:cagctgtgggttctcaaca R:cccgtagaattaaagcaga
				18B	U_b_comp4762_c0_seq1	L:ttcgctagcatggcaaca R:catgagatgctgatgacce
Si029659m	7	Sb02g034100	8	19A	U_b_comp5908_c0_seq1	L:gctactccgaccatgcttt R:ttcatccaaggccttctc
				19B	U_b_comp6786_c0_seq1	L:cgattcgacatgagatt R:cgctctagtagctaggga
Si029739m	13	Sb02g007080	7	20A	U_b_comp17847_c0_seq1	L:gctcctcatgctgcttc R:acgacattatgcccttcag
				20B	U_b_comp1979_c0_seq1	L:ctgcctctgctgcctacat R:cccttcagcgaactcaa
				20C	U_b_comp6432_c0_seq1	L:atcgactggccgagaag R:cacgtagtcggcccagaa
				20D	U_b_comp9413_c0_seq1	L:ctgcctctgctgcctacat R:acgacattatgcccttcagc
				21A	U_b_comp2011_c0_seq1	L:cactccgcatctacaaga R:ttcggaaaggaagacgtg
				21B	U_b_comp10353_c0_seq1	L:ccgcatctacaagatggaa R:acgctgtccatgagcttctt
Si030193m	11	Sb02g026800	7	21C	U_b_comp11235_c0_seq1	L:ccctacgagtacctggagca R:cgaactcgtagaccttctcg
				21D	U_b_comp13767_c0_seq1	L:atcgactggccgagaag R:gtagtcggcccagaacctg
				21E	U_b_comp17460_c0_seq1	L:atcgactggccgagaag R:cgtagtcggcccagaacct
				22A	U_b_comp13310_c0_seq1	L:agacggaggagggttctact R:caacagcattcatcgagaaaa
Si032651m	20	Sb02g005060	22	22B	U_b_comp17162_c0_seq1	L:tgacacacctttctgatgtt R:gttgcccatacttgaaga
				22C	U_b_comp18424_c0_seq1	L:aatggtatggcactgat R:caattagtgccacaagcag
				23A	U_b_comp2424_c0_seq1	L:ctcgcggacactggacac R:gcgtcaagttcaccacagaa
Si032900m	9	Sb02g028590	7	23B	U_b_comp7114_c0_seq1	L:ccaggcctccagcgatag R:ttgaaaataaccaacagttcc
				23C	U_b_comp7801_c0_seq1	L:cagtgaagctgttagcagac R:cttctgtgcttaataatcca
				23D	U_b_comp8763_c0_seq1	L:agagttgctgctcagacagaga R:cataacagtgcctctgttca
Si033044m	10	Sb02g001580	13	24A	U_b_comp18627_c0_seq1	L:ttggaccagctcatttcat R:aacacatgatgcgctcaaag
				25A	U_b_comp3446_c0_seq1	L:cgttcaatggcaaggaagt R:ccttgctatggagctcagaa
Si033419m	20	Sb02g031700	14	25B	U_b_comp17099_c0_seq1	L:tgccaagagactcgttcaaa R:aggaaagcccttcaacttc
				25C	U_b_comp17433_c0_seq1	L:ctgcaagaaaaatgggaactg R:aatggcctcctgttattca
Si035652m	8	Sb01g027290	14	26A	U_b_comp8375_c0_seq1	L:actagcgtgggactgttga R:gatgcataccatgacgctga
				26B	U_b_comp18708_c0_seq1	L:ctaaagaggacacgggaaa R:atgacgctgatgatgctgaa
Si036899m	8	Sb01g029230	10	27A	U_b_comp762_c0_seq1*	L:gggctcatgctatcagatt R:ggacgtaggagcggtagttg

Tabela 1, Conclusão

Si037137m	22	Sb01g030900	24	28A	U_b_comp14349_c0_seq1	L:ccctacgagtacctggagca R:cgacgaactcgtagacctct
				28B	U_b_comp2363_c0_seq1	L:tgtggactctgggtgag R:cgaactcgtagacctctcg

*Sequências que apresentaram sítios em cromossomos das espécies de *Brachiaria*.

L: Forward

R: Reverse

Tabela 2 Genes de função conhecida/suposta selecionados do genoma de *Setaria italica*.

Banco de dados	Categoria	Gene/código	Par de Primer
Phytosome	heat shock sequences (Heat repeat)	Hypothetical gene (#37786824)	L:cgagttttagtcgcctc R:ccacactttacggcaccat
		Hypothetical gene (#37732222)	L:cagattgcattgatgattgg R:gggagaaggatggaatagcc
		Hypothetical gene (#37795893)	L:ttctctcgcattgggtttt R:aaccgacaacaacctcacc
	Heat shock protein binding	Hypothetical gene (#37751042)	L:ctgtttggtggccaggtat R:ggcgaagagcacgattctta
		Hypothetical gene (#37802704)	L:ggatgcaacaggaagaag R:ctctcatggcactcctggat
	Natural resistance-associated macrophage protein	Hypothetical gene (#37744648)	L:gatgtcacggaagttcagca R:gctgctttccacttgagac
	Starch-branching enzyme	Cluster 37753166	L:ctgtttgagaaatgccaga R:caattgctccaacaggtgtg
Rubisco sequences	Hypothetical gene (#37738073)	L:gtgtcacgtctggtgcaaac R:ggcctcaagaacgttaaaa	
NCBI	Adh1	XM_004979060.1	L:ggtgaccatgtccttctgt F:caaaggccttggtgatctcc
	PEPC	AF495586.1	L: gctactccgaccatcgtctt R: ttcactccaagcctctc

L: Forward

R: Reverse