



GABRIELA BARRETO DOS REIS

**ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA E
HOMOLOGIA GENÔMICA EM *PENNISETUM*
SPP RICH. (POACEAE)**

LAVRAS – MG

2013

GABRIELA BARRETO DOS REIS

**ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA E HOMOLOGIA GENÔMICA EM
*PENNISETUM SPP RICH. (POACEAE)***

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

Orientadora

Prof^a Dr^a. Lisete Chamma Davide

Coorientadora

Prof^a Dr^a. Larissa Fonseca Andrade-Vieira

LAVRAS – MG

2013

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

Reis, Gabriela Barreto dos.

Eliminação cromossômica e homologia genômica em *Pennisetum*
spp Rich. (Poaceae) / Gabriela Barreto dos Reis. – Lavras : UFLA,
2013.

90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Ciclo celular. 2. Hibridização *in situ*. 3. Mixoploidia. 4.
Híbridos interespecíficos. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 631.523

GABRIELA BARRETO DOS REIS

**ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA E HOMOLOGIA GENÔMICA EM
*PENNISETUM SPP RICH. (POACEAE)***

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

APROVADA em 10 de maio de 2013.

Profª Drª Giovana Augusta Torres

UFLA

Profª Drª Eliana Regina Forni Martins

UNICAMP

Profª Drª. Lisete Chamma Davide

Orientadora

LAVRAS – MG

2013

A Deus, que guia meus caminhos.

OFEREÇO

Aos meus pais Dehon e Adriana pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos que tanto amo, Ana Cláudia e Renan.

Ao Júnior, pelo amor, companheirismo e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por permitir que mais esta etapa fosse concretizada e por se fazer sempre presente em minha vida.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do mestrado e estrutura concedida para realização desse trabalho.

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

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

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

À Professora Eliana pela disponibilidade em participar da banca e pelas contribuições.

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

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

À minha querida amiga Cris, pela amizade, companheirismo, risadas e conhecimentos compartilhados.

À Édila, pela contribuição na execução deste trabalho.

À Amanda, pela dedicação e amizade, sem a qual este trabalho não seria completo.

Aos meus pais, Dehon e Adriana pela educação, amor e apoio. Amo muito vocês e agradeço de todo coração por tudo que sempre fizeram para que eu pudesse realizar meus sonhos!

Aos meus irmãos mais que queridos, Renan e Ana Cláudia, pela amizade, carinho, força e incentivo.

Ao meu namorado Júnior, pelo amor, carinho, companhia e apoio constante. Obrigada por tornar meus dias mais alegres!

Aos meus familiares, por todo amor, incentivo e carinho e por sempre acreditar em mim.

À Su e Letícia, por todo conhecimento compartilhado nos nossos longos dias de estudo.

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

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

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Portanto,
Façamos da interrupção um caminho novo,
Da queda, um passo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

RESUMO

O híbrido resultante do cruzamento entre capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, $2n = 4x = 28$, genomas A'A'BB) e o milheto (*P. glaucum*, $2n = 2x = 14$, genoma AA), é triplóide ($2n = 3x = 21$), possui os genomas AA'B e é estéril, porém de grande aceitação pelo gado. A restauração da fertilidade do híbrido triploide e consequente viabilização de seu uso nos programas de melhoramento é feita por indução de duplicação cromossômica. No entanto, plantas mixoploides com $2n = 14$ a 42 cromossomos têm sido obtidas, devido à eliminação cromossômica. Considerando que essas plantas apresentam características de interesse para o melhoramento do capim-elefante, esse trabalho teve como objetivo estudar a eliminação cromossômica em poliploides parciais sintéticos oriundos de duplicação cromossômica e retrocruzamentos, além de obter subsídios para o entendimento da homologia existente entre os genomas dos parentais capim-elefante e milheto. Para as análises foram utilizadas técnicas de coloração convencional com Giemsa e hibridização *in situ*. Foi observado que, durante o ciclo celular, tanto em híbridos duplicados como naqueles resultantes do retrocruzamentos avaliados neste trabalho são eliminados cromossomos de ambos os parentais, com eliminação predominante de cromossomos de capim-elefante. Além disso, as alterações ocorrem em uma frequência baixa, quando comparada com as relatadas para meiose de híbridos hexaploides parciais. Os cromossomos portadores de sítios de rDNA 45S e 5S não aparecem entre aqueles eliminados no ciclo celular do híbrido hexaploide. A hibridização com sondas de DNA de milheto e de capim-elefante confirmou que existe homeologia entre os genomas A de milheto e A' e B de capim-elefante e que a proporção e distribuição das regiões homólogas nos genomas A' e B diferem após a hibridação.

Palavra-chave: Ciclo celular. Eliminação cromossômica. Hibridização *in situ*. Homologia genômica. Híbridos interespecíficos. Mixoploidia.

ABSTRACT

The hybrid resulting from a cross between elephant grass (*Pennisetum purpureum*, $2n = 4x = 28$, genomes A'A'BB) and pearl millet (*P. glaucum*, $2n = 2x = 14$, genome AA), is triploid ($2n = 3x = 21$), has the genomes AA'B and is sterile, but highly appreciated by cattle. The restoration of fertility of triploid hybrid and consequent viability of its use in breeding programs is done by induction of chromosome duplication. However, mixoploids plants with $2n = 14-42$ chromosomes have been obtained due to chromosome elimination. Whereas these plants exhibit characteristics of interest for the improvement of elephant grass, this work aimed to study the chromosome elimination in synthetic partial polyploids derived from chromosomal duplication and backcrosses, and gain insight into the homology between the parental genomes of elephant grass and millet. For analyzes were utilized techniques conventional Giemsa staining and *in situ* hybridization. It was observed that during the cell cycle both in hybrid duplicated as those resulting from backcrossing of these and their parental during the cell cycle are eliminated chromosomes from both parental, and that chromosome elimination is random with predominant elimination of chromosomes of elephant grass. Additionally, changes occur at a low frequency compared with those reported for hybrids of hexaploid partial meiosis. The chromosomes bearing sites of rDNA 45S and 5S does not appear among those eliminated in the cell cycle of hybrid hexaploid. Hybridization with DNA probes of millet and elephant grass confirmed that exists homeology between the genomes A of millet and A 'and B elephant grass, and the ratio and distribution of the homologous regions in the genomes A' and B differ after hybridization.

Keywords: Cell cycle. Chromosome elimination. *In situ* hybridization. Homology genomics. Interspecific hybrids. Mixoploidy.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| | PRIMEIRA PARTE | 13 |
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | Hibridação interespecífica no melhoramento de <i>Pennisetum</i> | 15 |
| 2.2 | Eliminação cromossômica como consequência da poliploidização em híbridos interespecíficos | 19 |
| 2.3 | Uso da hibridização <i>in situ</i> em <i>Pennisetum</i> | 27 |
| 2.4 | Origem, evolução e relação genômica em Poaceae | 29 |
| | REFERÊNCIAS | 34 |
| | SEGUNDA PARTE – ARTIGOS | 44 |
| | ARTIGO 1 – Eliminação cromossômica em híbridos poliploides sintéticos de <i>Pennisetum purpurem</i> (Schumach) e <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br. (Poaceae) | 44 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 47 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 2.1 | Material Vegetal | 49 |
| 2.2 | Ciclo celular e frequência de eliminação cromossômica por coloração convencional | 49 |
| 2.3 | Obtenção de metáfases colchicínicas para avaliação das regiões de rDNA | 50 |
| 2.4 | Hibridização <i>in situ</i> | 51 |
| 3 | RESULTADOS | 52 |
| 3.1 | Identificação dos genomas envolvidos na eliminação cromossômica durante o ciclo celular | 52 |
| 3.2 | Comportamento de cromossomos portadores de sítios de rDNA durante o ciclo celular de híbridos hexaploides parciais | 60 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 4 | DISCUSSÃO | 66 |
| 5 | CONCLUSÃO | 69 |
| | REFERÊNCIAS | 70 |
| | ARTIGO 2 – Homologia genômica em <i>Pennisetum</i> spp Rich. (Poaceae)..... | 74 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 77 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 78 |
| 2.1 | Material vegetal..... | 78 |
| 2.2 | Obtenção de metáfases colchicínicas | 78 |
| 2.3 | Hibridização <i>in situ</i> genômica..... | 79 |
| 3 | RESULTADOS | 80 |
| 4 | DISCUSSÃO | 84 |
| 5 | CONCLUSÃO | 87 |
| | REFERÊNCIAS | 87 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) e o milheto [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] são importantes forrageiras para a agropecuária brasileira, sobretudo para a pecuária leiteira. Os programas de melhoramento têm buscado desenvolver variedades forrageiras com alta produção de massa e valor nutritivo e uma das estratégias utilizadas é a produção de híbridos entre estas espécies, que apresentam características de forragem complementar (PEREIRA et al., 2001).

O capim-elefante, com $2n = 4x = 28$ cromossomos e genoma A'A'BB, tem elevada produção de matéria seca, boa aceitabilidade, alto valor nutritivo e perenidade, que podem ser combinadas com a qualidade de forragem, boa resistência à seca e doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e de maior tamanho do milheto ($2n = 2x = 14/AA$) (PEREIRA et al., 2001). Desse cruzamento origina-se um híbrido triplóide e estéril, com $2n = 3x = 21$ cromossomos, genomas AA'B e estáveis quanto ao número cromossômico somático (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003).

A fim de restaurar a fertilidade deste híbrido e viabilizar o uso da combinação genética de capim-elefante e milheto nos programas de melhoramento, faz-se necessário a duplicação dos cromossomos, produzindo plantas hexaplóides, que apresentam $2n = 6x = 42$ cromossomos e genoma AAA'A'BB. Como resultado dos protocolos de duplicação cromossômica, plantas mixoploides, hexaploides parciais, com células apresentando entre 14 e

42 cromossomos foram frequentemente obtidas (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009).

Plantas produzidas a partir de retrocruzamentos entre os hexaploides obtidos e seus parentais milho e capim-elefante também geraram mixoploides. O número cromossômico variou de 16 a 28 nos híbridos tetraploides parciais e de 20 a 34 nos híbridos pentaploides parciais, com maior variação do número cromossômico nas combinações pentaploides (LEÃO et al., 2011).

O processo de hibridação pode resultar em conflitos intergenômicos levando a reorganizações genéticas e epigenéticas, como consequência da reunião de genomas diferentes em um mesmo núcleo (RIDDLE; BIRCHLER, 2003) e, em muitos casos, ocorre eliminação de sequências específicas nos primeiros estágios após a hibridação (GERNAND et al., 2005; LIU et al., 1996).

Para os híbridos hexaploides parciais entre capim-elefante e milho, foi observada eliminação biparental e aleatória em metáfases somáticas, com eliminação predominante de cromossomos do genoma de capim-elefante (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013, no prelo).

Resta saber, no entanto, se existem cromossomos de ambos os genomas que sempre são eliminados nos núcleos híbridos e se os descendentes de retrocruzamentos apresentam padrão de eliminação semelhante aos parentais hexaploides parciais.

Além disso, estudos baseados no pareamento cromossômico dos híbridos sugeriram que os genomas A do milho e A'B do capim-elefante são homeólogos (JAUHAR; HANNA, 1998; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005). No entanto, não se conhece o grau de homologia que há entre esses genomas.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi estudar a dinâmica da eliminação cromossômica no ciclo celular de híbridos poliploides parciais de

capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*) e avaliar o grau de homologia entre os genomas A, A' e B.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Hibridação interespecífica no melhoramento de *Pennisetum* spp.

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

Pennisetum é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Paniceae (MARTEL et al., 2004). O gênero possui aproximadamente 140 espécies (BRUNKEN, 1977) com números cromossômicos básicos de $x = 5, 7, 8$ ou 9 , níveis de ploidia variando de diploide a octaploide, comportamento reprodutivo sexual ou apomítico e ciclo de vida anual, bianual ou perene (MARTEL et al., 2004).

O germoplasma do gênero *Pennisetum* tem origem africana e foi introduzido no Brasil na década de 50 e inclui espécies cultivadas e selvagens, populações adaptadas e materiais exóticos, oferecendo grande diversidade de plantas, bem como uma ampla variabilidade genética para a grande maioria dos caracteres de importância para forragem (JAUHAR; HANNA, 1998).

A seção *Pennisetum* desperta maior interesse por abrigar as espécies cultivadas capim-elefante (*P. purpureum*) e milheto (*P. glaucum*). Em geral, as

espécies selvagens são menos produtivas que as cultivadas, entretanto, podem conter alelos importantes relacionados à resistência a fatores bióticos e abióticos que podem ser transferidos para as espécies cultivadas. No gênero *Pennisetum*, as espécies silvestres têm contribuído para a formação de híbridos com caracteres como hábito de crescimento perene, sensibilidade a dias curtos visando estender o período de crescimento vegetativo e apomixia (DUJARDIN; HANNA, 1989; JAUHAR; HANNA, 1998).

O capim-elefante é tetraploide, com o número somático de cromossomos $2n = 4x = 28$ e apresenta a formação de 14 bivalentes nas diacineses e metáfases I, confirmando que apesar de ser tetraploide, se comporta tipicamente como um diploide (JAUHAR, 1981; JAUHAR; HANNA, 1998; TECHIO et al., 2002). Os genomas do capim-elefante são denominados A'A'BB, sendo que o genoma A' apresenta grande homologia com o genoma A do milho e o genoma B é proveniente de um doador desconhecido (JAUHAR, 1981). A espécie é amplamente cultivada por todo o Brasil, no entanto, a expansão da área cultivada é limitada pelo custo do uso da propagação vegetativa, visto que a maioria das cultivares produz sementes de baixo vigor, minúsculas e deiscentes (PEREIRA et al., 2001, 2003).

A obtenção de cultivares que possam ser propagadas por sementes agregando características como maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade nutricional, tolerância a solos de baixa fertilidade, distribuição mais equitativa da produção de matéria seca durante o ano e resistência às cigarrinhas das pastagens tem sido considerado o principal objetivo do melhoramento dessa forrageira (PEREIRA et al., 2003). Para tal, uma das estratégias de melhoramento do capim-elefante tem sido a hibridação interespecífica com o milho seguido de poliploidização artificial (HANNA,

1999; JAUHAR, 1981; JAUHAR; HANNA, 1998; PEREIRA et al., 2001; SCHANK et al., 1993).

O milho apresenta 7 bivalentes regularmente distribuídos nas diacineses e metáfases I, confirmando uma condição diplóide de número somático de cromossomos $2n = 2x = 14$ e genoma AA (JAUHAR; HANNA, 1998; POWEL; HANNA; BURTON, 1975; TECHIO et al., 2002). É uma espécie anual, alógama, que apresenta boa resistência à seca e a doenças, tolerante a baixos níveis de fertilidade do solo, tem boa produção de sementes não deiscantes e proporciona elevado rendimento de matéria seca (PEREIRA et al., 2001). No melhoramento do milho, tem-se procurado por materiais resistentes a doenças, com macho esterilidade e melhores características forrageiras (JAUHAR; HANNA, 1998).

O milho, além de apresentar sementes grandes e sem aristas, mostrou-se a melhor combinação com o capim-elefante para a utilização como forrageira (JAUHAR; HANNA, 1998). A obtenção de híbridos interespecíficos visa reunir alguns fenótipos favoráveis do milho, tais como qualidade da forragem, produção de sementes não deiscantes e tolerância à seca, com a agressividade, perenidade e elevada produção de matéria seca do capim-elefante (DIZ, 1994). As plantas híbridas apresentam melhor aceitação pelos bovinos (JAUHAR, 1981) e, morfológicamente, se assemelham ao capim-elefante, provavelmente, devido à sua maior contribuição na constituição do genoma ou por uma maior expressão do genoma B do capim-elefante em relação ao genoma A do milho para caracteres como precocidade, características de folha e inflorescência e tamanho de semente (GONZALEZ; HANNA, 1984).

O híbrido interespecífico triploide resultante do cruzamento apresenta genomas AA'B, com $2n = 3x = 21$ cromossomos, dos quais sete são oriundos de *P. glaucum* e quatorze de *P. purpureum*. Devido à condição triploide, esses

híbridos são estéreis, o que limita o seu emprego nos programas de melhoramento, visto que, os produtores preferem forrageiras cultivadas por meio de sementes (PEREIRA et al., 2000). Apesar disto, os híbridos de capim-elefante e milheto apresentam grande potencial para o incremento da qualidade da forragem destinada à alimentação animal (SCHANK et al., 1993).

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

Nos híbridos de capim-elefante e milheto submetidos à duplicação cromossômica por atimitóticos, a eliminação foi um resultado recorrente, sendo observada grande variação no número cromossômico (CAMPOS et al., 2009). Esse fenômeno de mixoploidia também foi observado em combinações genômicas ou raças cromossômicas obtidas por retrocruzamentos entre o híbrido hexaploide com o parental capim-elefante produzindo híbridos pentaploides ($2n = 5x = 35$, genomas AA'A'BB) e entre o híbrido hexaploide e o parental milheto produzindo combinações tetraploides ($2n = 4x = 28$, genomas AAA'B) (LEÃO et al., 2011). Nas combinações pentaploides, o efeito da introgressão de características favoráveis do milheto para o capim-elefante é evidenciado pelo melhor desempenho destes genótipos para características agrônômicas. Isso mostra, que estas combinações genômicas apresentam potencial forrageiro para serem usadas em programas de melhoramento (LEÃO et al., 2012).

2.2 Eliminação cromossômica como consequência da poliploidização em híbridos interespecíficos

O fenômeno da poliploidia é reconhecido como a maior força evolutiva em vegetais (ADAMS; WENDEL, 2005) e vários trabalhos têm relatado as consequências de eventos de hibridação e poliploidização (LEITCH; BENNETT, 2004). A indução de poliploidia continua sendo amplamente empregada no melhoramento de plantas, visando obter plantas maiores e melhores, para restaurar a fertilidade em híbridos interespecíficos e intergenéricos, e como uma ponte para a transferência gênica entre diferentes níveis de ploidia (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003).

Dois tipos de poliploides podem ser reconhecidos, os aloploiploides, que são formados pela duplicação de genomas diferentes em híbridos (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003) e originados pela hibridação entre duas espécies seguido de duplicação cromossômica ou pela união de gametas não reduzidos (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003; ZHIHUI et al., 2011) e os autopoliploides, que são geralmente formados pela duplicação de um mesmo genoma (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003).

Os estudos atuais sugerem que, uma vez ocorrida a poliploidia, qualquer que seja o mecanismo envolvido, o genoma poliploide evolui rapidamente (CHEN; NI, 2006). Riddle e Birchler (2003) relatam que a nova constituição genômica produzida após a fertilização interespecífica leva a reorganizações genéticas e epigenéticas em consequência da combinação de dois diferentes genomas parentais dentro de um núcleo, podendo levar a alterações no número e distribuição de seqüências de DNA, o que pode causar conflitos intergênicos e perda de cromossomos.

Alterações epigenéticas podem contribuir de forma significativa para a sobrevivência e para o sucesso evolutivo de novos poliploides. A regulação epigenética, tanto da transcrição quanto pós-transcricional, implica em alterações na metilação do DNA, no estado de genes e/ou na dominância nucleolar. Essas mudanças fornecem maneiras eficazes e flexíveis de um neopoliploide responder rapidamente à enorme mudança no seu material genético, facilitando sua sobrevivência e reprodução (ZHIHUI et al., 2011).

Entre as alterações observadas após a hibridação estão: a eliminação de sequências de DNA (LEITCH; BENNETT, 2004); a eliminação de cromossomos (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000; GERNAND et al., 2005); a ocorrência de rearranjos cromossômicos (UDALL; QUIJADA; OSBORN, 2005); as alterações epigenéticas como metilação de sequências codantes e não codantes de DNA (LEVY; FELDMAN, 2004; LUKENS et al., 2006; ZHIHUI et al., 2011); o silenciamento gênico (GAETA et al., 2007) e a ativação de genes e retrotransposons que alteram a expressão de genes adjacentes (ADAMS; WENDEL, 2005).

A poliploidia pode levar ao silenciamento de genes “redundantes” para propiciar um equilíbrio de dosagem. Estudos mostraram que novos aloploiploides não conseguiriam lidar com o desafio de ter cópias a mais de genes e isso levaria ao silenciamento dos genes “redundantes” (PIKAARD, 2001), ou seja, as mudanças de ploidia parecem resultar no silenciamento epigenético (SCHEID et al., 1996). Além disso, elementos transponíveis muitas vezes são desencadeados em novos híbridos e podem se mover dentro de seu novo ambiente causando danos, o que acabaria causando o silenciamento gênico (PIKAARD, 2001).

Outra alteração que pode ocorrer em decorrência da poliploidia é a alteração nos padrões de metilação do DNA. Tal alteração seria mais frequente

em alotetraploides sintéticos do que em seus pais. Isto poderia estar relacionado com o silenciamento de genes “redundantes” em um genoma duplicado, ou talvez porque os sistemas de metilação do DNA são perturbados pelos efeitos da hibridação entre espécies e poliploidização (FULNECEK; MATYASEK; KOVALÍK, 2009).

Várias hipóteses têm sido desenvolvidas para explicar o processo de eliminação cromossômica em híbridos: inativação dos cromossomos por nucleases, assincronia no tempo da divisão celular, assincronia na síntese de nucleoproteínas levando a perda de cromossomos com segregação tardia, formação de fusos multipolares, separação espacial dos genomas durante a intérfase e metáfase e inativação parental específica de centrômeros (JIN et al., 2004; MOCHIDA; TSUJIMOTO; SASAKUMA, 2004).

A eliminação cromossômica é um fenômeno comum em híbridos interespecíficos de gramíneas, sendo uma ferramenta muito valiosa em programas de melhoramento genético (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000).

Muitos exemplos na literatura demonstram que a eliminação cromossômica de um genoma parental pode ser parcial ou total (PAGLIARINI; ADAMOWSKI; BATISTA, 1998; PETERS; BOBROWSKI; ROSINHA, 1999). Em muitos casos, a eliminação cromossômica é dependente do tecido e é influenciada pelas condições fisiológicas das células (SINGH, 2002).

A partir da eliminação parcial de cromossomos em híbridos interespecíficos podem-se obter linhas de adição (materiais contendo cromossomos ou partes de cromossomos extras) ou linhas de substituição (substituição de cromossomos entre espécies diferentes) (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Se o genoma completo de

um dos parentais no híbrido interespecífico for eliminado há a possibilidade de obtenção de haploides.

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

Na família Poaceae, a eliminação somática parcial ou total de cromossomos de uma das espécies parentais tem sido descrita em vários trabalhos, como em cruzamentos de *Hordeum lechleri* X *H. vulgare* (LINDELAURSEN; BOTHMER, 1999), *Avena sativa* X *Zea mays* (RIERALIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996), *Triticum aestivum* X *H. vulgare* (BADAEVA et al., 2008); *Triticum aestivum* X *Pennisetum glaucum* (GERNAND et al., 2005); *Lolium perenne* X *Festuca pratensis* (GUO; MIZUKAMI; YAMADA, 2005), entre outros.

Em cevada, Sanei et al. (2011) estudaram o mecanismo de eliminação seletiva dos cromossomos paternos durante o desenvolvimento inicial dos embriões de *Hordeum vulgare* X *Hordeum bulbosum*. Cromossomos de *H. bulbosum* são eliminados após a polinização independente da direção de cruzamento. Neste trabalho, os autores concluíram que a inatividade da proteína centromérica CENH3, no centrômero dos cromossomos *H. bulbosum*, desencadeia o processo de eliminação mitose-dependente dos cromossomos uniparentais em híbridos instáveis de *H. vulgare* X *H. bulbosum*.

Foi verificado que as duas espécies de *Hordeum* codificam duas variantes ativas de CENH3. Após a fertilização, todos os genes de CENH3 dos pais são transcricionalmente ativos. Ocorre tradução da CENH3 de *H. vulgare*, mas não é conhecido se ocorre tradução desta proteína em *H. bulbosum*. Há

então o carregamento de CENH3 para os centrômeros de *H. vulgare*, não ocorrendo o mesmo em *H. bulbosum*. Como resultado da assincronia do ciclo celular dos dois genomas parentais, a incorporação da CENH3, provavelmente, só ocorre nas regiões centroméricas de *H. vulgare* durante G2. Assim, como um resultado da inatividade dos centrômeros em híbridos instáveis, os cromossomos de *H. bulbosum* são eliminados na anáfase e irão formar micronúcleos, cuja cromatina será posteriormente degradada, e um embrião haplóide *H. vulgare* irá desenvolver-se (SANEI et al., 2011).

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

Gernand et al. (2005), trabalhando com híbridos provenientes de cruzamento entre trigo e milheto, observaram eliminação cromossômica uniparental, via formação de micronúcleos, com os cromossomos de milheto ocupando uma posição periférica nos núcleos interfásicos, acompanhado de heterocromatinização e fragmentação de DNA, devido à assincronia durante a replicação do DNA. Os autores relatam que a eliminação cromossômica iniciou-se logo após a fertilização e que os cromossomos ou fragmentos eliminados que não se alinham corretamente na metáfase, segregam tardiamente na anáfase e formam micronúcleos.

Em híbridos de trigo e aveia com milheto, Ishii et al. (2010) observaram a dinâmica dos cromossomos de milheto por meio da hibridização *in situ*. Do cruzamento com aveia, os sete cromossomos do milheto foram retidos. No entanto, em híbridos com espécies de Triticeae, a eliminação dos cromossomos

de milho ocorreu durante a embriogênese, através de rearranjos cromossômicos e não-disjunção na anáfase, juntamente com micronúcleos.

Os autores consideram que a eliminação cromossômica de híbridos de trigo e milho pode ser explicada pela participação da coesina. Nestes híbridos, a coesina ligada aos cromossomos de milho não pode dissociar normalmente durante a divisão celular, no entanto, os centrômeros estão ligados ao fuso e tendem a migrar para os pólos e, se a tensão para um dos pólos é mais forte que para o outro, os cromossomos passam para o pólo sem separação das cromátides-irmãs, causando não disjunção (ISHII et al., 2010).

A eliminação também é encontrada nos híbridos hexaploides artificiais originados do cruzamento de capim-elefante e milho. Abreu et al. (2006) estudaram o fenômeno da mixoploidia que ocorre nesses híbridos tratados com agentes antimitóticos e observaram números cromossômicos variando de 14 a 42 cromossomos nas metáfases analisadas, o que indica que houve duplicação seguida de eliminação cromossômica, confirmada por aberrações cromossômicas.

Os híbridos triplóides interespecíficos são estáveis e têm uma proporção de dois genomas de capim-elefante e um genoma de milho. No entanto, esta proporção é alterada após a poliploidização, devido à ação das substâncias antimitóticas, levando a eliminação de cromossomos nas células dos híbridos. A eliminação cromossômica ocorre, provavelmente, em razão tanto de problemas de proporções de genomas, quanto de controle da expressão gênica. A hipótese de divisão assíncronica foi descartada, porque nos híbridos triplóides os genomas A, A' e B segregam normalmente (ABREU et al., 2006).

Barbosa et al. (2007) tentaram restaurar a fertilidade dos híbridos de capim-elefante e milho para a produção de um híbrido hexaploide estável a partir da utilização de soluções de colchicina em diversas concentrações

aplicadas em seedlings, plântulas e segmentos caulinares. A duplicação cromossômica foi confirmada pela presença de polens viáveis em 38% das plantas sobreviventes. No entanto, os resultados mostraram que o hexaploide de capim-elefante e milheto demonstraram instabilidade no número cromossômico somático que varia de 14 a 42 cromossomos, sendo detectada mixoploidia também nestes híbridos.

Campos et al. (2009) trabalharam com um método mais eficiente para tratar híbridos triploides de capim-elefante e milheto com colchicina para obtenção de híbridos hexaploides. Para a identificação dos hexaploides, os autores utilizaram citometria de fluxo, contagem cromossômica e análise da morfologia de estômatos. Os autores observaram indícios de perda de DNA e conseqüente eliminação de seqüências genômicas em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto. No trabalho, os autores demonstraram, por meio da citometria de fluxo, reduções de 0,08 a 0,16 pg de DNA nos híbridos triploides em relação ao esperado para a média dos parentais, sugerindo uma provável eliminação de seqüências genômicas após a hibridação.

Bustamante (2009) avaliou híbridos hexaploides quanto ao número cromossômico e à frequência de alterações no ciclo celular. A autora verificou que os números cromossômicos somáticos dos genótipos hexaploides variaram de 14 a 42. Esse resultado indica que houve duplicação nos genótipos, mas os cromossomos foram sendo perdidos, tornando as plantas mixoploides tanto nos híbridos americanos, duplicados há mais tempo, quanto nos híbridos nacionais, mais recentes.

Com relação à frequência de alterações no ciclo celular, foi verificado que a perda de cromossomos deve-se à ocorrência de anormalidades, como cromossomos pegajosos, pontes e cromossomos não orientados na metáfase ou perdidos na anáfase e anáfase com ponte e que a porcentagem de anormalidades

observadas no ciclo celular dos hexaploides é menor que a porcentagem de anormalidades observadas na meiose para os mesmos híbridos (PAIVA et al., 2012). Além disso, foi constatado que não há variação no conteúdo de DNA entre os tecidos (raízes e folhas) de um mesmo híbrido (BUSTAMANTE, 2009). Andrade-Vieira et al. (2013, no prelo) trabalhando com híbridos hexaploides buscaram entender os mecanismos envolvidos na eliminação cromossômica nos híbridos interespecíficos duplicados entre capim-elefante e milho. Os autores mostraram que, nestes híbridos, o que ocorre é uma eliminação biparental e aleatória dos cromossomos. Tiwari et al. (2010) descreveram um fenômeno semelhante para anfiploides sintéticos entre *Triticum-Aegilops*, onde a eliminação ocorre nos híbridos com altos níveis de ploidia e a divisão equacional dos univalentes da metáfase I para a anáfase I é a principal causa da eliminação através da formação de pontes, fragmentos de cromatina, heterocromatinização progressiva e formação de micronúcleos. Além disso, cromossomos com genes de resistência são preferencialmente mantidos (TIWARI et al., 2010).

Adicionalmente, Leão et al. (2011) observaram a ocorrência de mixoploidia em consequência da eliminação cromossômica em combinações genômicas resultantes do retrocruzamento dos híbridos hexaploides com os parentais capim-elefante e milho. Combinações genômicas 4x e 5x são mixoploides e a variação do número de cromossomos dentro raça cromossômica 5x é maior do que em 4x. Após o retrocruzamento o número esperado de cromossomos era de $2n = 28$ para os tetraploides e $2n = 35$ para os pentaploides. No entanto, essas combinações apresentaram variação no número cromossômico, sendo que no pentaploide este número variou entre 20 e 34 (com número modal 27, 28 e 32) e do tetraploide entre 16 e 28 (com número modal 20 e 21). Além disso, as alterações genômicas que ocorrem na raça cromossômica

4x levam à maior redução na quantidade de DNA quando em comparação com 5x.

Os cromossomos podem ser eliminados do núcleo do híbrido em função de mecanismos genéticos que controlam as proporções genotípicas nas plantas híbridas (SALENTIJN et al., 2009), diferença no tempo do ciclo celular das duas espécies (GUPTA, 1969), do efeito aneuploidizante da colchicina (CAPERTA et al., 2006), de mecanismos epigenéticos e da ativação de elementos transponíveis (CHEN; NI, 2006).

2.3 Uso da hibridização *in situ* em *Pennisetum*

O desenvolvimento e aplicação de diferentes técnicas de coloração de cromossomos em plantas tem permitido a identificação de numerosos marcadores cromossômicos na análise de cariótipo (ASGHARI-ZAKARIA et al., 2002). Neste contexto, as técnicas de citogenética molecular, como a hibridização *in situ* (HIS), têm dado um grande impulso na identificação de marcadores cromossômicos e na elaboração de mapas físicos, uma vez que, com a HIS é possível localizar diversos genes e sequências repetitivas ao longo dos cromossomos (FISH) e auxilia na individualização dos cromossomos de cada um dos parentais (GISH) (GUERRA, 2004).

A técnica baseia-se na hibridização entre sondas de ácidos nucléicos marcadas com moléculas de fácil visualização (fluorocromos) e seqüências de DNA ou RNA intracelulares, verificando-se se a célula possui essa seqüência e qual a sua exata localização (GUERRA, 2004). Além disso, a hibridização *in situ* pode ser útil no entendimento de outros fenômenos decorrentes do evento de hibridação e poliploidia, como os rearranjos genômicos, os quais podem originar

novas combinações gênicas a serem exploradas no melhoramento genético (MARTEL et al., 2004).

No gênero *Pennisetum* a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido utilizada para determinar regiões cromossômicas associadas à apomixia em *Pennisetum squamulatum* (AKIYAMA et al., 2004). Akiyama et al. (2004) realizaram mapeamento de alta resolução em cromossomos paquitênicos de *P. squamulatum* e, utilizando sondas com sequências de genes para apomixia, revelaram extensos heteromorfismos cromossômicos em regiões associadas à apomixia. Outros autores fizeram mapeamentos físicos comparativos por meio da FISH estudando regiões específicas em plantas apomíticas (GOEL et al., 2006). Por fim, Akiyama et al. (2006) utilizaram a FISH com sondas de rDNA 45S, rDNA 18S e centromérica para identificar citótipos hexaploides e octaploides em populações provenientes de retrocruzamento entre *P. squamulatum* e *P. purpureum* ou *P. glaucum*.

Andrade-Vieira (2010) buscou obter marcas nos cromossomos de capim-elefante e milheto através do mapeamento dos genes de rDNA 45S e 5S por meio da FISH. Os sinais do rDNA 45S foram observados em posições subteloméricas do braço curto de quatro cromossomos em capim-elefante, milheto e híbrido interespecífico. No capim-elefante o gene de rDNA 5S foi mapeado em apenas um par cromossômico, localizando-se na região subtelomérica do cromossomo II, enquanto, no milheto, o gene de rDNA 5S foi localizado em dois pares cromossômicos, sendo um na região subtelomérica do braço curto do cromossomo IV e outro na região subtelomérica do cromossomo VI. Os genes de rDNA 45S são organizados em tandem e localizados na região organizadora do nucléolo (RON).

Ainda em híbridos de *Pennisetum glaucum* e *Pennisetum purpureum*, a técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH) auxiliaria no estudo da

individualização dos cromossomos dos genomas A, A' e B e na avaliação da homologia entre estes genomas. Por meio da GISH, Andrade-Vieira et al. (2013, no prelo) observaram a ocorrência de eliminação biparental em híbridos alohexaploides de *Pennisetum*, mostrando que a técnica contribui consideravelmente na identificação dos cromossomos envolvidos na adição ou na substituição.

2.4 Origem, evolução e relação genômica em Poaceae

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

O principal método para avaliar a afinidade genômica entre espécies tem sido o estudo do pareamento cromossômico nos híbridos. As relações genômicas são inferidas pelo grau de pareamento entre cromossomos parentais. Este pareamento em híbridos pode ser alossindético, quando ocorre pareamento entre cromossomos das espécies parentais, ou autossindético, quando ocorre pareamento dentro de um mesmo complemento parental (JAUHAR; JOPPA, 1996).

Na família Poaceae, muitos trabalhos têm sido feitos buscando entender a origem e relação dos genomas das espécies. Dentro da tribo Triticeae, pesquisas com genética comparativa determinaram relações precisas entre o genoma de *T. tauschii* (GILL et al., 1991), cevada (NAMUTH et al., 1994), centeio (DEVOS et al., 1993), *T. monococcum* (DUBCOVSKY et al., 1996) e, mais recentemente, *Aegilops umbellulata* (ZHANG et al., 1997), os quais partilham um número básico de sete cromossomos.

Na tribo Triticeae, que inclui os gêneros *Triticum* e *Aegilops*, destaca-se o trigo hexaploide (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 42$) com constituição genômica AABBDD, formado a partir de hibridizações espontâneas de espécies diplóides de *Triticum urartu* (genoma AA) com espécies de *Aegilops* spp (genoma BB) para formar o trigo tetraplóide (AABB). Hibridizações posteriores com *Aegilops tauschii* (genoma DD) produziram o trigo hexaplóide. Por meio de mapeamento molecular, foi constatado que os três genomas de trigo têm um conteúdo de genes altamente semelhante (DEVOS; GALE, 1997, 2000).

O gênero *Avena* L. (Poaceae) pertence à tribo Aveneae, contém espécies diploides, tetraploides e hexaploides, com número básico de cromossomos igual a sete ($x = 7$). Todas as espécies são de autopolinização, anuais, formam bivalentes na meiose e tem herança dissômica. Este gênero apresenta quatro genomas diferentes (A, B, C e D), sendo que dois estão presentes no nível diploide (A e C), três no nível tetraploide (AB e AC) e três no nível hexaploide (ACD), sendo que o genoma B só é encontrado nos tetraplóides e o genoma D só aparece nos hexaplóides. Dessa maneira, os autores buscaram examinar a diferenciação dos genomas A e B a fim de determinar se a discriminação dos cromossomos do genoma B é possível por meio de hibridização *in situ* (KATSIOTIS; HAGIDIMITIOU; HESLOP-HARRISON, 1997).

A partir dos resultados foi inferido que existe uma afinidade muito estreita entre os dois genomas e a presença de números baixos de trivalentes nos híbridos entre A e AB indica a presença de um forte controle do pareamento, assim como o que ocorre em trigo pelo efeito do gene *Ph1* que suprime pareamentos homeólogos. Além disso, os autores não encontraram diferenças marcantes entre os genomas A e B de espécies tetraplóides de aveia usando hibridização *in situ* e os mesmos sugerem que outros métodos devem ser usados para definir o grau de diferenciação dos genomas ou para classificar os genomas

e cromossomos (KATSIOTIS; HAGIDIMITIOU; HESLOP-HARRISON, 1997).

Fominaya, Vega e Ferrer (1988) também tentaram diferenciar os cromossomos dos genomas A e B de espécies de *Avena* por bandeamento C. As bandas localizadas nos telômeros apresentaram coloração mais intensa quando comparadas com as bandas centroméricas que apresentaram coloração mais sutil. No entanto, o padrão de bandas-C nos cromossomos de ambos os genomas foi muito semelhante tornando a diferenciação entre eles difícil de ser realizada.

Cada vez mais abrangente, comparações da estrutura dos genomas de gramíneas têm mostrado a existência de um grande número de rearranjos genômicos mesmo em espécies estreitamente relacionadas. A amplificação de elementos transponíveis e a poliploidia e duplicação segmentar seguida de perdas de genes são fenômenos normais na história das plantas, incluindo as gramíneas (BENNETZEN, 2007).

A poliploidia tem sido um dos principais fatores na evolução das linhagens de gramíneas, contribuindo com o aumento no número de genes, ativando elementos transponíveis, alterando o cenário epigenético levando a novos padrões de expressão gênica (KASHKUSH; FELDMAN; LEVY, 2002).

Outra ferramenta na genômica comparativa de gramíneas tem sido a colinearidade dos mapas genéticos. A colinearidade de genes observada para arroz e sorgo, por exemplo, dentro dos segmentos em relação aos parentes distantes das gramíneas ajudou a confirmar as relações dos genes ortólogos dentro da região comparada. Também demonstrou que as posições de genes foram retidas para a maioria dos locos nas gramíneas desde a sua divergência do ancestral comum (BENNETZEN, 2007). Devos e Gale (1997) também afirmam que, nas diferentes espécies dentro da família das gramíneas, o conteúdo gênico é altamente conservado.

No gênero *Pennisetum*, a distinção de tamanho dos cromossomos de milheto e capim-elefante torna possível estudar, no híbrido, o grau de pareamento alossindético e autossindético, uma vez que os cromossomos de milheto são maiores que os de outras espécies do gênero. Baseado no pareamento em híbridos triplóides foi inferido que os genomas A e A' são muito similares e a origem do genoma B ainda permanece desconhecida (JAUHAR; HANNA, 1998; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). A observação das configurações na diacinese e metáfase I mostraram que os bivalentes são formados por pareamento alossindético envolvendo todos os cromossomos dos genomas A e A' (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

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

O híbrido interespecífico geralmente tem maior similaridade, para características forrageiras, com o capim-elefante devido a maior contribuição genética (2/3 dos cromossomos) e dominância do genoma B do capim-elefante

sobre o genoma A do milho (GONZALEZ; HANNA, 1984). Estudos citogenéticos detalhados sobre os parentais e os híbridos obtidos de cruzamentos interespecíficos são de interesse para localizar marcas cromossômicas úteis para detectar a interação entre os genomas e auxiliar programas de melhoramento genético (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

Além disso, informações citogenéticas obtidas com análise genômica permitem uma melhor manipulação do germoplasma disponível, possibilitando explorar a variabilidade genética e contribuir com o aumento da produção e melhor adaptação das espécies às diferentes condições ambientais (TECHIO; DAVIDE, 2007).

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milheto tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends in Genetics: DNA differentiation & development**, Amsterdam, v. 21, n. 10, p. 539-543, Oct. 2005.
- AKIYAMA, Y. et al. High-resolution physical mapping in *Pennisetum squamulatum* reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 134, n. 4, p. 1733-1741, Apr. 2004.
- AKIYAMA, Y. et al. *Pennisetum squamulatum*: is the predominant cytotype hexaploid or octaploid? **Journal of Heredity**, Washington, v. 97, n. 5, p. 521-524, Apr. 2006.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Comportamento genômico em híbridos de capim-elefante e milheto (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae)**. 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* Schum. and *P. glaucum* (L.) R. Br. **Crop Science**, Madison, 2013. No prelo.
- ASGHARI-ZAKARIA, R. et al. Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in *Henrardia persica* (Boiss.) C.E. Hubb. **Caryologia**, Florence, v. 55, n. 4, p. 289-293, May 2002.

BADAEVA, E. D. et al. Analysis of introgression of *Aegilops ventricosa* Tausch. genetic material in a common wheat background using C-banding. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 117, n. 5, p. 803-811, July 2008.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 681-684, Sept. 2000.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* (Schumack) x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35, Feb. 2003.

BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, mar. 2007.

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

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

BUSTAMANTE, F. O. **Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.:** um estudo temporal e tecido específico. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

CAPERTA, A. D. et al. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, New York, v. 227, n. 2/4, p. 147-155, Mar. 2006.

CHEN, Z. J.; NI, Z. Mechanisms of genomics rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 240-252, Mar. 2006.

DEVOS, K. M. et al. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 6/7, p. 673-680, Feb. 1993.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Comparative genetics in the grasses. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 35, n. 1/2, p. 3-15, Sept. 1997.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Genome relationships: the grass model in current research. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 637-646, May 2000.

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

DUBCOVSKY, J. et al. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. **Genetics**, Austin, v. 143, n. 2, p. 983-999, June 1996.

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

FOMINAYA, A.; VEGA, C.; FERRER, E. Giemsa C-banded karyotypes of *Avena* species. **Genome**, Ottawa, v. 30, n. 5, p. 627-632, Oct. 1988.

FULNECEK, J.; MATYASEK, R.; KOVALÍK, A. Faithful inheritance of cytosine methylation patterns in repeated sequences of the allotetraploid tobacco correlates with the expression of DNA methyltransferase gene families from both parental genomes. **Molecular Genetic Genomics**, Berlin, v. 281, n. 4, p. 407-42, Apr. 2009.

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

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

GILL, K. S. et al. A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat (AABBDD). **Genome**, Ottawa, v. 34, n. 3, p. 362-374, June 1991.

GOEL, S. et al. Comparative physical mapping of the apospory-specific genomic region in two apomictic grasses: *Pennisetum squamulatum* and *Cenchrus ciliaris*. **Genetics**, Austin, v. 173, n. 1, p. 389-400, May 2006.

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

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

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

GUPTA, S. B. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 11, n. 1, p. 133-142, Mar. 1969.

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

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

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

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

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

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

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

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

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. **Genetics**, Austin, v. 160, n. 4, p. 1651-1659, Apr. 2002.

KATSIOTIS, A.; HAGIDIMITIOU, M.; HESLOP-HARRISON, J. S. The close relationship between the A and B genomes in *Avena* L. (Poaceae) determined by molecular cytogenetic analysis of total genomic, tandemly and dispersed repetitive DNA sequences. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 103-109, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NAMUTH, D. M. et al. Comparative RFLP mapping of *Hordeum vulgare* and *Triticum tauschii*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, n. 7/8, p. 865-872, Dec. 1994.

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

PAIVA, E. A. A. et al. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, Florence, v. 65, n. 2, p. 114-120, Sept. 2012.

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

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

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

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 569-611.

PIKAARD, C. S. Genomic change and gene silencing in polyploids. **Trends in Genetics**, [S.l.], v. 17, n. 12, p. 675-677, Dec. 2001.

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

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

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

SALENTIJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, Austin, v. 10, p. 48, Jan. 2009.

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

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

SCHEID, O. M. et al. A change of ploidy can modify epigenetic silencing. **Genetics**, Austin, v. 93, p. 7114-7119, July 1996.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 9, n. 1/2, p. 155-164, 2003.

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

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

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

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

TECHIO, V. H. et al. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.

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

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

ZHANG, H. et al. Relationship between the genomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 69-75, Jan. 1997.

ZHIHUI, L. et al. Polyploidization and epigenetics. **Genetics**, Austin, v. 56, n. 3, p. 245-252, Jan. 2011.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Eliminação cromossômica em híbridos poliplóides sintéticos de *Pennisetum purpureum* (Schumach) e *Pennisetum glaucum* ((L.) R. Br.) (Poaceae)

RESUMO

O capim-elefante e o milheto são forrageiras tropicais pertencentes ao gênero *Pennisetum*. A proximidade existente entre estas espécies permite a obtenção de híbridos interespecíficos explorados no melhoramento do capim-elefante. Esses híbridos são estéreis e a duplicação cromossômica, utilizada para a restauração da fertilidade, produz híbridos hexaploides parciais devido a eliminação de cromossomos. Mesmo após o retrocruzamento desses híbridos com os parentais capim-elefante e milheto são produzidos mixoploides. O objetivo deste trabalho foi estudar a dinâmica da eliminação dos cromossomos dos parentais capim-elefante e milheto durante o ciclo celular e o comportamento dos cromossomos portadores das regiões 45S e 5S no processo de eliminação cromossômica nos híbridos poliploides parciais. Foi observado que nos híbridos hexaploides parciais e naqueles originados de retrocruzamentos, as frequências e os tipos de alterações encontrados no ciclo celular são semelhantes. Tanto cromossomos de capim-elefante quanto de milheto são eliminados durante o ciclo celular, embora cromossomos de capim-elefante sejam eliminados em maior proporção. Cromossomos com as regiões de rDNA são preferencialmente mantidos no núcleo das células somáticas do híbrido hexaploide parcial.

Palavras-chave: Eliminação cromossômica. Ciclo celular. Região organizadora do nucléolo. Hibridização *in situ*.

ABSTRACT

The elephant grass and pearl millet are tropical forage belonging to the genus *Pennisetum*. The proximity between these species allows obtaining interspecific hybrids exploited in breeding elephant grass. These hybrids are sterile and chromosome doubling, used to restore fertility, produces hexaploid hybrids due to partial deletion of chromosomes. Even after these backcross hybrids with parentaiscapim elephant and millet are produced mixoploids. The aim of this work was to study the dynamics of the elimination of the parental chromosomes elephant grass and pearl millet during the cell cycle and behavior of chromosomes bearing regions of the 45S and 5S in the process of chromosome elimination in hybrids partial polyploids. It was observed that in the hybrid hexaploid partial and those originating from backcrosses, the frequencies and types of alterations found in the cell cycle are similar. Both chromosomes elephant grass as pearl millet are eliminated during the cell cycle, while elephant grass chromosomes are eliminated in greater proportion. Chromosomes with regions of rDNA are preferably kept in the nucleus of the somatic cell hybrid partial hexaploid.

Keywords: Elimination chromosome. Cell cycle. Nucleolus organizer regions. *In situ* hybridization.

1 INTRODUÇÃO

No gênero *Pennisetum* Rich. (Poaceae), o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach), com $2n = 4x = 28$ cromossomos e genomas A'A'BB (JAUHAR; HANNA, 1998) e o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), com $2n = 2x = 14$ cromossomos e genoma AA (POWELL; HANNA; BURTON, 1975), são espécies de grande importância econômica, sobretudo para a pecuária leiteira (PEREIRA et al., 2003).

A proximidade genética entre estas espécies favorece a produção de híbridos triploides ($2n = 3x = 21$ cromossomos e genomas AA'B) com características superiores aos parentais (PEREIRA et al., 2001, 2003). No entanto, tal combinação híbrida é estéril. A restauração da fertilidade é feita por meio de duplicação cromossômica, buscando-se produzir híbridos hexaploides que apresentem $2n = 6x = 42$ cromossomos e genomas AAA'A'BB. Como resultado dos protocolos de duplicação cromossômica, plantas hexaploides parciais (mixoploides), com números cromossômicos variando entre 14 e 42 são obtidas em consequência da eliminação cromossômica (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009).

A mixoploidia tem sido relatada tanto em híbridos poliploidizados a mais de 25 anos, quanto naqueles recentemente duplicados (BUSTAMANTE, 2009; PAIVA et al., 2012). Mesmo as combinações genômicas resultantes do retrocruzamento dos híbridos hexaploides parciais com os parentais capim-elefante e milheto apresentam variação no número de cromossomos, sendo que este número varia de 16 a 28 para os tetraploides e de 20 a 34 para os pentaploides (LEÃO et al., 2011).

Nos híbridos hexaploides parciais, a eliminação cromossômica é biparental e aleatória e tem sido atribuída a ploidia elevada obtida após a

poliploidização (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013, no prelo). Em aloploidos recém-sintetizados, especialmente aqueles com altos níveis de ploidia, a eliminação de cromossomos e de sequências específicas do genoma pode levar à estabilização e desenvolvimento de aniploides parciais (OLIVER et al., 2006; TIWARI et al., 2010). Nestes, também é comum se observar a redução no conteúdo de DNA nuclear em relação ao conteúdo total esperado pela soma dos parentais em função da eliminação de sequências genômicas (FELDMAN; LEVY, 2005; MA; GUSTAFSON, 2005; CAMPOS et al., 2009).

A eliminação de cromossomos e sequências também tem sido relacionada à ocorrência de anormalidades durante o ciclo celular (BUSTAMANTE, 2009) e na meiose (PAIVA et al., 2012). No entanto, não se sabe ainda a dinâmica da eliminação dos genomas parentais e de cromossomos específicos durante o ciclo celular do híbrido hexaploide parcial e nenhum estudo a esse respeito foi feito nas combinações genômicas resultantes dos retrocruzamentos desse híbrido com os parentais capim-elefante e milho.

Os cromossomos podem ser eliminados do núcleo híbrido em função de mecanismos genéticos que controlam as proporções genótípicas nas plantas híbridas (SALENTIJN et al., 2009), das diferenças no tempo do ciclo celular das duas espécies (GUPTA, 1969), do efeito aneuploidizante da colchicina (CAPERTA et al., 2006; SCHOENLEIN et al., 2003), de mecanismos epigenéticos e da ativação de elementos transponíveis (CHEN; NI, 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a frequência com que os genomas parentais estão envolvidos nas alterações do ciclo celular e o comportamento de cromossomos portadores dos sítios de rDNA 45S e rDNA 5S durante o processo de eliminação cromossômica em células somáticas de híbridos poliploides sintéticos de capim-elefante e milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As avaliações foram feitas em genótipos de capim-elefante (BAG 65), milheto (BN2), híbrido triploide (H3x) originado desse cruzamento e em híbridos mixploides de três diferentes ploidades: hexaploides parciais sintéticos (M6x), resultantes da poliploidização artificial de híbridos triploides; tetraploides parciais (M4x), resultantes do retrocruzamento do hexaploide parcial com o parental milheto; pentaploides parciais (M5x), resultantes do retrocruzamento do hexaploide parcial com a parental capim-elefante. O material botânico utilizado pertence ao Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE), situado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco - MG.

2.2 Ciclo celular e frequência de eliminação cromossômica por coloração convencional

A frequência de eliminação cromossômica no ciclo celular foi avaliada em dois híbridos tetraploides parciais (M4x-1 e M4x-2), dois pentaploides parciais (M5x-1 e M5x-2) e dois hexaploides parciais (M6x-1 e M6x-2). Raízes obtidas de sementes e/ou estacas foram coletadas e fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1) por pelo menos 24h. As lâminas foram preparadas pela técnica de secagem à chama (DONG et al., 2000) após maceração enzimática em pectinase:celulase (100U:200U) por 3h30min a 37°C em câmara úmida. As lâminas foram coradas com Giemsa 10% por 2 minutos.

Foram avaliadas 10 lâminas por genótipo, 500 células por lâmina, totalizando 5000 células por genótipo. A frequência de alterações no ciclo celular foi realizada de acordo com a porcentagem de pontes, cromossomos não orientados na metáfase, cromossomos perdidos na anáfase/telófase e micronúcleos. Os intervalos da média foram feitos com base no erro padrão médio.

Após avaliação, as alterações no ciclo celular foram marcadas e as lâminas armazenadas a temperatura ambiente para posterior uso na hibridização *in situ* genômica (GISH). As lâminas foram descoradas em ácido acético 45% por 10 minutos.

2.3 Obtenção de metáfases colchicínicas para avaliação das regiões de rDNA

O comportamento dos cromossomos portadores de rDNA 45S e 5S foi avaliado nos parentais capim-elefante (BAG 65) e milho (BN2), no híbrido triploide (H3x) resultante desse cruzamento e no hexaploide parcial (M6x-1). Raízes obtidas de sementes e/ou estacas foram coletadas e submetidas à solução 12,5 mg.L⁻¹ ciclohexamida: 150 mg.L⁻¹ 8-hidroxiquinoleína por 2h45min a 4°C e, posteriormente, fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1) como proposto por Techio et al. (2002). As lâminas foram preparadas pelo método de secagem à chama (DONG et al., 2000) com maceração enzimática em pectinase:celulase (100U:200U) por 40 minutos (milho) ou 3h30min (capim-elefante e híbrido interespecífico) a 37°C em câmara úmida.

O número de regiões de rDNA 45S e 5S foi avaliado em 5 metáfases dos genótipos parentais capim-elefante e milho e dos híbridos triploide e hexaploide parcial. O comportamento das regiões de rDNA 45S e 5S no ciclo

celular foi avaliado em pelo menos 5 células com micronúcleos no híbrido hexaploide parcial.

2.4 Hibridização *in situ*

A eliminação cromossômica foi avaliada utilizando-se como sonda DNA genômico de milho (GISH) e os rDNAs 45S e 5S (FISH). O DNA genômico de milho, cedido pela Embrapa Gado de Leite, foi marcado com biotina-16-dUTP através da reação de nick-translation. A sonda de rDNA 45S foi marcada com biotina-16-dUTP e a sonda de rDNA 5S marcada com digoxigenina-12-dUTP, ambas por reação de nick-translation.

A técnica de hibridização *in situ* foi realizada segundo Jiang et al. (1995). As lâminas foram desnaturadas em formamida 70% durante 1 min e 20 seg a 85°C seguido de desidratação em série alcoólica 70%, 90% e 100%. A mistura de hibridização (20 uL) contendo 50% de formamida, 10% sulfato de dextran, 50-100 ng de sonda marcada, 100 ng DNA de bloqueio em 2X citrato de sódio salino (SSC) foi aplicada e as lâminas cobertas com uma lamínulas de 24×32 mm e seladas com cola vinil. Após a hibridação a 37 ° C por, no mínimo, 16 h, as lâminas foram lavadas sequencialmente 2X SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente, 2X SSC durante 10 minutos à 42°C e 1X TNT durante 5 minutos a temperatura ambiente. A detecção da biotina foi realizada com estreptavidina conjugada com Alexafluor 488 e a detecção da digoxigenina foi feita com anti-dig conjugada com rodamina. As lâminas foram contrastadas com Vectashield (Vector Laboratories) contendo 1 ng / mL de 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) e avaliadas em microscópio de epifluorescência Eclipse E600 Nikon com comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI), 490/525 (Alexafluor 488) e (Rodamina). As imagens de interesse foram

digitalizadas por meio de câmera monocromática refrigerada Nikon DSQi1MC e processadas usando o software NIS-Element BR 4.00.03 (Nikon) e Adobe Photoshop CS3.

3 RESULTADOS

3.1 Identificação dos genomas envolvidos na eliminação cromossômica durante o ciclo celular

O estudo da eliminação cromossômica iniciou-se pela avaliação da frequência de anormalidades no ciclo celular, utilizando coloração convencional, nos seis híbridos poliplóides parciais. Em todos os híbridos foram encontradas alterações como micronúcleos, cromossomos atrasados na metáfase, cromossomos perdidos na anáfase/telófase e pontes na anáfase, com frequências totais de anormalidades semelhantes (Figura 1 e Tabela 1).

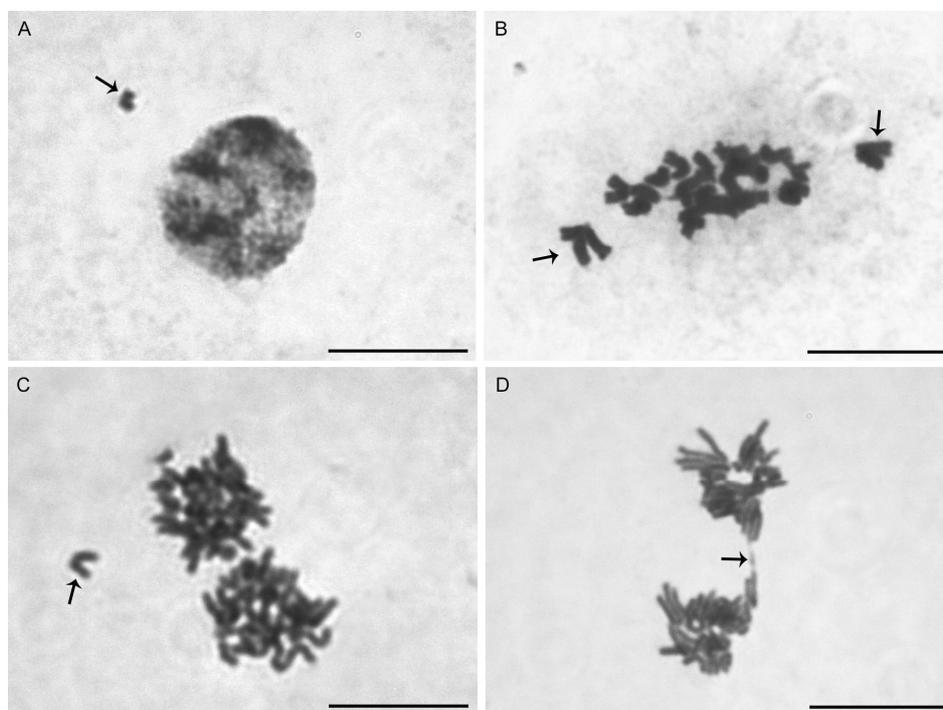


Figura 1: Anormalidades nas células somáticas dos híbridos poliploides parciais avaliados. Micronúcleo na prófase (A), cromossomos atrasados na metáfase (B), cromossomo perdido na anáfase (C), ponte na anáfase (D).

Tabela 1: Frequência (%) de alterações no ciclo celular dos híbridos tetraploides, pentaploides e hexaploides parciais. Intervalos feitos com base no erro padrão médio.

| Anormalidades | 4x-1 | 4x-2 | Total 4x | 5x-1 | 5x-2 | Total 5x | 6x-1 | 6x-2 | Total 6x |
|----------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|----------------------|
| Micronúcleo | 3,34 | 1,74 | 2,54 (±0,092) | 2,28 | 2,62 | 2,45 (±0,040) | 3,76 | 5,36 | 4,56 (±0,231) |
| C. Atrasados | 6,74 | 4,80 | 5,77 (±0,144) | 5,18 | 4,72 | 4,95 (±0,094) | 4,96 | 4,00 | 4,48 (±0,179) |
| C. Perdidos | 2,58 | 1,64 | 2,11 (±0,068) | 1,04 | 0,82 | 0,93 (±0,017) | 1,06 | 0,60 | 0,83 (±0,053) |
| Ponte | 0,50 | 0,28 | 0,39 (±0,025) | 0,36 | 0,90 | 0,63 (±0,035) | 0,90 | 0,50 | 0,70 (±0,043) |
| Total geral | | | 10,81 | | | 8,96 | | | 10,57 |

Nos híbridos M4x e M5x, as alterações mais frequentes foram cromossomos atrasados na metáfase (5,77% e 4,95%, respectivamente), enquanto, nos hexaploides parciais os micronúcleos representaram a anormalidade mais frequente (4,56%) (Tabela 1).

A avaliação das alterações cromossômicas por meio da hibridização *in situ* genômica mostrou que tanto cromossomos de capim-elefante quanto de milho estão envolvidos no processo de eliminação durante o ciclo celular em todos os híbridos avaliados (Figuras 2, 3 e 4).

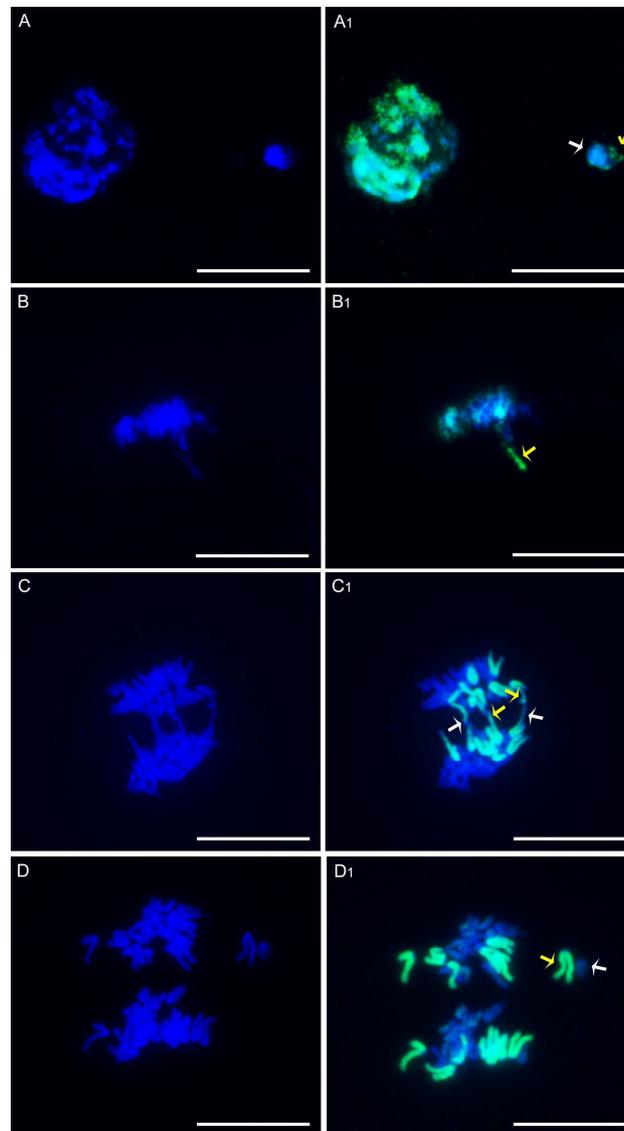


Figura 2: Anormalidades no ciclo celular do híbrido tetraploide parcial marcadas com sonda de milho. Micronúcleo na prófase (A), cromossomo atrasado na metáfase (B), cromossomos perdidos na anáfase (C), pontes na anáfase (D). Setas brancas indicam cromossomos de capim-elefante e setas amarelas indicam cromossomos de milho. Barra: 20 μ m.

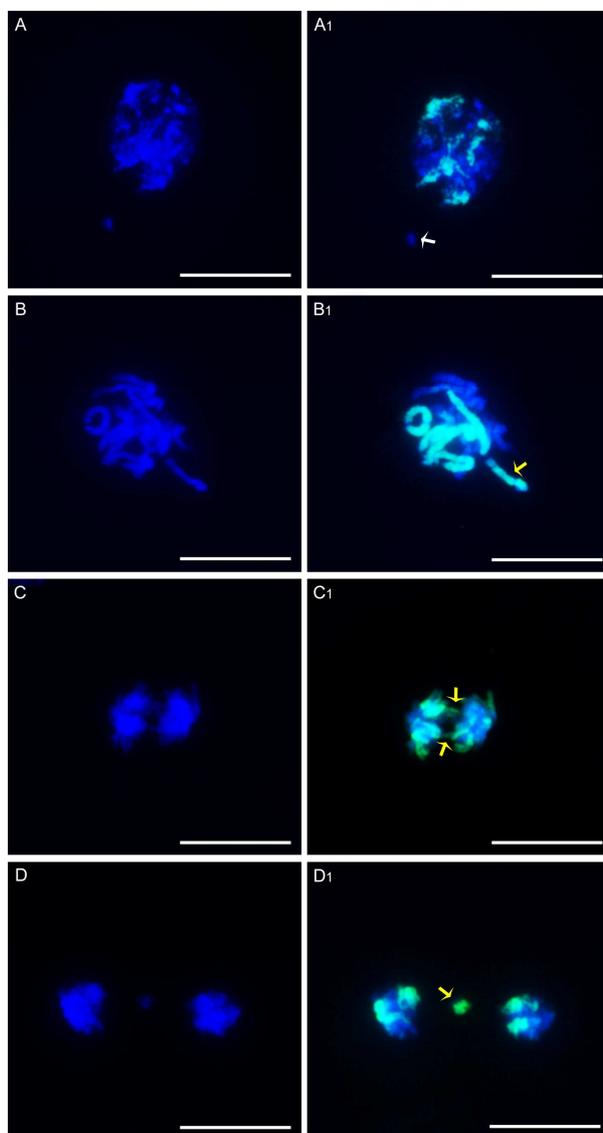


Figura 3: Anormalidades mitóticas no híbrido pentaploide marcadas com sonda de milho. Prófase com micronúcleo (A), cromossomo atrasado na metáfase (B), pontes na anáfase (C), micronúcleo na telófase (D). Setas brancas indicam cromossomos de capim-elefante e setas amarelas indicam cromossomos de milho. Barra: 20 μ m.

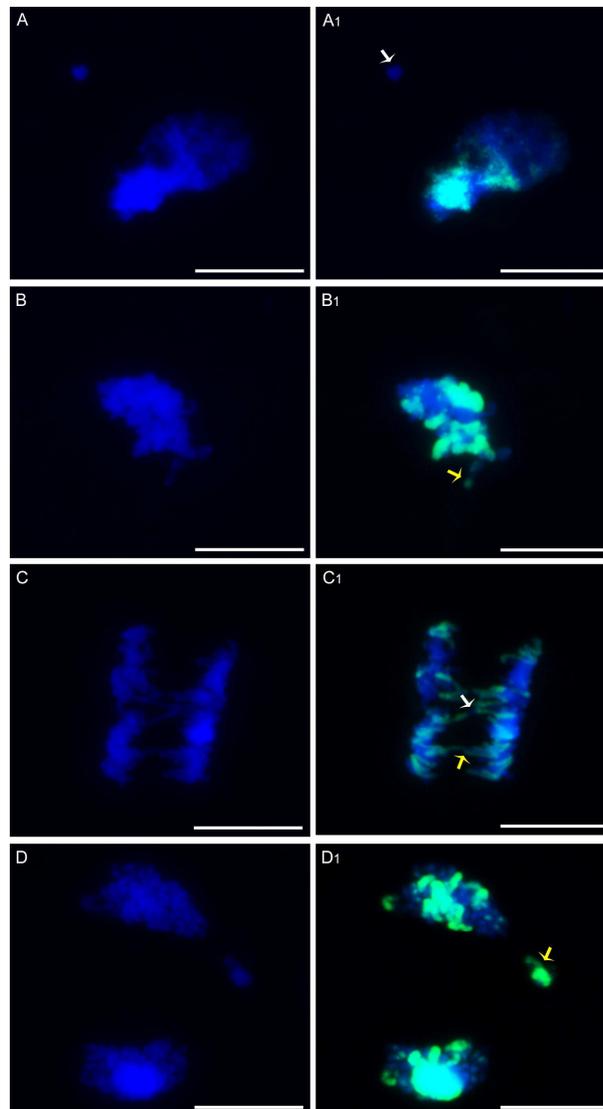


Figura 4: Anormalidades mitóticas no híbrido hexaploide marcadas com sonda de milho. Micronúcleo na prófase (A), cromossomos atrasados na metáfase (B), pontes na anáfase (C), micronúcleo na telófase (D). Setas brancas indicam cromossomos de capim-elefante e setas amarelas indicam cromossomos de milho. Barra: 20 μ m.

Considerando todos os genótipos avaliados após a GISH, verificou-se que entre as células que apresentaram anormalidades, em 39,65% delas foram observados cromossomos de capim-elefante em processo de eliminação ou eliminado, em 36, 21%, de milho, e em 24,14%, de ambos os parentais (Tabela 2).

Tabela 2: Frequência (%) dos genomas parentais envolvidos nas alterações durante o ciclo celular para os híbridos parciais tetraploides, pentaploides e hexaploides avaliados após a GISH.

| Genoma | Micronúcleo | C. Atrasados | C. Perdidos | Ponte | Total Genomas |
|----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------|----------------------|
| Capim-elefante (A'A'BB) | 16,09 (28) * | 8,05 (14) * | 11,49 (20) * | 4,02 (7) * | 39,65 |
| Milho (AA) | 13,79 (24) | 7,47 (13) | 8,05 (12) | 6,90 (12) | 36,21 |
| Ambos | 12,07 (21) | 5,75 (10) | 5,17 (2) | 1,15 (2) | 24,14 |

*número de células avaliadas

O genoma de capim-elefante foi predominantemente observado nas alterações, com exceção das pontes, onde o genoma de milho foi mais frequente.

3.2 Comportamento de cromossomos portadores de sítios de rDNA durante o ciclo celular dos híbridos hexaploides parciais

Para acompanhar os cromossomos portadores de regiões de rDNA no ciclo celular, inicialmente foi realizada a FISH em metáfases colchicínicas com o intuito de determinar o número de sítios 45S e 5S presentes nos parentais, no híbrido triploide e no híbrido hexaploide parcial. Tanto no capim-elefante quanto no milho foram observados quatro cromossomos contendo os genes para rDNA 45S, sendo que a intensidade de sinal observada é maior em dois cromossomos, e dois cromossomos contendo os genes para rDNA 5S. Essa quantidade de sinais e a diferença no tamanho dos sítios de rDNA 45S está de acordo com a literatura (ANDRADE-VIEIRA, 2010; LIU et al., 1996). O híbrido triploide apresentou, como esperado, quatro cromossomos com locos de rDNA 45S e dois cromossomos com locos de rDNA 5S, mapeados próximos ao telômero. Nas células do híbrido hexaploide parcial apresentando número completo de cromossomos, isto é 42, observou-se o dobro de sinais encontrados no híbrido triploide, sendo oito cromossomos com sinais de rDNA 45S e quatro cromossomos com sinais de rDNA 5S (Figura 5).

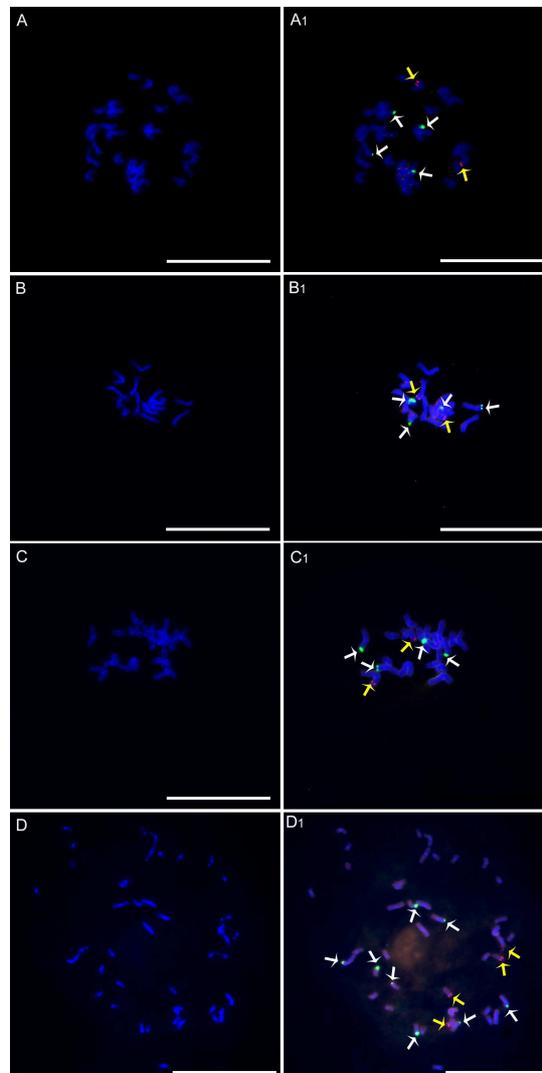


Figura 5: Número de regiões rDNA 45S (setas brancas) e rDNA 5S (setas amarelas) em células de (A) *P. purpureum* ($2n = 4x = 28$), (B) *P. glaucum* ($2n = 2x = 14$), (C) Híbrido interespecífico ($2n = 3x = 21$) e (D) Híbrido hexaploide parcial (metáfase com 42 cromossomos) ($2n = 6x = 42$). Metáfases coradas com DAPI e sobreposição das imagens evidenciando os sinais (A1, B1, C1, D1). Barra: 20 μm .

Nas metáfases com números variáveis de cromossomos (39 a 42) do hexaploide parcial, o número de sinais permaneceu inalterado em relação às células com número completo de cromossomos, isto é, quatro pares cromossômicos com sinais de rDNA 45S e dois pares cromossômicos com sinais de rDNA 5S. Isso mostra que cromossomos com genes de importância para a célula, como os genes da região organizadora do nucléolo, não foram eliminados nas células somáticas deste híbrido (Figura 6).

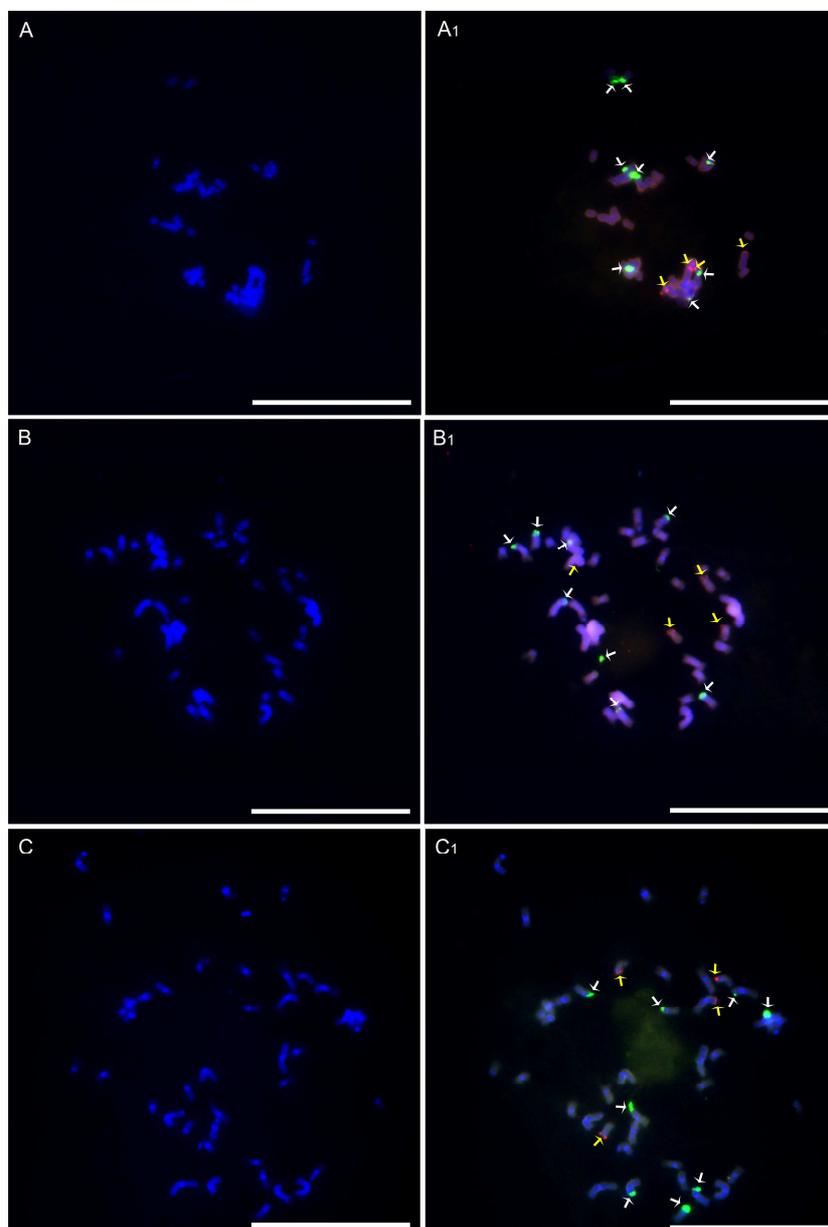


Figura 6: Metáfases do híbrido hexaploide parcial mostrando as regiões de rDNA 45S (setas brancas) e 5S (setas amarelas). Metáfases observadas no DAPI com 39 (A), 40 (B) e 41 (C) cromossomos. Cromossomos com os sinais das sondas (A1, B1 e C1). Barra: 20 μ m.

A fim de confirmar os resultados encontrados nas metáfases, a FISH, usando sondas do rDNA 45S e rDNA 5S, também foi realizada em células do ciclo celular do M6x apresentando micronúcleos. Não foram observados sinais das sondas nos micronúcleos (Figura 7).

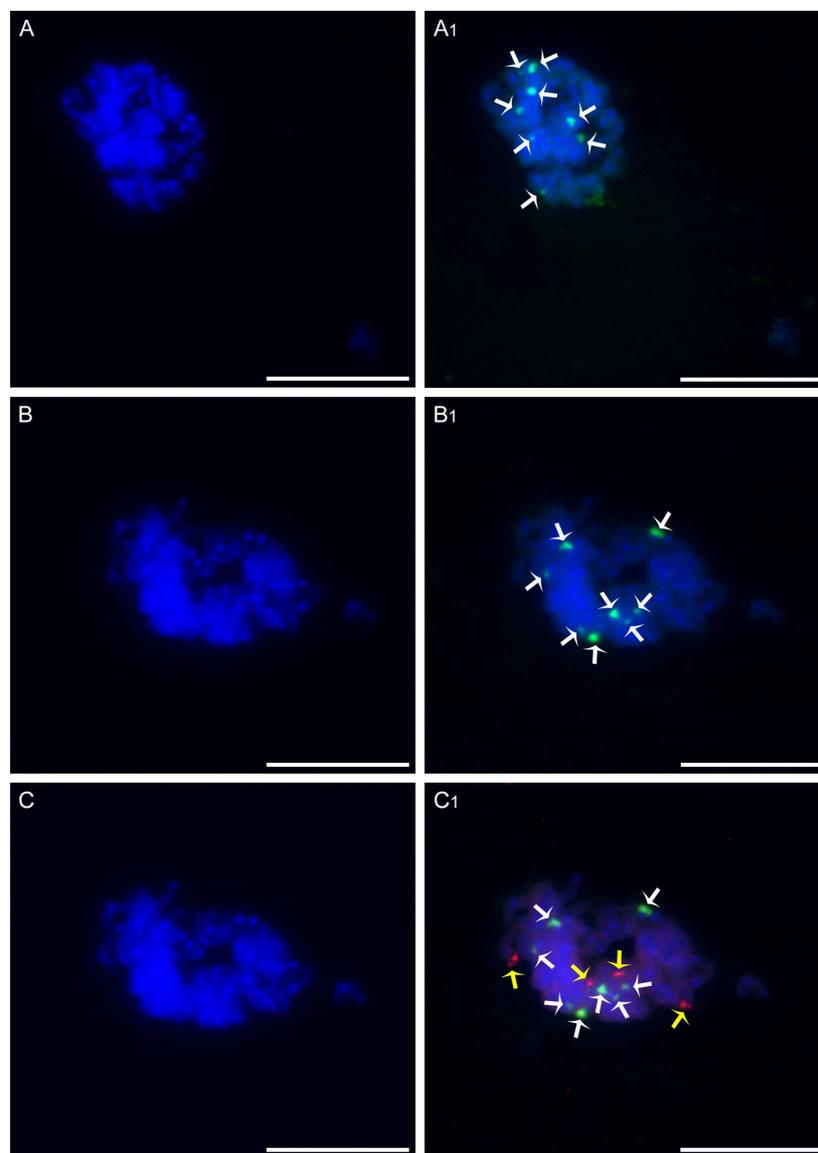


Figura 7: Células somáticas do híbrido hexaploide parcial com micronúcleos. Note que os sinais de rDNA 45S (setas brancas) (A1, B1 e C1) e rDNA 5S (setas amarelas) (C1) permaneceram nos núcleos. Células coradas com DAPI (A, B e C). Sobreposição das imagens (A1, B1 e C1). Barra: 20 μ m.

4 DISCUSSÃO

Os resultados observados confirmam a mixoploidia apresentada pelos híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho submetidos à duplicação cromossômica e a sua relação com as alterações no ciclo celular. Observa-se também que as alterações observadas nas combinações híbridas resultantes de retrocruzamentos são as mesmas e em proporções semelhantes às dos hexaploides parciais.

As alterações no ciclo celular encontradas assemelham-se às descritas por Bustamante (2009) para outros híbridos hexaploides parciais, apesar das diferenças com relação à frequência das alterações. A autora encontrou como alterações mais frequentes cromossomos perdidos e pegajosos, enquanto que neste trabalho a maioria das alterações foi representada pela presença de micronúcleos.

Tanto nos híbridos estudados neste trabalho, quanto nos híbridos avaliados por Bustamante (2009), a frequência de alterações no ciclo celular é bem menor do que aquela encontrada na meiose por Paiva et al. (2012), que relataram alterações em torno de 67%.

Principalmente nas metáfases e telófases foi possível observar que cromossomos inteiros estavam em processo de eliminação e as pontes nas anáfases e telófases permitiram inferir a eliminação de fragmentos e cromossomos inteiros (Figura 1). As pontes provavelmente ocorrem entre os genomas A de milho e A' de capim-elefante devido a homeologia existente entre estes genomas. No entanto, a eliminação de cromossomos e fragmentos somente pode ser efetivamente constatada pela presença de micronúcleos.

A porcentagem relativamente alta de eliminação de ambos os genomas em todos os híbridos confirma a eliminação biparental já descrita para outros

híbridos hexaploides parciais entre capim-elefante e milho (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013, no prelo) e demonstra que tal forma de eliminação também está presente em híbridos provenientes dos retrocruzamentos do hexaploide parcial com os parentais milho e capim-elefante.

Andrade-Vieira et al. (2013, no prelo) avaliaram metáfases colchicínicas de quatro híbridos com eliminação cromossômica biparental, sendo que dois deles eliminavam número maior de cromossomos em função da maior eliminação de cromossomos do genoma de capim-elefante. Esse padrão de eliminação também foi observado no ciclo celular dos híbridos avaliados neste trabalho, ou seja, maior eliminação de cromossomos de capim-elefante.

Os genomas A do milho e A' do capim-elefante são homeólogos e, após a duplicação, vários genes estariam numa dose quatro vezes maior no núcleo híbrido. Como consequência, para manter a homeostase, a célula eliminaria o excesso de genes que levariam a um desequilíbrio fisiológico nos híbridos. Além disso, os híbridos hexaploides geralmente têm maior similaridade, para as características forrageiras, com o capim-elefante devido a dominância do genoma B sobre o genoma A (GONZALEZ; HANNA, 1984; LEÃO et al., 2011). Considerando estes fatores e relacionando ao fato de haver uma maior eliminação de cromossomos de capim-elefante, poder-se-ia inferir que os cromossomos que estão sendo eliminados sejam principalmente pertencentes ao genoma A'. Essa eliminação, provavelmente, faz parte do processo de diploidização, o que resultaria na estabilidade do híbrido.

A eliminação biparental e aleatória de cromossomos também foi observada em anfiploides sintéticos de *Triticum aestivum* – *Aegilops kotschy*. Todos os genomas ABDU^kS^k foram eliminados, embora os genomas A e B de *T. aestivum* tivessem permanecido quase intactos. Tiwari et al. (2010) também atribuíram a eliminação cromossômica aos altos níveis de ploidia, já que dos

anfiploides avaliados, os híbridos decaploides apresentaram eliminação cromossômica, enquanto, em combinações genômicas similares com menores níveis de ploidia não foram observadas eliminações (TIWARI et al., 2010).

O processo de poliploidização é acompanhado de um extensivo rearranjo genômico, de modo que, após a poliploidização, alterações rápidas ocorreriam no genoma buscando estabilizá-lo (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003). Reorganizações genéticas e epigenéticas ocorrem em consequência da combinação de dois diferentes genomas parentais dentro de um núcleo, podendo levar a alterações no número e distribuição de seqüências de DNA, o que pode causar conflitos intergênicos e perda de cromossomos (RIDDLE; BIRCHLER, 2003).

Apesar da eliminação biparental e aleatória de cromossomos observada nos híbridos poliploidizados de *Pennisetum* estudados, os cromossomos que carregam genes de rDNA não foram eliminados nas células somáticas. Genes de rDNA 18S-5,8S-26S estão localizados na região organiadora do nucléolo e dão origem à constrição secundária observada em alguns cromossomos metafásicos. A permanência de cromossomos específicos também foi relatada para anfiploides sintéticos de *Triticum aestivum* – *Aegilops kotschy*. Em alguns híbridos, cromossomos que continham o gene de resistência ao oídio foram preferencialmente retidos (TIWARI et al., 2010).

Pelos resultados obtidos neste e em outros trabalhos, verifica-se que os genótipos híbridos poliploidizados estão em processo ativo de reorganização genômica, eliminando regiões em excesso, seja por meio da eliminação de cromossomos inteiros ou pela perda de seqüências, buscando uma maior estabilidade frente a essa nova condição. Além disso, os híbridos hexaploides parciais avaliados neste trabalho constituem genótipos promissores para o melhoramento, já que apresentam frequência de alterações relativamente baixa

durante o ciclo celular, número cromossômico próximo ao esperado (39 a 42), o que, futuramente, poderia levar à origem de um anfiploide parcial estável. Sugere-se o uso de outros marcadores buscando identificar os cromossomos envolvidos nas eliminações e ainda o uso de técnicas, como o bandeamento Ag-NOR, para avaliar se todos os sítios encontrados de rDNA 45S são ativos, incluindo-se híbridos que eliminam maiores e menores números de cromossomos.

5 CONCLUSÕES

A eliminação de cromossomos e de sequências nos híbridos hexaploides parciais entre capim-elefante e milho ocorre como consequência de alterações cromossômicas encontradas no ciclo celular.

Os descendentes de retrocruzamentos apresentam frequência e tipos de alterações semelhantes aos híbridos hexaploides parciais.

Tanto cromossomos de milho (genoma A) quanto cromossomos de capim-elefante (genomas A'B) são eliminados nos híbridos hexaploides parciais e naqueles resultantes de retrocruzamentos no ciclo celular.

Cromossomos de capim-elefante são predominantemente eliminados em todos os híbridos poliploides parciais.

Cromossomos contendo os genes de rDNA 45S e rDNA 5S são preferencialmente mantidos nos núcleos de células somáticas do híbrido hexaploide parcial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro a pesquisa e concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. C. et al. Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milho tratados com agentes antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Comportamento genômico em híbridos de capim-elefante e milho (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae)**. 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* Schum. and *P. glaucum* (L.) R. Br. **Crop Science**, Madison, 2013. No prelo.

BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milho. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 365-372, mar. 2007.

BUSTAMANTE, F. O. **Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum* spp.:** um estudo temporal e tecido específico. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

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

CAPERTA, A. D. et al. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. **Protoplasma**, Austin, v. 227, n. 2/4, p. 147-155, Mar. 2006.

CHEN, Z. J.; NI, Z. Mechanisms of genomics rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 240-252, Mar. 2006.

DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 7, p. 1001-1007, Nov. 2000.

FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Allopolyploidy: a shaping force in the evolution of wheat genomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n. 1/3, p. 250-258, 2005.

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

GUPTA, S. B. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 11, n. 1, p. 133-142, Mar. 1969.

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

JIANG, J. et al. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. **Genetics**, Austin, v. 92, n. 10, p. 4497-4491, May 1995.

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

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

MA, X. F.; GUSTAFSON, J. P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidization. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, n. 1/3, p. 236-249, 2005.

OLIVER, R. E. et al. Molecular cytogenetic characterization of four partial wheat- *Thinopyrum ponticum* amphiploids and their reactions to *Fusarium* head blight, tan spot and *Stagonospora nodorum* blotch. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 8, p. 1473-1479, May 2006.

PAIVA, E. A. A. et al. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, Firenze, v. 65, n. 2, p. 114-120, Sept. 2012.

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

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

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

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

SALENTIJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, Austin, v. 10, p. 48, Jan. 2009.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 9, n. 1/2, p. 155-164, 2003.

SCHOENLEIN, P. V. et al. Radiation therapy depletes extrachromosomally amplified drug resistance genes and oncogenes from tumor cells via micronuclear capture of episomes and double minute chromosomes. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, New York, v. 55, n. 4, p. 1051-1065, Mar. 2003.

TECHIO, V. H. et al. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.

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

ARTIGO 2

Homologia genômica em *Pennisetum* spp Rich. (Poaceae)

RESUMO

O gênero *Pennisetum* engloba duas forrageiras tropicais economicamente importantes, *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) com $2n=4x=28$ cromossomos e genomas A'A'BB e *Pennisetum glaucum* (milheto) com $2n=2x=14$ cromossomos e genoma AA. A proximidade genética existente entre elas permite a obtenção de híbridos ($2n=3x=21$) com qualidade forrageira superior aos genitores. O estudo das relações genômicas fornece subsídios para o conhecimento das relações filogenéticas e evolução, sendo também útil em programas de melhoramento buscando a introgressão gênica. No que diz respeito ao capim-elefante e milheto, a homeologia entre os genomas A e A' e entre estes e o genoma B foi relatada por meio de técnicas citogenéticas convencionais. O objetivo deste trabalho foi demonstrar por meio de hibridização *in situ* genômica (GISH), o grau de homologia existente entre esses genomas. Os resultados confirmaram a homologia entre os genomas A do milheto e A'B do capim-elefante e mostraram que há diferenças na distribuição e proporção das regiões homólogas após a hibridação.

Palavras-chave: Homologia genômica. *Pennisetum glaucum*. *Pennisetum purpureum*. Híbridos interespecíficos. Hibridização *in situ* genômica.

ABSTRACT

The genus *Pennisetum* includes two economically important tropical forage, *Pennisetum purpureum* (elephant grass) with $2n = 4x = 28$ chromosomes and genomes A'A'BB and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) with $2n = 2x = 14$ chromosomes and genomes AA. The genetic proximity between them allows to obtain hybrids ($2n = 3x = 21$) with higher quality forage to parents. The study of genomic relationships provides subsidies to the knowledge of the phylogenetic relationships and evolution, and is also useful in breeding programs seeking gene introgression. With regard to the elephant grass and millet, the homeologia between genomes A and A 'and between these and the B genome was reported by conventional cytogenetic techniques. The objective of this study was to demonstrate through genomic in situ hybridization (GISH), the degree of homology between this genomes. The results confirmed the homology between the genomes A of pearl millet and A'B elephant grass and showed that there are differences in the distribution and proportion of homologous regions after hybridization.

Keywords: Homeology. *Pennisetum glaucum*. *Pennisetum purpureum*. Genomic *in situ* hybridization.

1 INTRODUÇÃO

Entre as espécies do gênero *Pennisetum* Rich (Poaceae), as de maior importância econômica são o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach), utilizado como forrageira e o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) utilizado como cereal e forrageira (PEREIRA et al., 2003).

O milheto é uma espécie anual, alógama, com complemento cromossômico de $2n = 2x = 14$ e genoma AA, constituindo o pool gênico primário dentro do gênero. O capim-elefante é uma espécie perene, alógama, com um complemento cromossômico de $2n = 4x = 28$ e genomas A'A'BB pertencente ao pool gênico secundário (MARTEL et al., 2004).

Mesmo integrando conjuntos gênicos distintos e diferindo quanto ao nível de ploidia, o capim-elefante e o milheto são sexualmente compatíveis, produzindo híbridos triploides naturais ($2n = 3x = 21$, genoma AA'B) e estéreis (HANNA, 1987; MARTEL et al., 2004). A facilidade em produzir híbridos sintéticos tem sido explorada pelos melhoristas, uma vez que estes apresentam qualidade forrageira superior aos genitores (PEREIRA et al., 2003).

A proximidade genômica entre *P. glaucum* e *P. purpureum* foi demonstrada por técnicas moleculares e sugere uma origem comum para as duas espécies (HARLAN; DE WET, 1971; MARTEL et al., 2004). Esta proximidade genética também foi demonstrada por análises meióticas no híbrido triplóide. Nas diacineses e metáfases I do híbrido formam-se, geralmente, sete bivalentes do pareamento entre os cromossomos dos genomas A e A' do milheto e capim-elefante, respectivamente, e sete univalentes do genoma B do capim-elefante (JAUHAR, 1968, 1981; PANTULU, 1967; SREE RANGASAMY, 1972; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005). A ocorrência, mesmo pouco frequente, de trivalentes e números de bivalentes superiores a sete sugerem pareamento

tanto alo- quanto autossindético entre os genomas A, A' e B (SETHI; KALIA; GHAI, 1970; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, 2006).

Buscando melhor compreender as relações evolutivas existentes entre estas espécies, o objetivo deste trabalho foi demonstrar o grau de homologia entre os genomas A, A' e B de capim-elefante e milheto, por meio de hibridização *in situ* genômica em células somáticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e DNAs genômicos (será que pode?)

As avaliações foram feitas em metáfases mitóticas dos parentais capim-elefante (BAG 65) e milheto (BN2) e do híbrido triploide (BAG 65 x BN2) originado desse cruzamento. O material botânico e DNAs genômicos foram cedidos pelo Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite, campo experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco-MG.

2.2 Obtenção de metáfases colchicínicas

Raízes provenientes de sementes ou estacas de BAG 65, BN2 e híbrido triploide foram coletadas e submetidas à solução de 12,5 mg.L⁻¹ de ciclohexamida: 150 mg.L⁻¹ de 8-hidroxiquinoleína por 2h45min a 4°C e, posteriormente fixadas em solução de etanol:ácido acético (3:1) como proposto por Techio et al. (2002). As lâminas foram preparadas pelo método de secagem à chama (DONG et al., 2000) com maceração enzimática em pectinase:celulase

(100U:200U) por 40 minutos (milheto) ou 3h30min (capim-elefante e híbrido interespecífico) a 37°C em câmara úmida.

2.3 Hibridização *in situ* genômica

Para o estudo de homologia genômica, DNAs genômicos de milheto e de capim-elefante foram marcados com biotina-16-dUTP através da reação de nick-translation obtendo-se as sondas genômicas.

A técnica de hibridização foi realizada segundo Jiang et al. (1995). A preparação cromossômica foi desnaturada com 100µL de formamida 70% em 2X SSC em estufa a 85°C por 1 min e 20 seg. Posteriormente as lâminas foram lavadas em etanol 70% a -20° C por 5 minutos, seguidas de duas lavagens em etanol 90% e 100%, 5 minutos cada, para remoção da formamida. A mistura de hibridização foi preparada com 10 µL de formamida 100%, 2 µL de 20X SSC pH=7,0, 2 µL de sonda marcada com biotina e 4 µL de dextran sulfato 50%, totalizando 18 µL da mistura que foi desnaturada a 95°C por 8 minutos, seguida de 5 minutos no gelo. Após a desnaturação a mistura foi aplicada sobre a preparação cromossômica deixando-se hibridizar por, no mínimo, 16 horas a 37°C em câmara úmida.

As lavagens de estringência foram realizadas sob agitação com 2X SSC por 5 minutos, 2X SSC a 42°C por 10 minutos e 1X TNT por 5 minutos.

A detecção da biotina foi realizada com estreptavidina conjugada com Alexafluor 488.

As lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI e avaliadas em microscópio de epifluorescência Eclipse E600 Nikon usando filtros nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para DAPI e 490/525 para FITC. As imagens de interesse foram digitalizadas por meio de câmera

monocromática refrigerada Nikon DSQi1MC e processadas usando o software NIS-Element BR 4.00.03 (Nikon) e Adobe Photoshop CS3.

Para avaliar o grau de homologia entre os genomas A, A' e B, foram medidos os cromossomos de 5 metáfases de cada genótipo e a proporção ocupada pela sonda genômica no programa Image Tool 3.0.

3 RESULTADOS

Após a hibridização *in situ* genômica (GISH) em metáfases de capim-elefante utilizando como sonda o DNA genômico de milho (genoma A) distinguiu-se os 14 cromossomos pertencentes ao genoma A' do capim-elefante. Estes apresentaram a região centromérica e adjacências fortemente marcadas pela sonda. Os outros 14 cromossomos do genoma B do capim-elefante ou não foram marcados pela sonda ou apresentaram alguns pequenos e fracos sinais dispersos ao longo do cromossomo (Figura 1, A1). Foi possível identificar o par cromossômico X por apresentar todo o braço curto marcado pela sonda (em destaque na Figura 1, A1). Andrade-Vieira (2010) afirma que o cromossomo X de capim-elefante pode ser facilmente distinguido nas metáfases por apresentar uma banda DAPI forte na região terminal do braço longo.

Todos os 14 cromossomos do milho apresentaram-se marcados quando a GISH foi realizada utilizando como sonda o DNA genômico de capim-elefante. Alguns cromossomos apresentaram marcação mais forte que outros, mas todos tinham alguma região hibridizada. Na maioria dos cromossomos, as marcações foram observadas nas regiões centroméricas e adjacências. Em alguns a sonda se ligou apenas no braço curto e em outros, ocupou quase a totalidade dos cromossomos (Figura 1, B1).

A GISH também foi realizada no híbrido triploide proveniente do cruzamento entre capim-elefante e milho usando como sonda DNA genômico de milho. A sonda marcou por completo os 7 cromossomos provenientes de milho e, dos 14 cromossomos de capim-elefante, a maioria apresentou marcações evidentes na região centromérica e adjacências. Também no híbrido triploide, o cromossomo X foi identificado (em destaque na Figura 1, C1). Nas células do híbrido interespecífico, é evidente a diferença de tamanho entre os cromossomos dos parentais, sendo os do milho maiores (Figura 1C).

Para averiguar o grau de homologia entre os genomas A, A'e B, realizou-se medições nos cromossomos marcados pelas sondas de milho e de capim-elefante em todo o complemento cromossômico dos parentais e do híbrido triploide resultante desse cruzamento (Tabela 1).

Tabela 1: Proporção dos cromossomos marcada pelos genomas A'B em milho (BN2) e proporção dos cromossomos marcada pelo genoma A em capim-elefante (BAG 65) e híbrido interespecífico (3x).

| Genótipo | Comprimento total dos cromossomos | Comprimento total da sonda | Porcentagem marcada pela sonda |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Milho | | | |
| met 1 | 62,00 | 36,27 | 59% |
| met 2 | 56,73 | 35,10 | 62% |
| met 3 | 68,02 | 43,97 | 65% |
| met 4 | 49,33 | 34,23 | 69% |
| met 5 | 58,99 | 36,88 | 63% |
| Média | 59,01 | 37,29 | 63% |
| Capim-elefante | | | |
| met 1 | 52,13 | 15,77 | 30% |
| met 2 | 58,63 | 17,82 | 30% |
| met 3 | 70,31 | 17,93 | 26% |
| met 4 | 67,39 | 21,31 | 32% |
| met 5 | 73,58 | 19,29 | 26% |
| Média | 64,41 | 18,42 | 29% |
| Triploide | | | |
| met 1 | 95,65 | 50,00 | 52% |
| met 2 | 74,95 | 40,87 | 55% |
| met 3 | 77,22 | 45,53 | 59% |
| met 4 | 93,66 | 45,28 | 48% |
| met 5 | 79,00 | 46,22 | 59% |
| Média | 84,10 | 45,58 | 55% |

Os resultados mostram que, no milho, há 63% de homeologia entre o genoma A do milho e os genomas A'B de capim-elefante. No capim-elefante,

apenas os cromossomos pertencentes ao genoma A' foram medidos quanto à proporção marcada pela sonda, devido a dificuldade em se quantificar as pequenas marcas no genoma B, que aparecem dispersas. Neste genótipo, em média 29% do genoma A' é homeólogo ao genoma A.

A proporção do genoma A nos genomas A' e B do híbrido triploide foi de 55%. Os cromossomos que apresentaram marcações mais fortes foram considerados pertencentes ao genoma A' já que este apresenta maior homologia com o genoma A. Neste híbrido, todos os cromossomos oriundos de capim-elefante apresentaram alguma marcação.

4 DISCUSSÃO

Estudos anteriores utilizando pareamento meiótico no híbrido triploide já demonstraram que há homeologia entre os genomas A do milheto e A' do capim-elefante, bem como entre ambos e o genoma B do capim-elefante de forma reduzida (JAUHAR; HANNA, 1998; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005). No entanto, a distribuição e a proporção dessas regiões homólogas ainda não haviam sido descritas. Neste trabalho, a hibridização de sondas genômicas de milheto e capim-elefante confirmaram que há homeologia entre os três genomas e que ela é maior entre os genomas A e A'.

No capim-elefante, os 14 cromossomos mais fortemente marcados pela sonda com DNA genômico de milheto são pertencentes ao genoma A'. Os demais cromossomos pertencentes ao genoma B apresentam pequenas marcações dispersas. Isso ficou evidenciado pela presença do sinal da sonda genômica de milheto em aproximadamente 30% do genoma A' do capim-elefante e pela dificuldade em realizar medições nos demais cromossomos do genoma B.

Essa proporção do genoma A em A' se dá principalmente nas regiões centroméricas e adjacentes, podendo também ocupar praticamente todo um braço cromossômico. A distribuição do genoma A nos cromossomos do capim-elefante demonstra a grande possibilidade de recombinação entre essas espécies.

No híbrido triplóide, diferentemente do observado nos cromossomos do capim-elefante, com exceção do cromossomo X, o sinal da sonda do genoma A ocupou principalmente o centrômero, estendendo-se pouco nas adjacências. Fica evidente, dessa forma, que alterações ocorreram, principalmente no genoma A', após hibridação. Uma vez combinados em um núcleo híbrido poliploide, várias modificações nos genomas parentais diplóides podem ocorrer rapidamente (SOLTIS; SOLTIS, 1999), o que culminaria na formação de um "novo" genoma grandemente rearranjado.

A afinidade genômica entre capim-elefante e milheto ficou ainda mais evidenciada quando se utilizou sonda de capim-elefante no milheto. Neste caso, os cromossomos apresentaram-se quase totalmente marcados.

Apesar da hibridização *in situ* genômica auxiliar na identificação dos genomas, não foi possível realizar uma quantificação precisa dos mesmos, em função da dificuldade em medir as pequenas marcações dispersas. A diferença observada nas proporções ocupadas nos genomas do milheto e do capim-elefante, quando usada a GISH recíproca, é explicada pelo fato de que no milheto foram quantificados os dois genomas de capim-elefante (A'B) e no capim-elefante foi quantificado apenas o genoma A', obtendo-se um valor subestimado, o qual também é afetado pelo grau de compactação das metáfases avaliadas.

Os resultados também evidenciaram as diferenças de tamanho e número entre os cromossomos de capim-elefante e milheto, uma vez que, apesar do capim-elefante ter o dobro do número cromossômico, o comprimento total dos

mesmos não aumentou proporcionalmente em relação ao do milho. Esse fato está de acordo com a literatura que relata que as gramíneas têm origem comum e recente e que a evolução se deu pela redução no número e aumento no tamanho dos cromossomos (AVDULOV, 1931; BENNETZEN, 2007; CREPET; FELDMAN, 1991; MARTEL et al., 2004; PATERSON; BOWERS; CHAPMAN, 2004; STEBBINS, 1956, 1971).

No caso do gênero *Pennisetum*, o ancestral comum apresentava número básico de cromossomos $x = 9$. Já o ancestral das espécies da seção *Pennicillaria*, a qual pertencem *P. purpureum* e *P. glaucum*, apresentava número básico de cromossomos $x = 7$. A divergência de *P. purpureum* foi resultado de um evento de hibridação interespecífica seguida por um processo de diploidização (MARTEL et al., 2004).

Durante a evolução, muitos poliploides passaram por um processo de diploidização tal que os cromossomos passaram a se comportar de maneira regular durante o pareamento e a segregação. Este processo conduz a uma perda maciça de genes e leva ao rearranjo do genoma (KELLIS; BIRREN; LANDER, 2004).

Considerando que o ancestral comum de capim-elefante e milho apresentasse em sua constituição o genoma A, este foi passado ao capim-elefante que, por estar combinado em um mesmo núcleo com o genoma B há mais tempo, sofreu vários rearranjos e modificações ao longo da evolução sendo hoje denominado genoma A'. Dessa forma, o genoma A' poderia ser considerado um subgenoma do ancestral A devido a mudanças genômicas e estruturais que ocorreram durante a evolução. Quando comparados os complementos cromossômicos de capim-elefante e milho, as diferenças entre os genomas A e A' são bastante evidentes, sobretudo quando o genoma A' é observado no complemento cromossômico do híbrido triploide.

5 CONCLUSÃO

Após a hibridação, há diferenças nas proporções e distribuição do genoma A sobre os genomas A' e B.

Em função das reorganizações ocorridas durante a evolução, o genoma A' pode ser considerado um subgenoma de A.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro a pesquisa e concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Comportamento genômico em híbridos de capim-elefante e milho (*Pennisetum* sp. Schum., Poaceae)**. 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

AVDULOV, N. P. Karyo-systematische untersuchungen der familie gramineen. **Bulletin of Applied Botanic, of Genetic and Plant Breeding**, Leningrad, v. 44, p. 119-123, 1931. Supplies .

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

CREPET, W. L.; FELDMAN, G. D. The earliest remains of grasses in the fossil record. **American Journal Botany**, Columbus, v. 78, n. 7, p. 1010-1014, July 1991.

DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 7, p. 1001-1007, Nov. 2000.

HANNA, W. W. Utilization of wild relatives of pearl millet. In: INTERNATIONAL PEARL MILLET WORKSHOP, 1., 1986, Patancheru. **Proceedings...** India: ICRISAT Center, 1987. p. 33-42, 1987.

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

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

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

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

JIANG, J. et al. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. **Genetics**, Austin, v. 92, n. 10, p. 4497-4491, May 1995.

KELLIS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, Baltimore, v. 428, p. 617-624, Apr. 2004.

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

PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p. 532-541, Mar. 1967.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 26, p. 9903-9908, June 2004.

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

SETHI, G. S.; KALIA, H. R.; GHAI, B. S. Cytogenetical studies of three interspecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. **Cytologia**, Tokyo, v. 35, n. 1, p. 96-101, 1970.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Tree**, Berlin, v. 14, n. 9, p. 348-352, 1999.

SREE RANGASAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploid taxa of the genus *Pennisetum* Rich. **Genetica**, Netherlands, v. 43, n. 2, p. 257-273, 1972.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: E. Arnold, 1971. 216 p.

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

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

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

TECHIO, V. H. et al. Cytotaxonomy of some species and of interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.