



**YASMIM DUTRA SANTOS**

**Avaliação de marcas epigenéticas com a análise da expressão gênica de rDNA 45S em *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha* e seu híbrido**

**LAVRAS-MG  
2018**

**YASMIM DUTRA SANTOS**

**Avaliação de marcas epigenéticas com a análise da expressão gênica de rDNA 45S em  
*Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha* e seu híbrido**

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

**Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Helena Techio**

**Coorientador Prof. Dr. Welison Andrade Pereira**

**LAVRAS – MG  
2018**

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

Santos, Yasmim Dutra.

Avaliação de marcas epigenéticas com a análise da expressão gênica de rDNA45S em *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha* e seu híbrido. / Yasmim Dutra Santos. - 2018.

52 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Welison Andrade Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Brachiaria. 2. rDNA 45S. 3. Dominância nucleolar. I. Techio, Vânia Helena. II. Pereira, Welison Andrade. III. Título.

**YASMIM DUTRA SANTOS**

**Avaliação de marcas epigenéticas com a análise da expressão gênica de rDNA 45S em  
*Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha* e seu híbrido**

**Assessment of epigenetic marks with gene expression analysis of 45S rDNA in *Urochloa*  
*ruziziensis*, *Urochloa brizantha* and its hybrid**

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

Aprovada em 15 de fevereiro de 2018

Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Beatriz Mendes Bonato UEM

Prof. Dr. Antonio Chalfun Junior UFLA

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira UFLA

Prof<sup>a</sup> Dra Vânia Helena Techio  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2018**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas pela disponibilidade de recursos e oportunidade de realizar esse trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos. À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Prof<sup>a</sup> Vânia Helena Techio e ao Prof Welison Pereira pela orientação, dedicação, paciência e acima de tudo pela confiança no meu trabalho.

À Embrapa Gado de Leite, em especial ao pesquisador Fausto de Souza Sobrinho pelos recursos e coorientação.

À minha família, Edna e Kleyton, pelo exemplo de força e dedicação e amor incondicional, espero um dia retribuir tudo que vocês fazem por mim.

Ao meu namorado, Áureo, que mesmo longe, sempre me apoiou e me deu força para superar meus desafios.

Aos Amigos do programa de Genética e Melhoramento de Plantas, em especial ao João, Samanta e Thais, pela parceria nesses dois anos de mestrado.

Ao Gabriel, meu filho científico, pela dedicação e compromisso.

À todos amigos do Laboratório de Citogenética que tornam meus dias mais agradáveis, em especial à Isabella Moraes, Ana Luiza, Cristina, Laiane, Marco Tulio, Caio e Alex, por todas risadas nos momentos bons e pelos conselhos e auxílio em momentos difíceis.

Aos professores e funcionários do DBI, especialmente aos técnicos Felipe Fogaroli, Iara Silva, Gisele Cenzi e Lamartine que contribuíram de forma especial para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O gênero *Urochloa* P. Beauv. (incluindo *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) apresenta um papel de destaque no cenário agropecuário brasileiro sendo composto por espécies com diferentes níveis de ploidia e modo de reprodução. Estudos sobre a relação genômica dentro desse gênero são escassos, assim como os estudos envolvendo marcas epigenéticas, diretamente envolvidas com a organização do genoma. O objetivo deste trabalho foi identificar o padrão da metilação nas citosinas (5-mCyt), relacionada ao silenciamento gênico, e da dimetilação da lisina 9 na histona H3 (H3K9me2), associada a estrutura heterocromática, nas diferentes conformações dos sítios de rDNA 45S, nos núcleos interfásicos e associar esses resultados com a análise da expressão gênica em *Urochloa ruziziensis* (genoma B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>), *Urochloa brizantha* cv. Marandu (genoma BB<sup>1</sup>B<sup>1</sup>) e respectivo híbrido interespecífico- H1863 (genoma BB<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>). As técnicas de imunomarcacão foram realizadas em combinaçãõ com a FISH (hibridizaçãõ *in situ* fluorescente) para a localizaçãõ dos sítios de rDNA 45S. As lâminas foram feitas com células meristemáticas, obtidas de pontas de raízes fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético, 3:1). A imunodeteccãõ indireta foi realizada com os anticorpos primários anti-H3K9me2 *mouse* monoclonal e anti-5-metil-citosina *mouse* monoclonal. Estes foram detectados com anticorpo secundário *mouse policlonal* TRITC-conjugado. A FISH foi realizada logo após à imunomarcacão, utilizando sondas de rDNA obtidas de *Triticum aestivum* L.. A partir da combinaçãõ destas duas técnicas pôde-se perceber uma relaçãõ direta entre as marcas epigenéticas e as diferentes conformaçãõs das regiões organizadoras do nucléolo (RONs). Foram observados predominantemente sítios intra e perinucleolares que, em sua maioria, estavam hipometilados e/ou hiper/hipometilados, descondensados ou parcialmente condensados. Análise da expressãõ gênica foi realizada de forma qualitativa através da PCR convencional utilizando DNA complementar (cDNA) e confirmada por meio da técnica RT-qPCR, utilizando primers desenhados para a regiãõ ITS-1 de *U. brizantha* e *U. ruziziensis*. As análises moleculares mostraram uma expressãõ diferencial entre os sítios de rDNA 45S dos diferentes genitores dentro do genoma do híbrido 1863, caracterizando um cenário de dominância nucleolar, onde ocorre a expressãõ preferencial do genes de rDNA 45S herdados de *U. brizantha*, enquanto os sítios provenientes de *U. ruziziensis* são silenciados através de mecanismos epigenéticos. Estes resultados permitiram inferir que os sítios que se encontravam hipermetilados na citosina e H3k9m2, foram herdados de *U. ruziziensis*, enquanto que a porçãõ de rDNA caracterizada pela hipometilaçãõ da citosina e da H3k9me2 é originada de *U. brizantha*.

**Palavras-chave:** *Brachiaria*; rDNA 45S; dominância nucleolar.

## ABSTRACT

The genus *Urochloa* P. Beauv. (including *Brachiaria* (Grin.) Griseb.) has a prominent role in the Brazilian agricultural scenario, being composed of species with different levels of ploidy and reproduction's types. Studies on the genomic relationship within this genus are rare, as the researches involving epigenetic marks, directly involved with the genome organization. The aim of this work was to identify the pattern of cytosine methylation (5-mCyt) related to gene silencing and the dimethylation of lysine 9 in histone H3 (H3K9me2), associated with the heterochromatic structure, in the different conformations of the 45S rDNA sites, in the interphase nuclei and to associate these results with the analysis of the gene expression in *Urochloa ruziziensis* (genome B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>), *Urochloa brizantha* cv. Marandu (genome BBB<sup>1</sup>B<sup>1</sup>) and its interspecific hybrid – H1863 (genome BB<sup>1</sup>B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>). Immunostaining techniques were performed in combination with FISH (fluorescence *in situ* hybridization) for the localization of the 45S rDNA sites. The slides were made with meristematic cells obtained from the root tips fixed in Carnoy (ethanol:acetic acid, 3:1 v/v). The indirect immunodetection was performed with the primary antibodies anti-H3K9me2 mouse monoclonal and anti-5-methyl cytosine mouse monoclonal. The detection was done using secondary antibodies mouse polyclonal TRITC-conjugated. FISH Technique was performed sequentially on immunostaining using rDNA probes obtained from *Triticum aestivum* L. From the combination of these two techniques it was possible to perceive a direct relation between the epigenetic marks and the different conformations of the nucleolar organizing regions (NORs). It was noticed predominantly intra and perinucleolar sites, which were mostly hypomethylated and/or hyper/hypomethylated, decondensed or partially condensed. Gene expression analysis was performed qualitatively through conventional PCR using complementary DNA (cDNA) and it was confirmed by the RT-qPCR technique, using primers designed for the ITS-1 region of *U. brizantha* and *U. ruziziensis*. The molecular analyzes showed differential expression between the 45S rDNA sites of the different genomes within the genome of hybrid 1863, characterizing a scenario of nucleolar dominance, in which happens the preferential expression of the 45S rDNA genes inherited from *U. Brizantha*, while the sites from *U. ruziziensis* are silenced through epigenetic mechanisms. These results allowed to infer that those sites that were hypermethylated in cytosine and H3k9me2 marks were inherited from *U. ruziziensis*, whereas the portion of rDNA characterized by hypomethylation of cytosine and H3k9me2 was originated from *U. brizantha*.

**Keywords:** *Brachiaria*; rDNA 45S; nucleolar dominance.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
2.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA-AGRONÔMICA E IMPORTÂNCIA DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE <i>UROCHLOA</i> .....	12
2.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE <i>UROCHLOA</i> .....	14
2.3 CROMATINA E EPIGENÉTICA .....	16
2.4 ESTRUTURA E CONTROLE DA EXPRESSÃO GENICA EM SÍTIOS DE rDNA 45S ..	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 MATERIAL GENÉTICO .....	23
3.2 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS .....	23
3.3 IMUNOLocalização DE MODIFICAÇÕES DE HISTONAS (H3K9me2) .....	24
3.4 IMUNOLocalização DA METILAÇÃO DO DNA (5-METIL CITOSINA – 5-mCyt)24	
3.5 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH).....	24
3.7 RT-PCR - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	25
3.7.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA .....	25
3.7.2. DESENHO DOS PRIMERS .....	26
3.7.3 PCR E RT-qPCR.....	27
3.7.2. RT-qPCR.....	27
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 AVALIAÇÃO DO STATUS DE METILAÇÃO DO DNA (5-mCyt) E DA DIMETILAÇÃO DA H3K9 (H3K9me2) EM SÍTIOS DE RDNA 45S NOS NÚCLEOS INTERFÁSICOS. ....	29
4.2 ANÁLISE E COMPARAÇÃO DOS TRANSCRITOS DOS SÍTIOS DE RDNA 45S.....	37
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui destaque dentro da cadeia agropecuária, ocupando a segunda posição no ranking dos países produtores de carne bovina e a sexta posição na produção de leite (USDA/FAO, 2016). Essa intensa atividade pecuária impulsiona a produção de espécies forrageiras mais eficientes na utilização dos insumos e também adaptadas às diversas regiões do país (VALLE et al., 2008). Dentre elas, integram-se as gramíneas pertencentes à *Urochloa* P. Beauv.. Esse gênero passou recentemente a incluir espécies anteriormente identificadas como *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) e, de acordo com Salariato et al., (2010), possui cerca de 110 espécies, e algumas delas se destacam na produção de forragens devido à alta qualidade nutricional e à alta adaptabilidade, tais como *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R. D. Webster, *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster, *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga e a *Urochloa ruziziensis* (R. Germ & Evrard) Crins (VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Em relação à citogenética, as espécies de *Urochloa* caracterizam-se por apresentarem número básico de cromossomos variável ( $x=5, 6, 7, 8, 9, 10$  e  $12$ ), com a maioria das espécies, entretanto, apresentando  $x=9$  (DARLINGTON; WYLIE, 1955; CHRISTOPHER; ABRAHAM, 1976; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006). A maioria das espécies descritas do gênero é tetraploide ( $2n=4x=36$ ) (PENTEADO et al., 2000), porém, Valle e Pagliarini (2009) já relataram espécies apresentando de 14 a 90 cromossomos.

*Urochloa ruziziensis* é diploide ( $2n=2x=18$ ) com tamanho médio do genoma de 1,74 pg (TIMBÓ et al., 2014a), genoma  $B^2B^2$  (PAULA et al. 2017) e modo de reprodução sexuado (SCHANK; SOTOMAYOR-RÍOS, 1968). Plantas tetraploides de *U. ruziziensis* foram obtidas artificialmente, a partir da indução de duplicação cromossômica com colchicina, por diferentes autores, tais como Swenne; Louant; Durjardin, (1981); Ishigaki et al. (2009) e Timbó et al. (2014). *U. decumbens* e *U. brizantha* são predominantemente tetraploides ( $2n=4x=36$ ) e apomíticas (ZERPA, 1952; NATH; SWAMINATHAN, 1957) com tamanhos dos genomas de 3,74 pg e 3,52 pg, (TIMBÓ et al., 2014a) e genomas  $B^1B^1B^2B^2$  e  $BBB^1B^1$ , respectivamente (PAULA et al. 2017). No entanto, há relatos de ocorrência de plantas diploides de *U. decumbens* e *U. brizantha* ( $2n=2x=18$ ) (CARNAHAN; HILL, 1961; VALLE et al., 1989; VALLE, 1991; MENDES-BONATO, 2002). Para *U. brizantha* também são

descritos genótipos pentaploides ( $2n=5x=45$ ) e hexaploides ( $2n=6x=54$ ) (CARNAHAN; HILL, 1961; RISSO-PASCOTTO et al., 2003; VALLE; PAGLIARINI, 2009).

Com a utilização de técnicas de citogenética molecular foi possível descrever muito além do nível de ploidia, como, por exemplo, caracterizar e quantificar os sítios de rDNA e contribuir para a construção de mapas físicos cromossômicos, ajudando a elucidar alguns aspectos evolutivos e taxonômicos no gênero (AKIYAMA et al., 2010; NIELEN et al., 2010; NANI et al., 2016; NANI et al., 2018). Nani et al. (2016) aplicaram a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em *U. ruziziensis* cv. Kennedy, *U. brizantha* cv. Marandu e *U. decumbens* cv. Basilisk e observaram polimorfismos intravarietais e interespecíficos nos sítios de rDNA 45S, além de variações na atividade transcricional desses sítios através da coloração com nitrato de prata (Ag-NOR).

Essa variação na transcrição dos genes rDNA 45S, tanto em *U. brizantha* como em *U. decumbens*, tem sido relatada em outras espécies alopoliploides e de híbridos interespecíficos de gêneros, como *Triticum*, *Secale*, *Hordeum* (HOUCHINS et al., 1997; PIKAARD, 2000; CARPETA, 2002). Esse fenômeno é conhecido como dominância nucleolar (ND) ou anfiplastia diferencial (BOROWSKA-ZUCHOWSKA; HASTEROK, 2017). Nessas circunstâncias, ocorre a transcrição preferencial dos genes rDNA 45S de um genitor que resulta no silenciamento parcial ou total dos genes de outro genitor, funcionando como um mecanismo de controle da expressão gênica (PIKAARD, 2000). A ND foi descrita pela primeira vez em plantas há cerca de 90 anos, sendo considerada um dos primeiros e mais importantes fenômenos de silenciamento epigenético reconhecidos (PIKAARD, 2014). Desde então, esse fenômeno tem sido estudado em muitas espécies vegetais, o que levou a alguns avanços em relação aos mecanismos moleculares relacionados a ele (PIKAARD, 2000; NEVES et al., 2005; MCSTAY, 2006).

Estudos citogenéticos via imunomarcagem vêm sendo empregados para elucidar alguns aspectos relacionados à modulação da cromatina e à expressão gênica que, até então, não eram compreendidos e podem ser usados para explicar a expressão seletiva dos genes rDNA. Essa relação foi bem demonstrada em *Citrus* por Marques e colaboradores (2011) onde os sítios de rDNA descondensados e transcricionalmente ativos estavam frequentemente associados com a hipometilação do DNA e da lisina 9 da histona H3 (H3K9), enquanto que os sítios silenciados condensados estavam hipermetilados para ambas as marcas. Em *Brachypodium hybridum* (*B. stacey* x *B. distachyon*), Borowska-Zuchowska e Hasterok (2017) usaram a técnica Imuno-FISH e demonstraram que os loci de rDNA herdados do parental *B. stacey* são reprimidos transcricionalmente e estão associados à um alto grau de

metilação do DNA. Além disso, os autores demonstraram que as frações ativas e silenciadas de rDNA herdadas de *B. distachyon* ocupavam diferentes domínios dentro dos cromocentros adjacentes ao nucléolo, dependendo do seu estado epigenético.

No primeiro estudo epigenético em *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* e respectivos híbridos interespecíficos, Paula et al. (2016) utilizaram imunomarcações com a 5-metilcitosina (5-mCyt) para evidenciar regiões silenciadas e com as histonas H3 dimetilada na lisina 9 (H3K9me2) e na lisina 4 (H3K4me2) para regiões de heterocromatina e eucromatina, respectivamente. Os resultados em relação às regiões organizadoras do nucléolo (RONs) mostraram que não houve imunomarcação da H3K4me2 nessa região. Entretanto, algumas RONs apresentaram fraca marcação da H3K9me2 em alguns cromossomos, coincidentes com as marcas da 5-mCyt, identificando a inatividade do locus de rDNA 45S.

O estudo da distribuição dessas marcas epigenéticas e a forma pelas quais elas estão envolvidas na regulação preferencial da atividade transcricional dos genes ribossomais são importantes para se compreender quais mecanismos de silenciamento gênico estão envolvidos na ND em espécies e híbridos de *Urochloa*. Dessa forma, o presente trabalho visa associar as marcas epigenéticas 5-mCyt e H3K9me2, relacionadas aos sítios de rDNA 45S no núcleo interfásico com a análise da expressão gênica em *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e respectivo híbrido interespecífico.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Caracterização botânica-agronômica e importância das principais espécies de *Urochloa*

O gênero de *Urochloa* P. Beauv. (incluindo *Brachiaria* (Trin.) Griseb.) pertence à tribo Paniceae Rchb., subfamília Panicoideae (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996), abrangendo cerca de 110 espécies (SALARIATO et al., 2010). As espécies que compõem esse gênero são caracterizadas, em geral, por serem plantas robustas, de hábito cespitoso, com colmos inicialmente prostrados que também podem produzir afilos predominantemente eretos e bainhas pilosas com lâminas foliares linear-lanceoladas, esparsamente pilosas na face ventral e glabras na face dorsal (SEIFFERT, 1984).

O gênero *Urochloa* é de origem africana e teve expressiva ocupação no cerrado brasileiro e savanas da América tropical devido à considerável tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade natural (VALLE et al., 2008), sendo *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola* e *U. ruziziensis*, espécies do leste africano, aquelas que mais se destacaram nesse continente (VALLE, 2009). A associação dos caracteres vegetativos e moleculares foi mais eficaz na discriminação das espécies, mas os caracteres reprodutivos também foram levados em conta para a discriminação—entre *U. brizantha* e *U. ruziziensis*, e os de pilosidade se mostraram importantes para diferenciar *U. decumbens* e *U. humidicola* (VALLE et al., 2008).

Dentre as espécies citadas, *U. brizantha* e *U. decumbens* tiveram um destaque econômico especial dentro da forragicultura devido à excelente qualidade nutricional e à alta adaptabilidade em diferentes tipos de solos (VALLE; MILE, 1992). *U. decumbens*, que já foi uma das forrageiras mais utilizadas na agropecuária, se estabelece a partir de sementes, sendo assim, de fácil manejo e produzindo uma forragem de boa qualidade, que é a sua característica de maior importância (KELLER-GREIN, 1996).

Em 1984, foi lançada a cultivar *U. brizantha* cv. Marandu (capim braquiarião) pela Embrapa Gado de Corte e Embrapa Cerrados, tornando-se a forrageira mais plantada no Brasil (KELLER-GREIN, 1996). Sua principal característica é a resistência à cigarrinha das pastagens, porém, também se caracteriza pela elevada produção, qualidade da forragem, resposta à adubação, boa produtividade de sementes e boa adaptação a solos de cerrado de média a alta fertilidade (ZIMMER et al., 1998).

*Urochloa humidicola* é uma espécie considerada tolerante a cigarrinha das pastagens e apresenta baixa resistência a seca, ocorrendo normalmente em locais mais úmidos ou de

drenagem deficiente (VALLE et al., 2008), possui também resistência a solos com baixa fertilidade. *Urochloa ruziziensis* é uma espécie que possui bom valor nutritivo e rápido estabelecimento de pastagem (VALLE; PAGLIARINI, 2009). Uma das cultivares de *U. ruziziensis* bem aceita no mercado foi a cv. Comum por apresentar menores quantidades de fibra, refletindo em boa digestibilidade (SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

Dentro desse gênero, são encontradas espécies que se reproduzem sexuadamente, geralmente diploides, tais como *U. ruziziensis*, e outras por apomixia que, associada à poliploidia, é muito observada em espécies do gênero *Urochloa*, como *U. decumbens* e *U. brizantha* (VALLE; PAGLIARINI, 2009). A apomixia que ocorre no gênero é a aposporia facultativa do tipo *Panicum*, ou seja, algumas flores exibem sacos meióticos passíveis de serem fecundados (VALLE et al., 2007).

A produção de híbridos é uma estratégia para contornar problemas, como baixa produção de sementes, e permite explorar a variabilidade genética conservada pela apomixia. Em *Urochloa*, a maior dificuldade encontrada na produção de híbridos se encontra na diferença de ploidia entre os progenitores sexuais e apomíticos (VALLE et al., 2008). Para solucionar esse obstáculo, foram lançados programas de melhoramento visando a duplicação dos cromossomos das espécies diploides e sexuais de *Urochloa* (SWENNE; LOUANT; DURJARDIN, 1981; ISHIGAKI et al., 2009; TIMBÓ et al., 2014).

A primeira cultivar híbrida interespecífica de *Urochloa* foi a cv. Mulato, originada do cruzamento entre *U. ruziziensis* tetraploidizada e *U. brizantha* cv. Marandu (SOUZA SOBRINHO, 2005). Posteriormente, a cv. Mulato II foi lançada pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Este híbrido é resultado de três gerações de cruzamento e seleção, iniciadas com o cruzamento de *U. ruziziensis* x *U. decumbens* (ARGEL et al., 2007).

Os critérios de um programa de melhoramento de forrageiras, em geral, são mais complexos quando comparados com as grandes culturas de ciclo anual, além disso, existe um número reduzido de melhoristas que trabalham com essas espécies e um número elevado de espécies que apresentam grande variação, principalmente no que se refere ao nível de ploidia e formas distintas de estrutura reprodutiva como alogamia, autogamia, propagação vegetativa e apomixia (SOUZA SOBRINHO, 2005; VALLE et al., 2008). Diante desse cenário, a citogenética é uma ferramenta eficaz para o melhoramento, gerando subsídios para melhor identificar espécies e cultivares do gênero.

## 2.2 Aspectos citogenéticos das principais espécies de *Urochloa*

A correta caracterização do nível de ploidia é fundamental para se realizar o melhoramento genético de qualquer espécie e pode ser feita por meio da contagem cromossômica (PENTEADO et al., 2000). O gênero *Urochloa* possui espécies que apresentam o número básico cromossômico  $x=5, 6, 7, 8, 9, 10$  e  $12$  com a maioria das espécies apresentando  $x=9$  (DARLINGTON; WYLIE, 1955; CHRISTOPHER; ABRAHAM, 1976; BASAPPA; MUNIYAMMA; CHINNAPPA, 1987; RISSO-PASCOTTO; PAGLIARINI; VALLE, 2006). Esse gênero apresenta variação intra e interespecífica quanto ao nível de ploidia, conforme demonstrado na TABELA 1.

Tabela 1 - Número cromossômico e nível de ploidia das principais espécies de *Urochloa*.

Espécie	Ploidia	2n
<i>U. brizantha</i> <sup>1</sup>	2x	18
	4x	36
	5x	45
	6x	54
<i>U. decumbens</i> <sup>1</sup>	2x	18
	4x	36
<i>U. humidicola</i> <sup>2</sup>	6x	36
	7x	42
	9x	54
<i>U. ruziziensis</i> <sup>1</sup>	2x	18

Fonte: 1-Adaptado de Valle e Pagliarini (2009)

2-Boldrini et al. (2009)

A primeira caracterização cariotípica de várias espécies de *Urochloa* foi realizada por Bernini e Marin-Morales (2001), na qual os cariótipos foram considerados simétricos, com tendência para a assimetria na direção dos poliploides. Os autores também sugeriram a poliploidia como uma das causas que mais influenciaram na evolução cromossômica do gênero. A respeito da posição do satélite, Bernini e Marin-Morales (2001) descreveram uma variação entre os acessos tetraploides de *U. decumbens*, enquanto que em *U. brizantha* o satélite foi descrito na região terminal do par doze. Em *U. ruziziensis*, o satélite foi escrito pelos autores na região terminal do par oito. Entretanto, Valle, Singh e Miller (1987), por

meio de análises em cromossomos paquitênicos, relataram que a região organizadora do nucléolo se encontra localizado no par sete.

Além da citogenética clássica, técnicas como hibridização *in situ* genômica (GISH) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) vêm sendo aplicadas em espécies do gênero *Urochloa*. Paula et al. (2017) utilizaram GISH e observaram variação no padrão de hibridização entre as espécies de *Urochloa*. A GISH realizada reciprocamente entre *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. ruziziensis* revelou sinais em todas as metáfases, variando na porcentagem do genoma hibridizado e região cromossômica dessa hibridização. A partir desses dados associados com estudos meióticos, *U. brizantha* foi caracterizada por ter genoma  $BBB^1B^1$ , *U. decumbens*  $B^1B^1B^2B^2$  e *U. ruziziensis*  $B^2B^2$ . Os genomas B,  $B^1$  e  $B^2$  foram considerados homeólogos, com menor afinidade entre B e  $B_2$ .

Utilizando a FISH, Akiyama et al. (2010) quantificaram os sítios de rDNA 5S e 25S (uma subunidade do sítio 45S). O acesso de *U. brizantha* cv Marandu ( $2n=4x=36$ ) apresentou seis sinais de rDNA 5S e quatro sinais de rDNA 25S. No híbrido mulato I, oriundo do cruzamento de *U. ruziziensis* x *U. brizantha*, os autores quantificaram quatro sinais de rDNA 5S e 25S e, em *U. ruziziensis* diploide, foram observados quatro sinais de rDNA 5S e dois de rDNA 25S. Paula et al. (2017) quantificaram os sítios de rDNA 45S e 5S na *U. ruziziensis* tetraploidizada e no híbrido 1863 (*U. ruziziensis* tetraploidizada X *U. brizantha* cv. Marandu) utilizando FISH. Os autores observaram em *U. ruziziensis* quatro cromossomos com sítios de rDNA 45S e seis sinais de rDNA 5S. No híbrido 1863 foi observado 4 sinais de rDNA 45S e sete de rDNA 5S.

Nielen et al. (2010) realizaram o mapeamento físico de genes de rDNA 45S e 5S em diferentes acessos de *U. brizantha*. Em um acesso diploide sexual de *U. brizantha* foram observados dois sítios de rDNA 5S e dois sítios de 45S, enquanto que no tetraploide apomítico foram observados seis sítios de rDNA 5S e quatro de 45S.

Nani et al. (2016) também quantificaram os sítios de rDNA 45S e 5S com a intenção de contribuir para a construção de mapas cromossômicos. Em *U. ruziziensis* cv. Kennedy ( $2n=2x=18$ ) apenas o par 8 apresentou sítio de rDNA 45S, e os pares 2 e 6 apresentaram sítios de rDNA 5S. Em *U. brizantha* cv. Marandu ( $2n=4x=36$ ) identificou-se uma variação de três, quatro, cinco e seis sinais de rDNA 5S, localizados nos pares 8, 12 e 15, e dois, três ou quatro sítios de rDNA 45S nos pares 7 e 13. A espécie *U. decumbens* cv. Basilisk ( $2n=4x=36$ ) possui sete sinais de rDNA 5S localizados nos pares 7, 10, 13 e também no par 4 que se encontra no estado de hemizigose; os pares 9 e 11 foram portadores de sinal de rDNA 45S sendo que o par 11 apresentou heteromorfismo com relação ao comprimento total e a morfologia

cromossômica, além disso, o homólogo de maior comprimento apresentou constrição terciária na região distal do braço longo.

Nani et al (2016) ressaltaram que diferenças na identificação da posição de rDNA 45S podem ocorrer devido a variações intraespecíficas, mas também quando técnicas citogenéticas distintas são utilizadas isoladamente. Os cromossomos de espécies de *Urochloa* frequentemente apresentam fibra da cromatina estendida na região cromossômica distal, especialmente nos cromossomos portadores de rDNA 45S, o que pode contribuir para superestimar as medidas de comprimento cromossômico levando à identificação equivocada da localização dos pares cromossômicos no kariograma, sobretudo quando são utilizadas apenas técnicas de citogenética convencional. Ainda no mesmo trabalho de Nani et al. (2016), foi utilizado o bandamento CMA/DAPI para verificar o padrão de bandas ricas em CG, além da técnica Ag-NOR para avaliar possível atividade transcricional dos sítios rDNA 45S. Os autores, observaram co-localização das bandas de CMA com os sítios de rDNA 45S em *U. decumbens* que apresentou até 3 sítios ativos e *U. ruziziensis* que apresentou até 2 sítios de rDNA ativos e coincidentes com as bandas CMA. Em *U. brizantha* foram observados até 3 sítios ativos e duas marcas CMA foram coincidentes com os sítios de rDNA 45S.

Atualmente, estudos sobre a remodelação da cromatina via marcas epigenéticas têm sido utilizados em conjunto com técnicas de hibridização *in situ* para avaliar de forma mais definitiva essa atividade ou inatividade transcricional dos genes ribossomais.

### 2.3 Cromatina e Epigenética

Em células eucarióticas, o constituinte mais importante do núcleo é a cromatina, constituída por DNA associado a proteínas histônicas e não-histônicas (SUMNER, 2013). Na divisão celular, a cromatina se condensa, o que torna possível a movimentação dos cromossomos e a segregação das cromátides. A condensação da cromatina envolve alguns estágios, sendo o primeiro a formação da unidade fundamental da cromatina, o nucleossomo, formado por 147 pares de bases nitrogenadas que se enrolam em torno de um octâmero com duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, arranjadas em dois dímeros H2A/H2B e um tetrâmero H3/H4 com caudas N-terminais dispostas para fora do octâmero de histonas (JASENCAKOVA et al., 2000; LAM; KATO; WATANABE, 2004; KOUZARIDES, 2007). A fita de DNA que une dois nucleossomos vizinhos é referida como DNA *linker* e a variação no seu comprimento pode estar relacionada com funções regulatórias

(KORNBERG; LORCH, 1999; HESLOP-HARRISON, 2000; LAM; KATO; WATANABE, 2004).

Existem dois tipos de fibra de cromatina, a fibra de 10 nm de diâmetro, que possui um aspecto de “colar de contas” em que cada esfera corresponde a um nucleossomo, e a fibra de 30 nm, na qual os nucleossomos são dobrados formando o solenoide que envolve aproximadamente seis nucleossomos a cada volta. Sugere-se que essa conformação seja facilitada pela histona H1, adjacente ao nucleossomo (LEWIN, 2004).

A cromatina é dividida em eucromatina e heterocromatina de acordo com o seu grau de compactação, regulado por modificações pós-traducionais de histonas e metilação do DNA (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Os eventos que ocorrem nessas regiões da cromatina estão envolvidos no controle da transcrição e, conseqüentemente, na expressão gênica. A estes processos estão associadas importantes marcas epigenéticas (FUKS, 2005; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011), que caracterizam as mudanças na regulação gênica através do remodelamento da cromatina sem que ocorram alterações na sequência do DNA e que podem ser herdáveis ao longo das gerações (TANG; HO, 2007).

Existem vários mecanismos epigenéticos de herança, sendo as modificações das histonas e a metilação do DNA os mais estudados atualmente. Segundo Kouzarides (2007), existem pelo menos oito tipos de alterações encontradas em histonas, tais como: metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADPribosilação, deiminação e isomerização de prolina. Algumas destas modificações são específicas para certas regiões da cromatina, como por exemplo, a acetilação das lisinas 5 e 8 da histona H4 e a metilação da histona H3 na lisina 4 para eucromatina. Entretanto, a mono e dimetilação da histona 3 na lisina 9 são específicas da heterocromatina. Essas modificações de histonas ocorrem na cauda N-terminal e, mais raramente, no núcleo das histonas, apresentando distribuições diferentes em cada genoma (FUCHS et al., 2006; JASENCAKOVA et al., 2000).

A acetilação de histonas, normalmente, está associada à expressão gênica, enquanto a desacetilação resulta em silenciamento e heterocromatinização. A metilação das histonas, quando relacionada à heterocromatina, promove a desacetilação e a posterior metilação da H3K9 que promove o recrutamento da HP1, uma proteína envolvida na formação da heterocromatina e no silenciamento gênico. São encontrados altos níveis de metilação de DNA na heterocromatina constitutiva (NEVES et al., 2005; DAUJAT et al., 2005).

A metilação do DNA ocorre diretamente sobre a cadeia de nucleotídeos, está associada ao silenciamento gênico e também pode alterar o padrão de modificações de histonas. O tipo mais comum de metilação em eucariotos é a 5 metilcitosina, que ocorre pela

ligação de um grupo metil ao carbono 5 do anel de citosina (NEVES et al., 2005; BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

O primeiro estudo epigenético para o gênero *Urochloa* foi realizado por Paula et al. (2016), no qual os autores analisaram as modificações de histonas e metilação de DNA associadas com a modulação da cromatina e silenciamento gênico nas espécies *U. decumbens* e *U. brizantha*, tetraploides e apomíticas, *U. ruziziensis*, espécie diploide e sexual, *U. ruziziensis* tetraploidizada, nos híbridos 1863 (*U. ruziziensis* x *U. brizantha*) e 963 (*U. ruziziensis* x *U. decumbens*). Neste estudo, foi observada variação no padrão cromossômico em relação a marcas epigenéticas. Para a marca da H3K4me2 (eucromatina) foram observados cromossomos i) hipometilados, ii) com duas regiões terminais eucromáticas metiladas, iii) com apenas uma das regiões terminais eucromáticas metiladas, iv) hipermetilados, e, v) com uma banda intersticial metilada, apresentando variação maior em *U. brizantha*, *U. decumbens* e híbrido 963. Por outro lado, os cromossomos com sinais de H3K9me2 (heterocromatina) estavam i) hipermetilados, ii) com a região central centromérica e pericentromérica metilada, iii) com um braço e, algumas vezes, parte do outro braço metilado, e iv) hipometilados, com maior variação encontrada em *U. decumbens* e no híbrido 963.

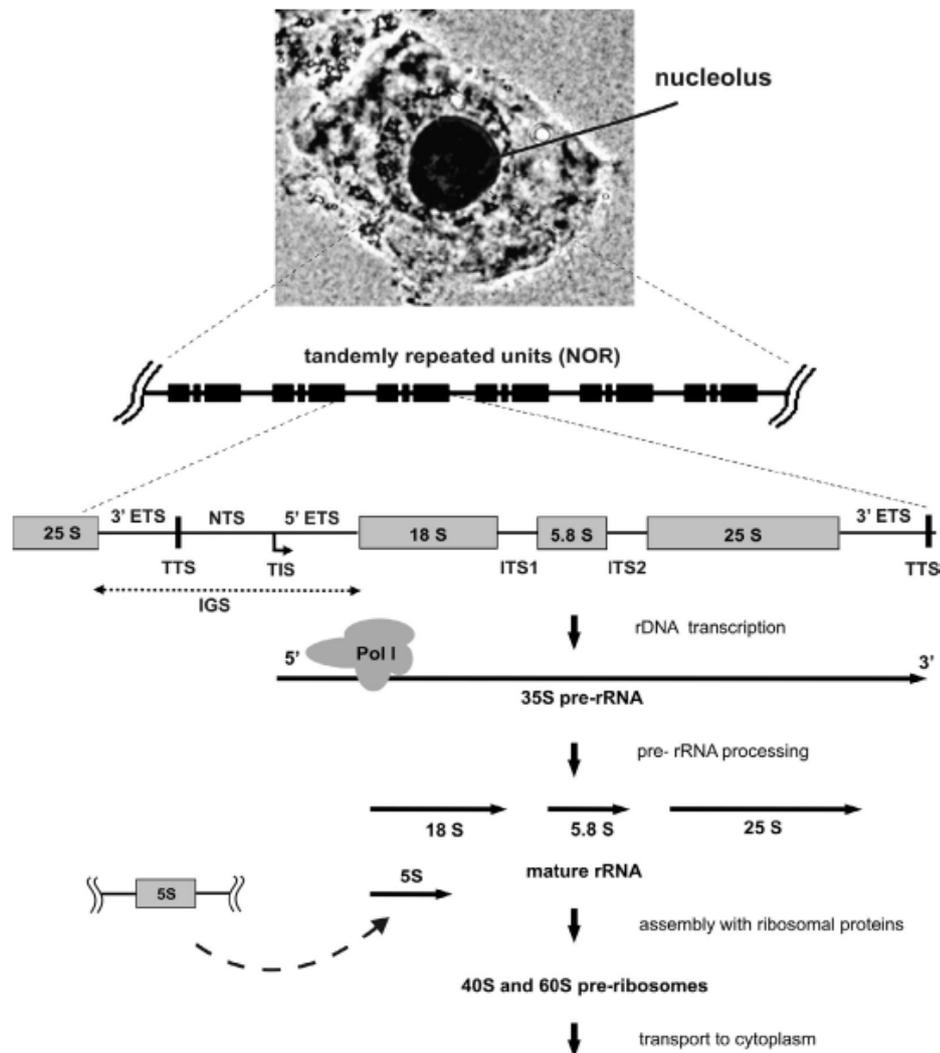
No mesmo trabalho, a imunodeteção via 5 metilcitosina, para a metilação do DNA, ocorreu nas regiões pericentroméricas e proximais, se estendendo em alguns casos ao longo dos braços cromossômicos. Para a maioria dos cromossomos e regiões cromossômicas das espécies e híbridos, a hipermetilação da H3K9me2 se correlacionou com um elevado nível de metilação de DNA. Esta co-localização já foi demonstrada em outras espécies, tais como *Citrus clementina* (MARQUES et al., 2011) e algumas espécies pertencentes ao complexo *Lolium-Festuca* (FERREIRA, 2017).

#### **2.4 Estrutura e controle da expressão gênica em sítios de rDNA 45S**

A região organizadora do nucléolo (RON) é uma região cromossômica onde são encontrados os RNAs ribossomais (rRNAs) (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). Os rRNAs associados a complexos proteicos são responsáveis pela formação do ribossomo, o qual em eucariotos é composto por uma subunidade 60S e outra 40S (LEWIN, 2004; SUMNER, 2003).

Os genes ribossomais 45S são altamente repetidos e organizados em tandem. Estes, compõem o sítio de rDNA 45S e são subdivididos por segmentos de codificação dos rRNAs 18S, 5.8S, 25/28S, espaçadores transcritos internos e externos (ITS e ETS) e espaçadores não transcritos (NTS) (FIGURA 1). A região espaçadora intergênica (IGS), composta de 3 ETS, NTS e 5 ETS, contém o sítio de iniciação da transcrição (TIS), término da transcrição (TTS) e diferentes elementos reguladores. Os genes para rRNAs são transcritos pela RNA polimerase I como um pré 45S rRNA, que é processado e transformado nos respectivos rRNAs (18S, 5.8S e 25/28S) (HEMLEBEN et al., 2004).

Figura 1 - Organização estrutural do 45S rDNA, expressão e processamento



FONTE: VOLKOV et al. (2007).

Alguns estudos relataram que os sítios de rDNA 45S ativos se encontram associados ao nucléolo apresentando baixa densidade de metilação de DNA em seus promotores e, muitas vezes, apresentam cromatina parcialmente descondensada, enquanto que os sítios que se mostram silenciados, se encontram na periferia nuclear e são hipermetilados nos seus promotores, estando indisponíveis para transcrição (MARQUES et al., 2011; BOCKOR et al., 2014).

A transcrição desses genes ribossomais está diretamente relacionada com a presença de estruturas altamente conservadas presentes no nucléolo, sendo elas o componente granular (GC), o componente fibrilar denso (DFC) e o centro fibrilar (FC) (HADJIOLOV, 1985). O FC é uma estrutura esférica envolvida pelo DFC, e no limite dessas duas estruturas ocorre a transcrição dos genes de pré-RNAs. No DFC estão os pré-rRNAs recém-sintetizados e várias proteínas. No GC estão as partículas pré-ribossomais que serão destinadas para o citoplasma (OLSON; DUNDR; SZEBENI, 2000). O nucléolo não está presente em todo o ciclo, pois é dissociado no começo da divisão celular quando a transcrição e conseqüente produção de pré-mRNA é interrompida. No fim da divisão, o nucléolo se reorganiza em um processo denominado nucleologênese, no qual os componentes nucleolares dispersos voltam ao núcleo, se associam aos corpos pré-nucleolares que se fundem e formam o nucléolo (HERNANDEZ-VERDUN, 2002).

Os genes de rDNA podem estar em três estados, i) inativos e condensados na heterocromatina, ii) ativos e transcritos, em uma conformação estendida dentro dos nucléolos, ou, iii) disponível para transcrição, mas ainda não transcritos (HUANG et al., 2006). Mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações de histonas, determinam a proporção de cada um desses estados dentro da célula (GRUMMT; PIKAARD, 2003).

Estudos epigenéticos vêm contribuindo para o entendimento da regulação gênica de espécies amplamente difundidas. Wako et al. (2004) estudaram a distribuição de H4K5ac em diferentes fases do ciclo celular de cevada (*Hordeum vulgare*). Na prófase, as regiões centroméricas apareceram fortemente acetiladas, em seguida, ocorreu uma diminuição súbita da acetilação nas regiões centroméricas e as RONS começaram a ser acetiladas na pró-metáfase. O alto nível de acetilação de RONS foi mantido até a anáfase, posteriormente, as regiões centroméricas foram novamente acetiladas na telófase, porém, a acetilação nas RONS desapareceu, indicando que existe uma dinâmica na distribuição de H4K5ac nesse genoma entre as diferentes fases do ciclo celular.

Em *Urochloa*, Paula et al. (2016) não observaram marcações para H3K4me2

(Eucromatina), porém algumas RONS apresentaram fraca marcação da H3K9me2 (Heterocromatina). Os sinais da H3K9me2 e da 5-mCyt foram coincidentes na RON de alguns cromossomos, indicando um controle da expressão gênica através do silenciamento dessas RONS. Também em espécies de *Urochloa*, Nani et al. (2016) analisaram a atividade transcricional dos sítios de rDNA 45S por meio da Ag-NOR e observaram variação em relação ao número de sítios ativos. Essa variação é muito observada em espécies aloploidoides e em híbridos, e é conhecida como dominância nucleolar (ND) ou inicialmente descrita como anfiplastia diferencial.

Esse fenômeno epigenético já foi descrito em plantas, insetos, anfíbios e mamíferos e mostra que as RONS de um genoma parental são dominantes em relação ao outro, ocorrendo o silenciamento dos genes de rRNA de um dos parentais dentro do núcleo híbrido (REEDER, 1985; PIKAARD, 1999; NEVES et al., 2005; MCSTAY, 2006; TUCKER et al., 2010). Dessa forma, a ND pode ser considerada um dos mecanismos de dosagem gênica que regula o número de genes de rRNAs ativos de acordo com demanda celular de síntese protéica (VIEGAS et al., 2002; PIKAARD, 2014).

O primeiro relato de ND em plantas foi feito por Navashin em 1928, quando estudava cariótipos do gênero *Crepis*. Desde então, o efeito de ND já foi observado em várias culturas de grande importância econômica, incluindo algumas Poaceae como *Triticum*, *Secale*, *Hordeum* e também em espécies dos gêneros *Brassica* e *Citrus* (CARPETA, 2002; CHEN; PIKAARD, 1997; PIKAARD, 2000; MARQUES et al., 2011; HOUCHINS et al., 1997). Muitos desses estudos utilizaram técnicas citogenéticas associadas a ferramentas moleculares no intuito de fornecer informações mais consistentes sobre o fenômeno.

O silenciamento dos genes de rRNA envolve a metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas e RNAi, porém, os mecanismos que discriminam o genoma preferencialmente ativo e as consequências dessa discriminação não foram totalmente elucidados (VIEGAS et al., 2002; PIKAARD, 2014). Sabe-se que a ND é um processo independente de efeitos maternos e paternos, e não aleatório, o mesmo conjunto parental de genes de rRNA é sempre silenciado (PIKAARD, 2014), e além disso, dentro desse fenômeno as espécies seguem uma hierarquia. Em *Brassicas*, Chen e Pikaard (1997) estudaram as relações genômicas nas principais espécies do gênero identificando a seguinte hierarquia: *Brassica nigra* > *Brassica rapa* > *Brassica oleracea*, ou seja, se a espécie A for dominante sobre a espécie B, e B for dominante numa dada espécie C, então A será sempre dominante em relação a C (MCSTAY, 2006).

Uma série de hipóteses foi considerada como possível explicação sobre como ocorre o silenciamento preferencial dos genes ribossomais. A hipótese dos fatores de transcrição espécie-específica foi elaborada a partir do fato de que, embora as sequências de DNA repetitivo que especificam os rRNAs 18S, 5.8S e 26S sejam altamente conservadas em eucariotos superiores, as sequências de rDNA intergenéticas divergem substancialmente durante a evolução (PIKAARD, 2014). O estudo *in vitro* de células de camundongo e humanos visou explicar como ocorre esse fenômeno em espécies não relacionadas, propondo uma co-evolução dos fatores de transcrição da RNA polimerase I com os promotores dos genes de rRNAs, a qual torna esses fatores específicos de uma espécie. Assim, os genes ribossomais de um dos genitores podem não ser reconhecidos pelos fatores de transcrição em um híbrido, resultando no completo silenciamento dos genes de rRNA herdados deste genitor. Entretanto, essa hipótese não explica a ocorrência da dominância nucleolar em híbridos naturais (REEDER, 1985; PIKAARD, 2002).

Outra hipótese seria a do desequilíbrio de *enhancers* observada primeiramente em híbridos do gênero *Xenopus*. Nele, a dominância de uma RON em relação a outra é baseada no fato de que elementos repetitivos podem servir como *enhancers* (segmentos de DNA que influenciam os promotores para a transcrição dos genes ribossômicos), sugerindo que aquele promotor de gene ribossomal que possui maior quantidade de *enhancers* adjacentes domina aqueles que tem menor número de *enhancers* adjacentes (REEDER, 1985). Apesar de ser bem estabelecida em algumas espécies, como aloploidos de *Triticum aestivum* (MUKAI; ENDO; GILL, 1991), essa hipótese também não se aplica em todos os casos.

Viegas et al. (2002) estudaram eventos bem estabelecidos de dominância nucleolar e levantaram uma hipótese na qual a escolha do genoma silenciado ocorre através da necessidade de compactação do genoma de cada genitor dentro do núcleo híbrido. Dessa forma, se um genoma tem menos espaço nuclear disponível no híbrido, relativo à sua condição diploide, a associação da cromatina é mais provável de ocorrer em maior extensão no genoma maior. Assim, estabelecendo uma associação mais íntima entre domínios heterocromáticos, acarretando no silenciamento de suas regiões repetitivas, que, através de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e das histonas, serão assim mantidas nos sucessivos ciclos celulares.

Recentemente, Borowska-Zuchowska e Hasterok (2017), ao investigarem o estado epigenético do gene rRNA 35S em um híbrido resultante de um cruzamento entre *Brachypodium distachyon* e *Brachipodyum stacei*, mostraram que os sítios de rDNA hereditários de *B. stacei* reprimidos se encontravam na região extranucleolar, e apresentaram

alto nível de metilação do DNA e da H3K9me2, enquanto que os sítios herdados de *B. distachyon* se encontravam na região peri e intranucleolar, com baixo nível de metilação do DNA. Os autores utilizaram o tratamento com 5-azacitidina, um agente hipometilante de DNA, que se mostrou insuficiente para a reativação transcricional destes loci herdados de *B. stacei*, indicando que outros fatores, além da metilação do DNA e de histonas, estão por trás da supressão dos sítios rDNA dentro no genoma de *Brachypodium hybridum*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Genético

As análises citogenéticas e moleculares foram realizadas com genótipos *Urochloa ruziziensis* (sexual), tetraploidizada por Timbó et al. (2014), *Urochloa brizantha* cv. Marandu (apomítica), cultivada em 2016 a partir de sementes comerciais, e o respectivo híbrido H1863, oriundo de um cruzamento realizado em 2014. Os genótipos apresentam  $2n=4x=36$  cromossomos e genomas  $B^2B^2B^2B^2$ ;  $BBB^1B^1$  e  $BB^1B^2B^2$ , respectivamente (PAULA et al. 2017).

O material genético foi cedido pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, o experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e as plantas foram mantidas em vasos na casa de vegetação.

#### 3.2 Preparação das lâminas

Para a obtenção de núcleos interfásicos, as raízes foram coletadas, lavadas e fixadas em solução de etanol: ácido acético (3:1) e submetidas à digestão enzimática em um mix de enzimas contendo celulase “Onozuka R10” (0,7%), celulase Sigma-Aldrich (0,7%), pectoliase Sigma-Aldrich (1%) e citohelicase Sigma-Aldrich (1%) por 1h e 40 minutos a 37°C. As lâminas foram preparadas pela técnica de secagem ao ar (CARVALHO; SARAIVA, 1993) e avaliadas no microscópio de luz. Aquelas que apresentaram células sem resquícios de parede e citoplasma foram submetidas à técnica de Imuno-FISH.

### 3.3 Imunolocalização de modificações de histonas (H3K9me2)

A técnica de imunolocalização de modificações de histonas foi realizada segundo o método descrito por Chelysheva et al. (2013), com algumas modificações. As lâminas foram levadas ao micro-ondas em tampão citrato (pH 6) por 40 segundos e imediatamente transferidas para PBS 1X durante 5 minutos. As lâminas foram incubadas em BSA 10% (Albumina de soro bovino) durante 1h em câmara úmida e temperatura ambiente e, posteriormente, em anticorpo primário (anti dimetil Histona H3(lys9) mouse polyclonal IgG, Millipore) diluído 1:100 em BSA 3% por, no mínimo, 18h a 4°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS 1X e a detecção foi realizada com anticorpo secundário (Goat anti-mouse IgG TRITC-conjugated) diluído 1:100 em BSA 3% por 1h a 37°C. Após as lavagens em PBS 1X, as lâminas foram montadas e contra-coradas em DAPI (4', 6 diamidino-2-fenilindol)/Vectashield (2µg/mL). Foi avaliado o padrão das marcas de metilação na região do nucléolo no núcleo interfásico em 10 células para cada material.

### 3.4 Imunolocalização da metilação do DNA (5-metil citosina – 5-mCyt)

A imunolocalização da 5-metilcitosina foi baseada em Suzuki et al. (2010), com algumas modificações. O material foi bloqueado com BSA 10% durante 30 minutos em câmara úmida (temperatura ambiente) e incubado com anticorpo primário anti-5metilcitosina (mouse monoclonal, Millipore) diluído em BSA 3% (1:200) por 1h a 37°C. Após 3 lavagens em PBS 1X, foi aplicado anticorpo secundário (anti-mouse IgG TRITC conjugated) diluído em BSA 1% (1:200) por 1h a 37°C. As lâminas foram montadas e contrastadas em DAPI (2µg/mL)/Vectashield. Foi avaliado o padrão das marcas de metilação na região do nucléolo no núcleo interfásico em 15 células para cada material.

### 3.5 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para a FISH foi utilizada a sonda de rDNA 45S (pTa 71 de *Triticum aestivum* L.) marcada previamente com biotina-16-dUTP através de reação de *nick-translation*. A lâmina foi desnaturada em formamida 70% em SSC 2x a 85°C por 1 min e 25s, seguido de desidratação em série alcoólica 70%, 90% e 100%. A mistura de hibridização contendo

formamida (50%), sulfato de dextran (10%), SSC 2x pH 7.0, 50-100ng de sonda marcada com biotina foi desnaturada a 95°C por 8 minutos, seguida de 5 minutos no gelo. A mistura de hibridização foi aplicada sobre a preparação cromossômica, coberta com lamínula 24x32mm e vedada. Foi feita a hibridização a 37°C em câmara úmida por, no mínimo, 24 horas. A detecção das sondas foi feita com o uso dos anticorpos estreptavidina conjugada com alexafluor 488 após lavagens estringentes com tampão SSC 2x a 42°C e TNT. Os cromossomos foram contrastados com DAPI (2µg/mL)/Vectashield.

### **3.6 Análise Microscópica**

As imagens foram capturadas usando uma câmera QImaging Retiga EXi CCD acoplada a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60 nos comprimentos de onda de excitação/emissão 550/575 para o TRITC e de 358/461 para o DAPI e 495/515 para a FITC.

### **3.7 RT-qPCR - Análise da expressão gênica**

#### **3.7.1 Extração do RNA total e Síntese de cDNA**

A extração do RNA total foi realizada de tecidos foliares jovens de quatro plantas por espécie estudada, *U. brizantha*, *U. ruziziensis* e seu híbrido. Para este fim, fora utilizado o Kit PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Após extração, a quantidade de RNA foi mensurada no equipamento NanoVue™ Plus Spectrophotometer a 230, 260 e 280 nm, observando se as proporções 260/280 e 260/260 nm dentro do intervalo de 1.80-2.20 foi satisfeita. A qualidade ou integridade do RNA, por sua vez, foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose, em tampão TAE (Tris, EDTA e ácido bórico), livre de RNase. Na sequência, o RNA total foi tratado com TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific) e novamente quantificado em Nanovue™ Plus Spectrophotometer.

A síntese da primeira fita cDNA foi realizada utilizando High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. Para tanto, foi preparado o RT master mix contendo 2,0 µL de 10x RT Buffer, 0,8 µL de 25x dNTP Mix (100 mM), 2,0 µL de 10x RT Random Primers, 1,0 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase e 4,2 µL de H<sub>2</sub>O nuclease-free. Uma vez preparado, 10 µL de 2X RT master mix foram reunidos a 10 µL de RNA em um tubo 0,2 mL, homogeneizados e submetidos em termociclador a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, 85°C por 5 min e 4°C por tempo indeterminado. Ao final, as bibliotecas de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C até a realização das análises de expressão.

### 3.7.2 Desenho dos primers

Inicialmente, foram obtidas, juntamente ao GenBank Home – NCBI, as sequências ITS-1 depositadas para as duas espécies *U. brizantha* e *U. ruzizensis*, sob os números de acesso AY346349 e AY346352, respectivamente. Estas sequências foram submetidas ao alinhamento por meio da ferramenta on line Clustal Omega, no intuito de verificar a existência de SNPs, para os quais seriam desenhados os primers para PCR e RT-qPCR. Devido à significativa identidade entre as sequências ITS-1 das espécies estudadas, o desenho dos primers diferenciadores foi realizado manualmente, respeitando as exigências de qualidade estabelecidas, aferidas conforme software OligoAnalyzer 3.1 on line (<HTTPS://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

De posse das sequências, optou-se pelo desenho dos primers Forwards, capazes de diferenciar as duas espécies, tendo como base a extremidade 3' do primer. Uma vez que o primer Reverse haveria de ser comum a ambas, utilizou-se para sua obtenção da ferramenta on line Primer3Plus – Bioinformatics software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

A fim de viabilizar a discriminação das espécies por meio de PCR convencional, foi estabelecido que o primer Forward específico para *Urochloa brizantha* seria aumentado em 13 nucleotídeos escolhidos aleatoriamente (TABELA 1), possibilitando que, na eletroforese em gel de poliacrilamida ou MetaPhor Agarosis, os fragmentos pudessem ser diferenciadas visualmente.

Tabela 2 - Primers para PCR e RTqPCR para regiões ITS-1 de *Urochloa brizantha* e *U. ruzizensis* e primers candidatos a normalizadores (Fwd e Rvs apresentados nesta sequência). Em negrito, nucleotídeos aleatórios adicionados propositalmente para aumentar o produto da PCR, sendo este o único primer não utilizado em RTqPCR, mas somente em PCR end point.

Bz_Fwd	<b>AGTCACGGATGTAGGCGTCAAGGAACACTACTT</b>
qBz_Fwd	GGCGTCAAGGAACACTACTT
Rz_Fwd	GGCGTCAAGGAACACTGAAA
BzRz_Rvs	GTTGCCGAGAGTCGTATTGAT
ACT12_Fwd	GGGTGGAGAGAGATTGCAGGTTA
ACT12_Rvs	GGGAACTGAGGCAACCACAGA
EF1- $\alpha$ _Fwd	CAAGGCTGCTGCCAAGAAGA
EF1- $\alpha$ _Rvs	CTGCAAGAACCAGCCTTGAACA
$\alpha$ -TUB5_Fwd	CGTGTGCATGATCAGCAACA
$\alpha$ -TUB5_Rvs	GCGCTTGGCGTACATCAGAT

### 3.7.3 PCR e RT-qPCR

Inicialmente, as PCRs foram realizadas sobre DNA genômico, de *Urochloa brizantha* cv Marandu, *Urochloa ruziziensis* e do híbrido 1863, a fim de verificar a especificidade das ampliações utilizando os primers desenhados para a região ITS-1 destas duas espécies e, coerentemente, para a presença de ambas no material híbrido. Uma vez confirmada a amplificação nas PCRs com DNA genômico, foram realizadas PCRs sobre DNA complementar (cDNA), na expectativa de verificar, em caráter qualitativo, os níveis de expressão no híbrido *U. brizantha* x *U. ruziziensis* das sequências ITS-1 de cada parental.

Dois mixes de PCR foram conduzidos, contando no primeiro da presença do primer Forward específico para *U. brizantha* e, no segundo, da presença do primer Forward específico para *U. ruziziensis*. Os demais componentes foram adicionados igualmente em ambos os mixes, a saber: 30-50 ng de DNA, 5 µL de 5X Green GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer contendo MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1 µL de cada primer 10 µM Forward (Brz ou Ruz) e Reverse (BzRz), 1 µL de mix dNTP 2,5 µM e 0,25 µL de GoTaq<sup>®</sup> DNA polimerase (5u/µL), além de H<sub>2</sub>O nuclease free para completar a reação de 25 µL.

Os programas executados nas PCRs supracitadas foram ajustados para uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizada a 72°C por 10 minutos e estabilizada a 4°C até o momento da análise sob eletroforese em gel de agarose a 1.5 %.

### 3.7.4 RT-qPCR

Em caso de diferença em nível qualitativo de amplificação das regiões ITS-1 nos materiais genéticos estudados (*U. brizantha*, *U. ruziziensis* e seu híbrido 1863), reações quantitativas foram realizadas a fim de corroborar sobre a predominância de algum material parental em nível nucleolar no organismo híbrido.

Como pré-requisito para avaliação dos níveis de expressão das sequências ITS-1 específicas para *U. brizantha* e *U. ruziziensis* no híbrido 1863, foi necessária a avaliação da eficiência dos primers desenhados para estas sequências, além dos primers para o gene referência Actina 12. A eficiência dos primers seguiu sendo realizada em série de diluições do cDNA (5<sup>-1</sup>, 5<sup>-2</sup>, 5<sup>-3</sup>, 5<sup>-4</sup>, 5<sup>-5</sup>), em mix contendo 1,5 µL de cDNA diluído, 0,3 µL de cada primer (50 µM), 7,5 µL de Sybr Green e 5,4 µL de H<sub>2</sub>O. É relevante ressaltar que a eficiência dos

primers desenhados para ITS-1s de *U. brizantha* e *U. ruzizensis* foi realizada sobre o cDNA de *U. brizantha* e *U. ruzizensis*, respectivamente. Já a eficiência dos primers de referência (Act12, EF1- $\alpha$  e  $\alpha$ -TUB5) foi realizada para ambas as espécies.

Uma vez conhecida a eficiência dos primers, seguiu-se para as qPCRs sobre a biblioteca de cDNA do híbrido 1863, a fim de verificar a possível existência de dominância nucleolar de um de seus parentais. Todas as reações foram realizadas no equipamento Rotor-Gene. As reações foram realizadas em 15  $\mu$ L de volume de reação: 7,5  $\mu$ L de SYBR-verde (QuantiFast SYBR Green PCR Kit - Qiagen), 0,3  $\mu$ L (1  $\mu$ M de concentração final na reação) de iniciadores diretos e reversos específicos de genes (ver Tabela 1 para iniciador sequências e eficiências de amplificação), 1,5  $\mu$ L de cDNA a 10 ng /  $\mu$ L e 5,4 de água sem RNase-DNase. As reações foram realizadas em triplicatas e a amplificação realizada com as seguintes condições de reação: ativação inicial da enzima com 5 minutos a 95 °C, depois 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos, seguido por 10 segundos aos 60 °C e completado por uma análise da curva de fusão para acessar a especificidade da reação elevando a temperatura de 60 a 95 °C, com aumento de temperatura de 1 °C a cada 5 segundos. As diferenças relativas da dobra foram calculadas com base no método  $\Delta\Delta$ CT (PFAFFL, 2001) usando Actina12 (ACT12) como gene de referência (TAKAMORI et al., 2017) e foram calculados em relação a uma amostra de calibração, que foi selecionada com base no menor nível de expressão, entre os tempos de amostragem e o estágio de amadurecimento, para cada gene. Os parâmetros RT-qPCR foram realizados de acordo com as informações mínimas para a publicação de diretrizes quantitativas de experimentos de PCR em tempo real (MIQE) (BUSTIN et al., 2009).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do status de metilação do DNA (5-mCyt) e da dimetilação da H3K9 (H3K9me2) em sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos

A avaliação do número de sinais FISH para os sítios de rDNA 45S mostrou que há variações entre os três genótipos avaliados, além de variações em núcleos do mesmo genótipo. Em *U. ruziziensis* foram evidenciados quatro, cinco e seis sítios de rDNA 45S (TABELA 3, FIGURAS 2 e 3). Dentre os núcleos interfásicos avaliados em *U. ruziziensis*, 16 apresentavam quatro sítios de rDNA 45S (TABELA 3). Em *Urochloa brizantha* cv. Marandu foi observada uma variação de dois e três (TABELA 4, FIGURAS 4 e 5), com maior frequência de dois sítios em 18 núcleos interfásicos. Os núcleos interfásicos do híbrido 1863 apresentaram predominância de quatro e cinco sítios de rDNA 45S sendo também observados núcleos com três e seis sítios (TABELA 5, FIGURAS 6 e 7).

Os sítios de rDNA 45S foram avaliados de acordo com a posição e estado de metilação para 5-mCyt e H3K9me2. Foram observados sítios extranucleolares, perinucleolares e intranucleolares. Estes sítios foram classificados como hipometilados, hipermetilados e hiper/hipometilados (parcialmente hipermetilados e hipometilados). Os sítios hiper/hipometilados foram observados na posição intranucleolar e, em alguns casos, na periferia do nucléolo. Outra característica desses sítios é que eles frequentemente apareciam na forma de cromatina distendida (FIGURAS 2, 3, 4 e 5). Nos três genótipos, foi constatada maior frequência de sítios associados ao nucléolo, independentemente do número de sítios observados em cada núcleo.

Para *U. ruziziensis* foram avaliados 69 e 43 sítios de rDNA 45S para 5-mCyt e H3K9me2, respectivamente, sendo observado um predomínio de sítios posicionados no interior e na periferia dos nucléolos (TABELA 3). Núcleos que apresentaram quatro e seis sítios, a maior porcentagem estava hipometilado e hiper/hipometilado (cerca de 70% para ambas as marcas), enquanto que as células com cinco sítios apresentaram 46,67% de sítios hipermetilados para 5-mCyt e 33,33% para H3K9me2. Todos os sítios em posição extranucleolar estavam hipermetilados (FIGURAS 2 e 3).

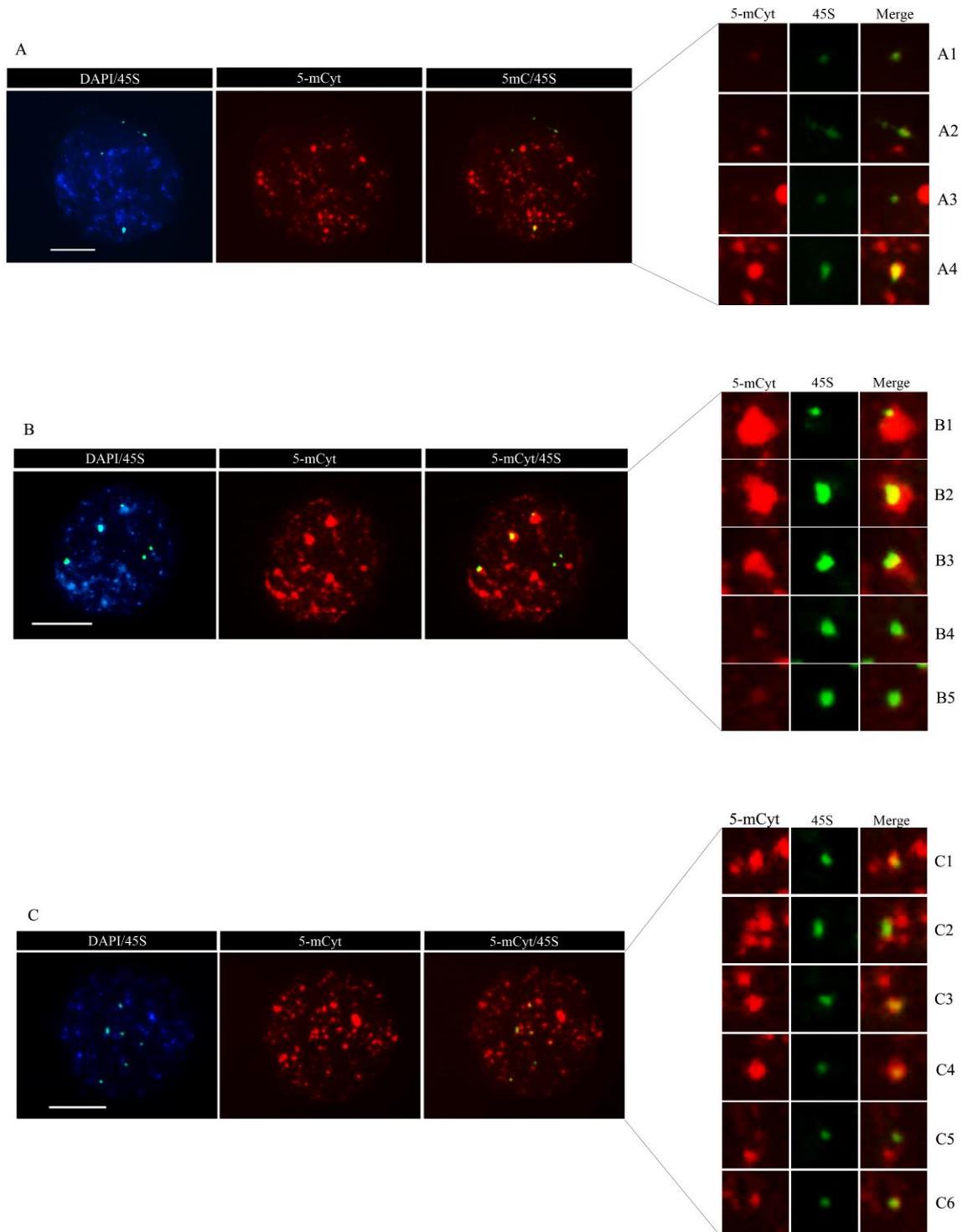
Tabela 3 - Posição e status de metilação das citosinas e da dimetilação da H3K9 (H3k9me2) dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos de *U. ruziziensis* tetraploidizada.

<b>n° de sítios de rDNA</b>	<b>Posição</b>	<b>Hipermetilados</b>	<b>Hipometilados</b>	<b>Hiper/hipometilados*</b>	<b>% Total</b>
<b>5-mCyt</b>					
<b>Núcleos com 4 sítios</b>	Extranucleolares	0	0	0	<b>0</b>
	Perinucleolares	6	6	7	<b>52,78</b>
	Intranucleolares	2	8	7	<b>47,22</b>
<b>Total de sítios 36</b>	<b>% Total</b>	<b>22,22</b>	<b>38,89</b>	<b>38,89</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 5 sítios</b>	Extranucleolares	2	0	0	<b>13,33</b>
	Perinucleolares	4	2	0	<b>40</b>
	Intranucleolares	1	2	4	<b>46,67</b>
<b>Total de sítios: 15</b>	<b>% Total</b>	<b>46,67</b>	<b>26,67</b>	<b>26,67</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 6 sítios</b>	Extranucleolares	1	0	0	<b>5,56</b>
	Perinucleolares	1	0	3	<b>22,22</b>
	Intranucleolares	3	7	3	<b>72,22</b>
<b>Total de sítios: 18</b>	<b>% Total</b>	<b>27,78</b>	<b>38,89</b>	<b>33,33</b>	<b>100</b>
<b>H3k9me2</b>					
<b>Núcleos com 4 sítios</b>	Extranucleolares	2	0	0	<b>7,14</b>
	Perinucleolares	6	1	6	<b>46,42</b>
	Intranucleolares	0	6	7	<b>46,42</b>
<b>Total de sítios 28</b>	<b>% Total</b>	<b>28,58</b>	<b>25</b>	<b>46,42</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 5 sítios</b>	Extranucleolares	2	0	0	<b>13,33</b>
	Perinucleolares	2	2	0	<b>26,67</b>
	Intranucleolares	1	2	6	<b>60</b>
<b>Total de sítios: 15</b>	<b>% Total</b>	<b>33,33</b>	<b>26,67</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

\*Sítios que se apresentam parcialmente hipermetilados e hipometilados.

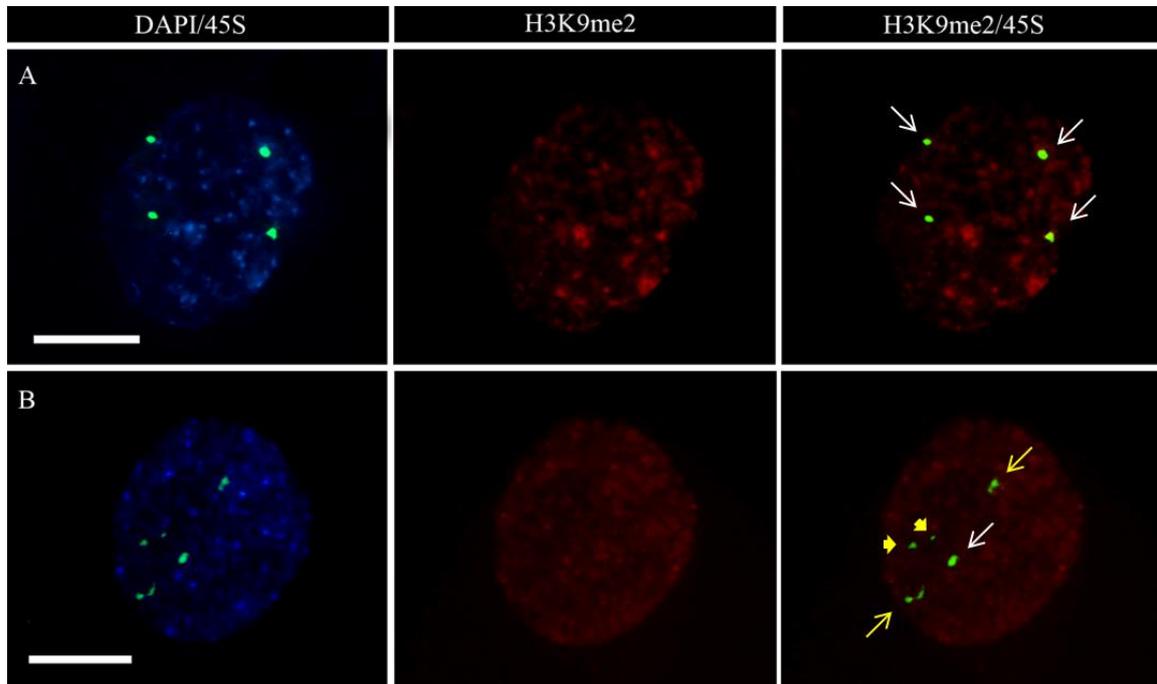
Fonte: Do autor

Figura 2 - Variação do número e status de metilação do DNA (5-mCyt) nos sítios de rDNA 45S em *U. ruziziensis*, A: quatro sítios B: cinco sítios e C: seis sítios. Barra: 10µm



Legenda: Status dos sítios de rDNA 45S: A1, B2, C1, C3, C4, C6 – hipermetilados; A2, A4, B1, B3, B5, C2 – hiper/hipometilados; A3, B4, C5 – hipometilado.

Figura 3 - Variação do número e status da dimetilação da H3K9 (H3K9me2) nos sítios de rDNA 45S em *U. ruziziensis*, A: quatro sítios e B: cinco sítios. Barra: 10µm



Legenda: Seta branca: sítios hiper/hipometilados condensados; Seta amarela: sítios hiper/hipometilados estendidos; Ponta de seta amarela: Sítios hipometilados.

Em *U. brizantha* cv. Marandu foram avaliados 35 sítios de rDNA 45S para 5-mCyt e 22 sítios para H3K9me2 e apenas três estavam localizados na cromatina extranucleolar (TABELA 4). Nessa espécie houve uma maior tendência de hipermetilação do sítios de rDNA 45S para ambas as marcas (acima de 50%) (TABELA 4, FIGURA 3) e independente do número de sítios evidenciados em cada núcleo.

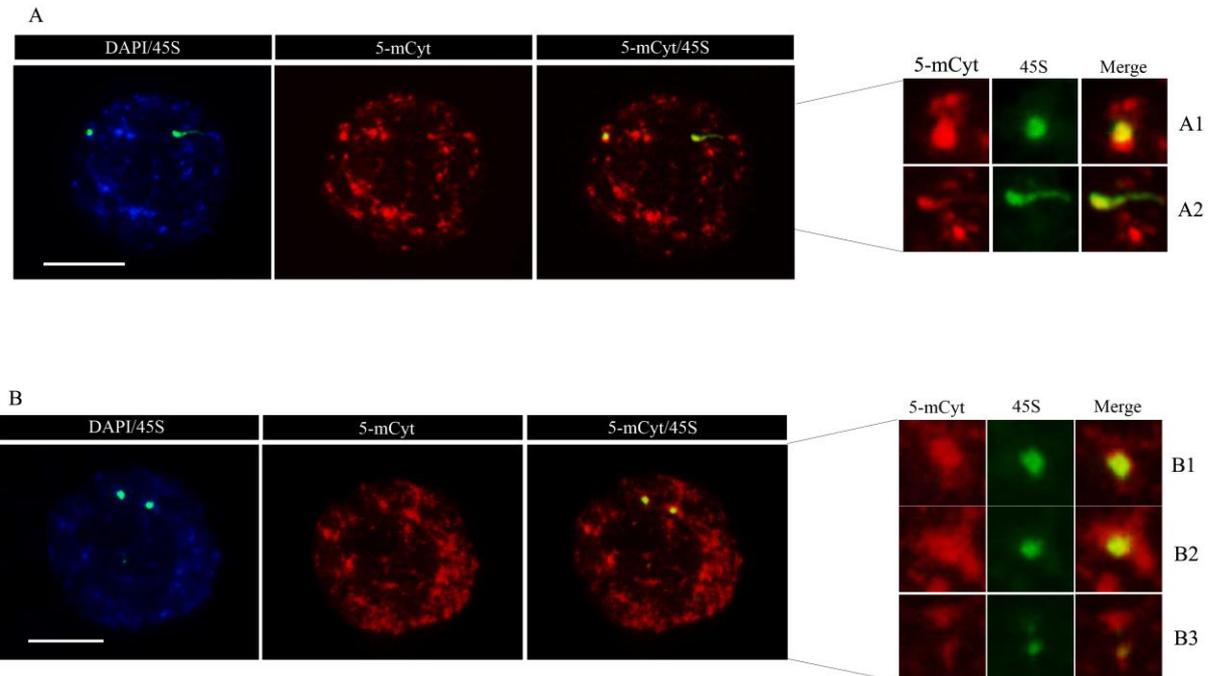
Tabela 4 - Posição e status de metilação das citosinas e da dimetilação da H3K9 (H3k9me2) dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos de *U. brizantha* cv. marandu.

Nº de sítios de rDNA	Posição	Hipermetilados	Hipometilados	Hiper/hipometilados*	% Total
<b>5-mCyt</b>					
<b>Núcleos com 2 sítios</b>	Extranucleolares	2	0	0	<b>10</b>
	Perinucleolares	6	0	1	<b>35</b>
	Intranucleolares	5	0	6	<b>55</b>
<b>Total de sítios:</b>	<b>% Total</b>	<b>65</b>	<b>0</b>	<b>35</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 3 sítios</b>	Extranucleolares	1	0	0	<b>6,66</b>
	Perinucleolares	5	0	2	<b>46,6</b>
	Intranucleolares	2	2	3	<b>46,6</b>
<b>Total de sítios:</b>	<b>% Total</b>	<b>53,33</b>	<b>13,33</b>	<b>33,34</b>	<b>100</b>
<b>H3K9me2</b>					
<b>Núcleos com 2 sítios</b>	Extranucleolares	0	0	0	<b>0</b>
	Perinucleolares	6	0	2	<b>50</b>
	Intranucleolares	4	0	4	<b>50</b>
<b>Total de sítios:</b>	<b>% Total</b>	<b>62,5</b>	<b>0</b>	<b>37,5</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 3 sítios</b>	Extranucleolares	0	0	0	<b>0</b>
	Perinucleolares	4	0	0	<b>66,67</b>
	Intranucleolares	1	0	1	<b>33,33</b>
<b>Total de sítios:</b>	<b>% Total</b>	<b>83,33</b>	<b>0</b>	<b>16,67</b>	<b>100</b>

\*Sítios que se apresentam parcialmente hipermetilados e hipometilados

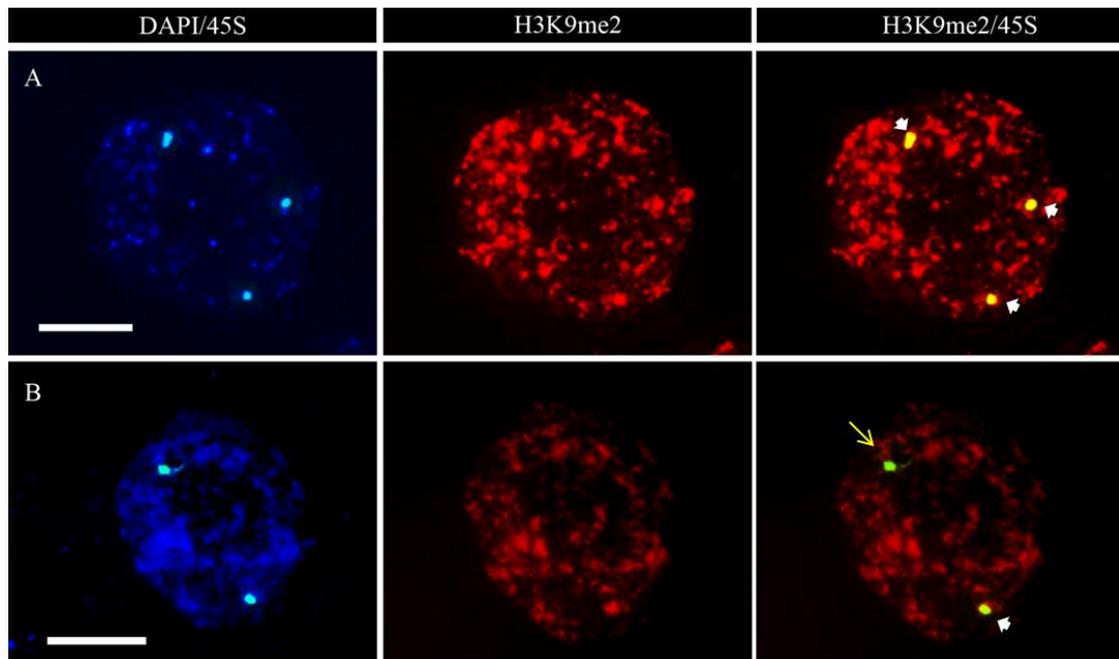
Fonte: Do autor

Figura 4 - Variação do número e status de metilação do DNA (5-mCyt) nos sítios de rDNA 45S em *U. brizantha* cv. Marandu A: dois sítios B: três sítios. Barra: 10µm.



Legenda: A1, B1, B2- Hipermetilado; A2, B3- Hiper/hipometilado

Figura 5 - Variação do número e status da dimetilação da H3K9 (H3K9me2) nos sítios de rDNA 45S em *U. brizantha* cv. Marandu A: dois sítios B: três sítios. Barra: 10µm.



Legenda: Seta amarela: Sítios hiper/hipometilados estendidos; Ponta de seta branca: Sítios hipermetilados.

No híbrido 1863 foram avaliados 72 e 42 sítios de rDNA 45S para 5-mCyt e H3K9me2, respectivamente, também com predominância dos sítios na posição peri e intranucleolares (acima de 75%, para ambas as marcas) (TABELA 5). Em relação ao estado de metilação de DNA desses sítios foi novamente observado que a maioria se encontrava no estado hipermetilado e hiper/ hipometilado (acima de 70%, para ambas as marcas). Dentre os sítios extranucleolares, somente 4 estavam hiper/ hipometilados (2 sítios para 5-mCyt e 2 para H3k9me2) e os demais se apresentaram totalmente metilados, independente do número total de sítios encontrados nos núcleos avaliados – três, quatro, cinco ou seis (TABELA 5 e FIGURA 4).

Tabela 5 - Posição e status de metilação das citosinas e da dimetilação da H3K9 (H3k9me2) dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos de H1863 (*U. ruziziensis* tetraploidizada X *U. brizantha* cv. marandu).

Nº de sítios de rDNA	Posição	Hipermetilados	Hipometilado	Hiper/ hipometilados*	% Total
<b>5-mCyt</b>					
<b>Núcleos com 4 sítios</b>	Extranucleolares	2	0	1	<b>12,5</b>
	Perinucleolares	4	2	5	<b>45,83</b>
	Intranucleolares	2	2	6	<b>41,7</b>
<b>Total de sítios: 24</b>	<b>% Total</b>	<b>33,33</b>	<b>16,67</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 5 sítios</b>	Extranucleolares	0	0	0	<b>0</b>
	Perinucleolares	4	2	3	<b>30,0</b>
	Intranucleolares	8	3	10	<b>70</b>
<b>Total de sítios: 30</b>	<b>% Total</b>	<b>40</b>	<b>16,67</b>	<b>43,33</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 6 sítios</b>	Extranucleolares	3	0	1	<b>22,22</b>
	Perinucleolares	1	2	2	<b>27,78</b>
	Intranucleolares	1	2	6	<b>50</b>
<b>Total de sítios: 18</b>	<b>% Total</b>	<b>27,78</b>	<b>22,22</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>H3k9me2</b>					
<b>Núcleos com 3 sítios</b>	Extranucleolares	0	0	1	<b>16,67</b>
	Perinucleolares	2	0	1	<b>50</b>
	Intranucleolares	0	0	2	<b>33,33</b>
<b>Total de sítios: 6</b>	<b>% Total</b>	<b>33,33</b>	<b>0</b>	<b>66,67</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 4 sítios</b>	Extranucleolares	0	0	0	<b>0</b>
	Perinucleolares	3	1	8	<b>50</b>
	Intranucleolares	1	5	6	<b>50</b>
<b>Total de sítios: 24</b>	<b>% Total</b>	<b>16,67</b>	<b>25</b>	<b>58,33</b>	<b>100</b>
<b>Núcleos com 6 sítios</b>	Extranucleolares	1	0	1	<b>16,67</b>
	Perinucleolares	3	1	2	<b>50</b>
	Intranucleolares	1	1	1	<b>33,33</b>
<b>Total de sítios: 12</b>	<b>% Total</b>	<b>41,67</b>	<b>16,67</b>	<b>41,67</b>	<b>100</b>

\* Sítios que se apresentam parcialmente hipermetilados e hipometilados

Fonte: Do autor

Figura 6 - Variação do número e status de metilação do DNA (5-mCyt) nos sítios de rDNA 45S no H1863 A: quatro sítios B: cinco sítios e C: seis sítios. Barra: 10 $\mu$ m.

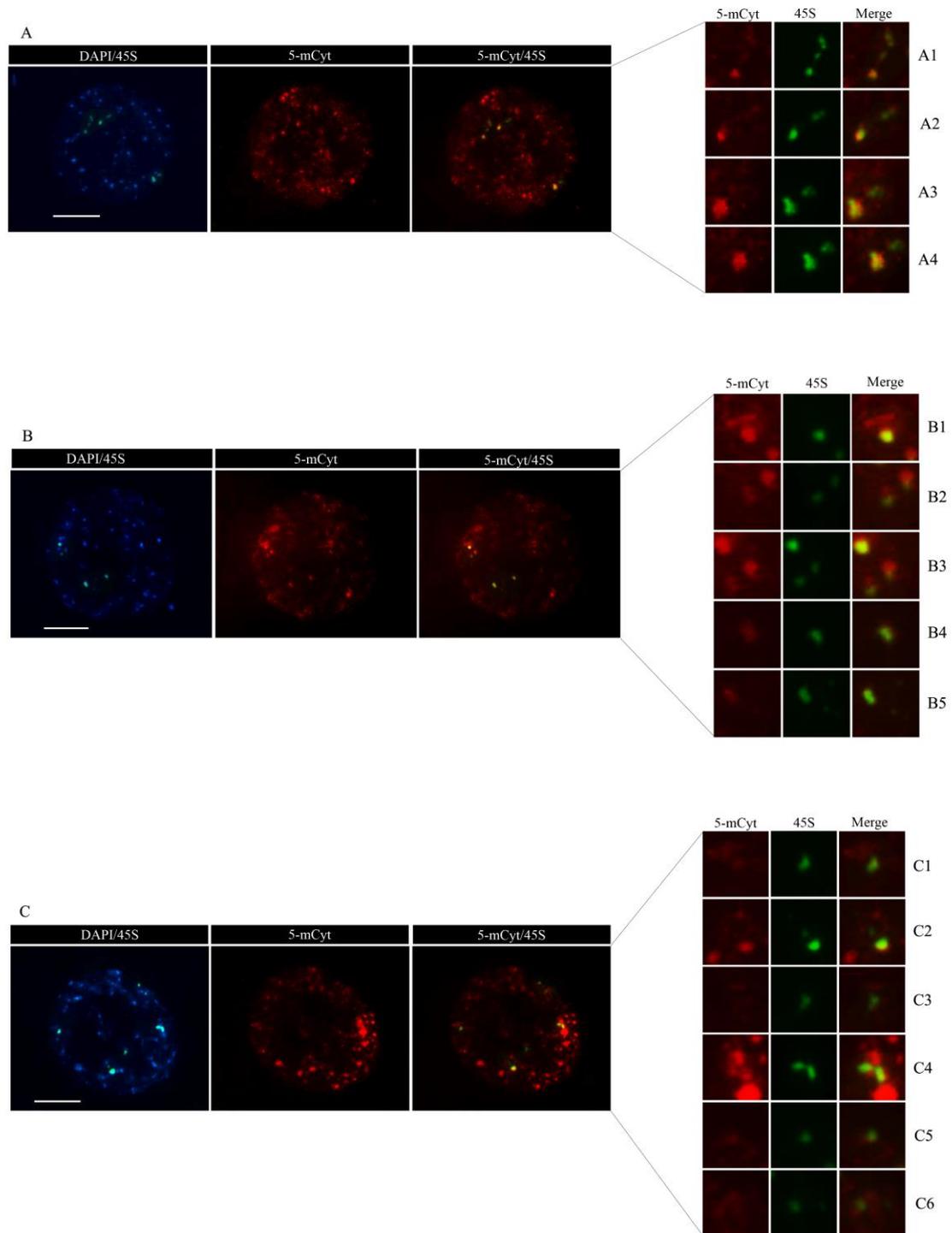
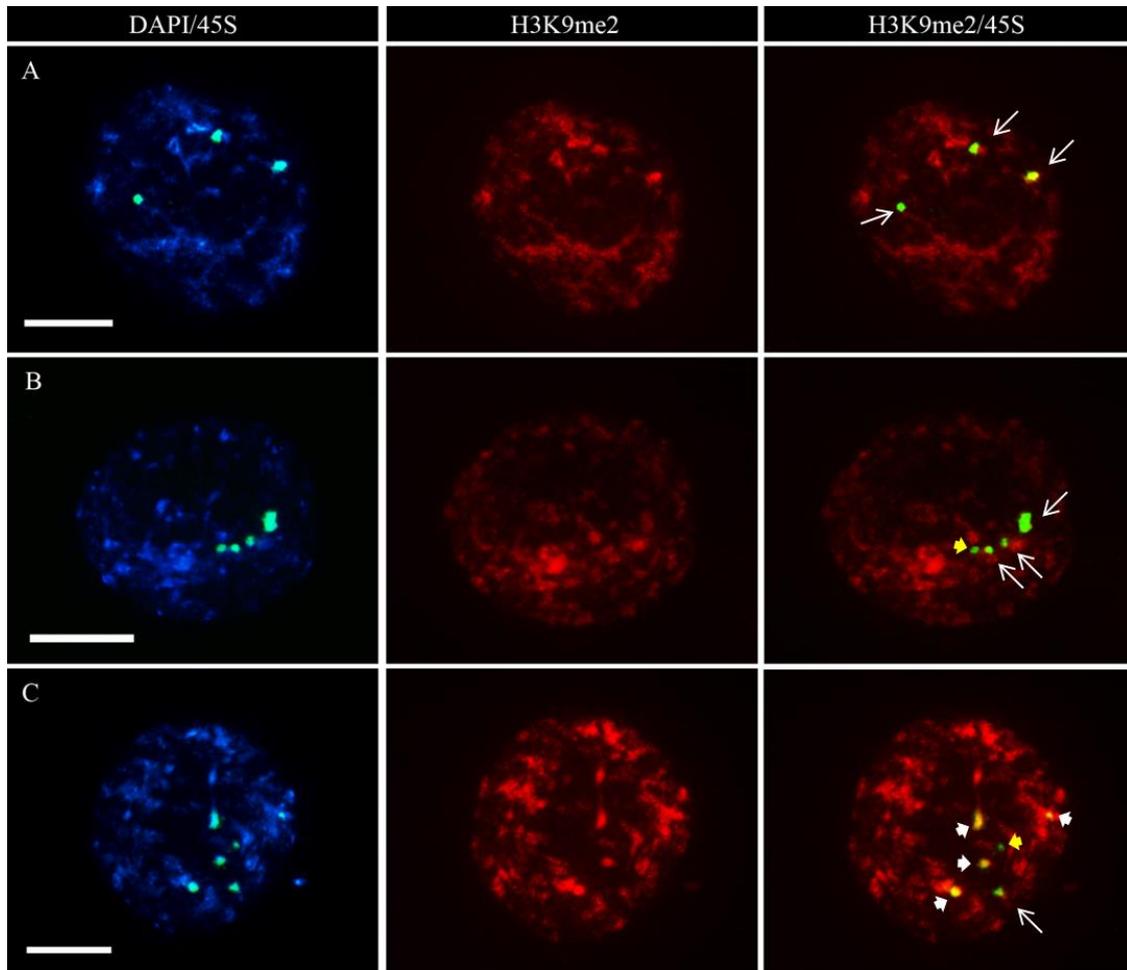


Figura 7 - Variação do número e status da dimetilação da H3K9 (H3K9me2) nos sítios de rDNA 45S no H1863 A: três sítios B: quatro sítios e C: seis sítios. Barra: 10µm.



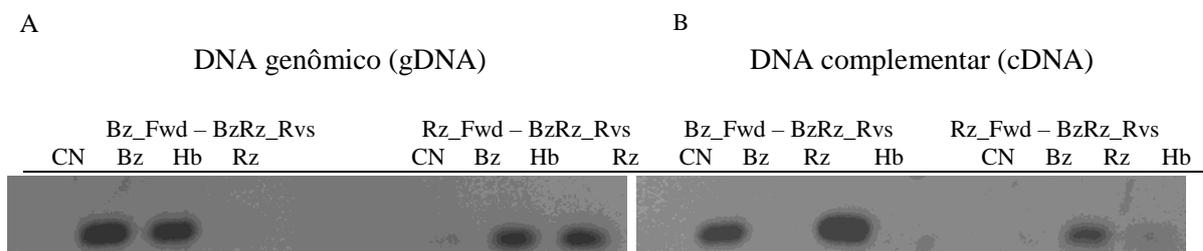
Legenda: Seta branca: sítios hiper/hipometilados condensados; Ponta de seta branca cheia: Sítios hipermetilados; Ponta de seta amarela: Sítios hipometilados.

#### 4.2 Análise e Comparação dos transcritos dos sítios de rDNA 45S

Para confirmar a especificidade dos primers desenhados para as duas espécies, *U. brizantha* e *U. ruzizensis* (TABELA 2), PCRs convencionais foram realizadas sobre o DNA genômico (gDNA) de ambas, bem como de seu híbrido (1863). Como se observa na FIGURA 8A, a amplificação de cada par de primers confirma que, tanto o parental quanto o híbrido, apresentam padrão de amplificação para cada par de primers. Uma vez que o híbrido apresenta rDNA de *U. brizantha* e *U. ruzizensis*, questionou-se sobre a possibilidade de que algum genoma parental pudesse ser dominante nas ações de expressão de rDNA, o que seria indicativo de dominância nucleolar (ND). A fim de se obter uma análise qualitativa preliminar sobre esta questão, as PCRs foram repetidas, dessa vez sobre o DNA complementar (cDNA),

sob a hipótese de que poderia existir, entre os transcritos ribossomais, predominância de alguma das espécies. De fato, conforme resultado apresentado na FIGURA 8B, foi notável no híbrido a expressão do rRNA de *U. brizantha* em detrimento de *U. ruziziensis*, apontando para a necessidade de confirmação quantitativa deste cenário.

Figura 8 - Géis de agarose com os resultados das PCRs utilizando os iniciadores Bz\_Fwd – BzRz\_Rvs e Rz\_Fwd – BzRz\_Rvs sobre os DNAs genômico e complementar. Primers utilizados: Bz\_Fwd, Rz\_Fwd e BzRz\_Rvs; DNAs utilizados: *U. brizantha* (Bz), *U. ruzizienis* (Rz) e híbrido 1863 (Hb).



Legenda: CN - Controle Negativo, Bz - *U. brizantha*, Hb - Híbrido 1863, Rz - *U. ruziziensis*.

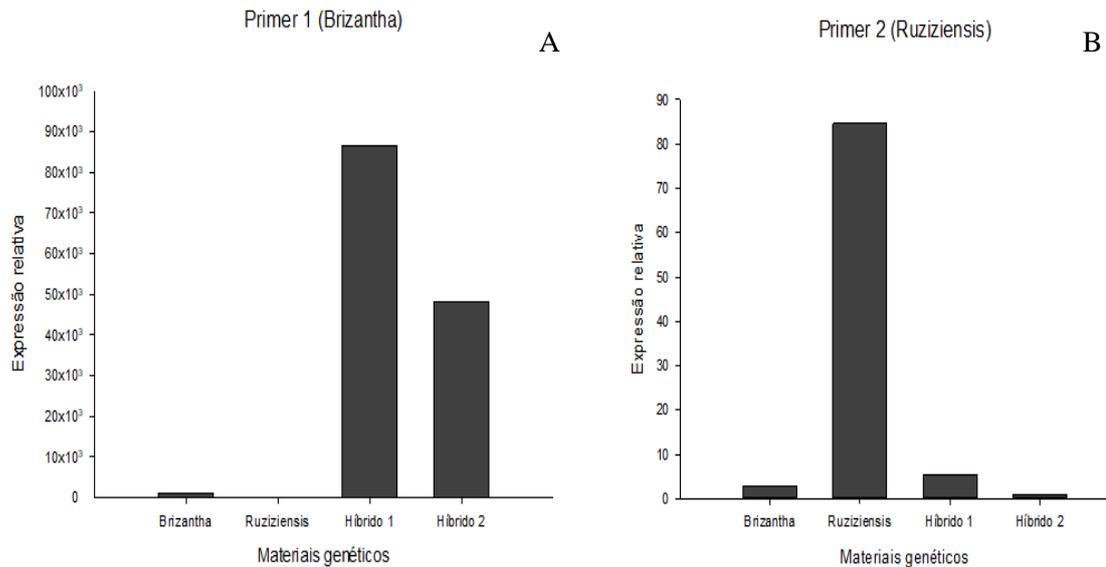
Para certificação da predominância da expressão do rRNA de *U. brizantha* no híbrido 1863, tornou-se necessária a realização de um ensaio de RTqPCR. Como gene de referência, três genes candidatos a normalizadores foram obtidos da literatura (TAKAMORI et al., 2017). Para tanto, a eficiência dos mesmos precisou ser validada nas duas espécies estudadas, sendo que neste ensaio, o gene para Actina 12 se destacou entre os demais e fora adotado como gene de referência deste ensaio. A decisão a favor deste normalizador se baseou no fato de que os outros dois genes pré-selecionados, Eukaryotic initiation factor 4 A (EF1- $\alpha$ ) e Tubulin alfa-5 ( $\alpha$ -TUB5), não apresentaram padrão de amplificação em *U. ruziziensis*.

A FIGURA 9A apresenta a expressão relativa dos parentais *U. brizantha* e *U. ruziziensis* e respectivo híbrido interespecífico para o par de primer desenhado para a região ITS-1 do gene rDNA 45S da espécie *U. brizantha*. Foi notável a expressão significativamente maior dentro do genótipo H1863, mesmo quando comparado com o próprio *U. brizantha*. Servindo como controle da reação, nota-se que *U. ruziziensis* não apresentou expressão para este par de primers.

Considerando a FIGURA 9B, encontra-se representada a expressão relativa dos parentais *U. brizantha*, *U. ruziziensis* e respectivo híbrido interespecífico para o par de primer desenhado para a região ITS do gene rDNA 45S da espécie *U. ruziziensis*. Neste caso, observou-se maior expressão para o genótipo *U. ruziziensis*, enquanto que para os genótipos

H1863 e *U. brizantha*, os níveis de expressão foram baixos, consideravelmente menores quando comparados com *U. ruziziensis*.

Figura 9 - RT-qPCR utilizando os pares de primers qBz\_Fwd e BzRz\_Rvs (A) e Rz\_Fwd e BzRz\_Rvs (B).



Comparando os níveis de expressão de duas réplicas biológicas do híbrido 1863, foi notável a predominância na expressão do rDNA de *U. brizantha* em detrimento de *U. ruziziensis*. Este resultado semi - quantitativo corrobora com aquele observado no ensaio por PCR convencional sobre cDNA, o que é indicativo de que análises preliminares por PCR convencional podem ser utilizadas a fim de qualificar expressão diferencial.

## 5. DISCUSSÃO

A variação de dois e três sítios de rDNA 45S em *U. brizantha* cv. Marandu corrobora a descrição de Nani et al. (2016) em C-metáfases para essa mesma cultivar. *Urochloa ruziziensis* tetraploidizada e o híbrido H1863, que apresentaram variações quanto ao número de sítios de rDNA45S, foram descritos por Paula et al. (2016) com número constante de quatro sítios de rDNA 45S. Essa variação observada nos núcleos interfásicos pode ser consequência de descondensação parcial desses sítios, que, aparentemente, os dividem em blocos menores permanecendo conectados por uma fina fibra de DNA, como já relatado em *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* e *Festuca arundinacea* (ROCHA et al., 2017; FERREIRA, 2017).

Em relação ao status das marcas 5-mCyt e H3K9me2, em *U. ruziziensis* e H1863, sítios localizados na cromatina intra e perinucleolar, em sua maioria, se encontravam em estado hipometilado, condizendo com seu estado descondensados e apto à transcrição dos rRNAs 5,8 S, 18 S e 26 S. Os sítios hiper/hipometilados também associados à cromatina nucleolar se caracterizaram pela descondensação parcial e por apresentarem frações ativas e silenciadas de rDNA. Esses sítios reúnem várias cópias do gene de rDNA 45S, considerados *housekeeping*, pois desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, visto que os rRNAs associados a complexos proteicos são responsáveis pela formação do ribossomo e pela síntese proteica (GUETG; SANTORO, 2012; HEMLEBEN et al., 2004).

Nos três genótipos avaliados, frequentemente os sítios extranucleolares apresentavam hipermetilação para ambas as marcas epigenéticas investigadas, mas também foram observados sítios intranucleolares hipermetilados. Esse estado epigenético caracteriza regiões condensadas e genes transcricionalmente inativos (SILVA et al., 2008). Os sítios hipermetilados, além da função de regulação da síntese de rRNA, desempenham papéis importantes ao nível da arquitetura da cromatina (GUETG; SANTORO, 2012).

A variação na atividade transcricional entre os sítios de rDNA 45S de uma mesma célula é justificada pelo fato de que os genes de rRNA são altamente conservados e compartilham as mesmas sequências, porém nem todos estão transcricionalmente ativos (SANTORO; GRUMMT, 2001), sendo possível observar em *U. ruziziensis* e no híbrido H1863 relação entre a posição dos sítios de rDNA 45S dentro do domínio nuclear e o grau de metilação do DNA e H3K9me2 desses sítios. Os sítios que se encontravam associados ao nucléolo apresentaram menor grau de metilação da 5-mCyt e H3K9me2 quando comparados com aqueles que se encontravam na cromatina extranucleolar. Essa mesma relação foi

observada em núcleos interfásicos de *Brachypodium hybridum* (BOROWSKA-ZUCHOWSKA, HASTEROK, 2017), *Quercus robur* (BOCKOR et al., 2014) e espécies do complexo *Lolium-Festuca* (FERREIRA, 2017).

A presença de sítios hipo/hipermetilados (com frações hipermetiladas e hipometilados) em todos os genótipos estudados é justificada pelo fato de que a atividade dos genes de rDNA 45S pode ser regulada pela supressão do *locus* inteiro ou pela supressão de apenas alguns genes dentro do *locus*, uma vez que estes são compostos por sequências altamente repetitivas dentro do genoma (ELLIS et al., 1990). Relatos semelhantes foram feitos em *Lolium perenne*, *L. multiflorum* e *Festuca arundinacea* por Ferreira (2017), *Brachypodium hybridum* (BOROWSKA-ZUCHOWSKA, HASTEROK, 2017) e em *Citrus* (MARQUES et al., 2011)

Estudos mostraram que a transição entre o estado ativo e o estado silenciado dos genes de rRNA é mediada por NoRC (complexo de remodelação nucleolar), um complexo de remodelação de cromatina que compreende a ATPase SNF2h e uma subunidade principal, denominada TIP5. A segmentação de NoRC para rDNA desencadeia o estabelecimento de modificações de histonas heterocromáticas e metilação de DNA, levando à compactação de cromatina e ao silenciamento transcricional de uma fração de repetições de rDNA (GUETG; SANTORO et al., 2012; POSTEPSKA-IGIELSKA; GRUMMT, 2014). A marca epigenética dominante que caracteriza os rRNAs silenciados é a metilação do DNA, que compromete o acesso da maquinaria de transcrição da RNA Polimerase I aos sítios de rDNA (GUETG; SANTORO et al., 2012). A regulação da supressão dos sítios de rDNA também pode ocorrer na forma de controle da dosagem gênica dos sítios ativos. Um exemplo bem característico dessa dosagem gênica é aquela que ocorre em híbridos e aloploidos, onde os sítios de rDNAs de um parental é parcial ou completamente silenciado dentro do genoma híbrido (GRUMMT; PIKKARD, 2003), caracterizando a ND.

Em *U. brizantha*, a maioria dos sítios de rDNA 45S, independentemente da sua posição dentro do núcleo, se encontrava hipermetilada para ambas as marcas. Essa alta porcentagem pode ser relacionada com sua origem aloploidos e os mecanismos de regulação gênica que envolvem esses organismos, uma vez que os genomas de poliploides recentes passam por alguns processos pós-poliploidização sofrendo rearranjos cromossômicos, perda de sequências, proliferação de transposons, irregularidades meióticas e alterações no padrão de expressão gênica, incluindo silenciamento através da ação de metiltransferases (COMAI et al., 2000; SOLTIS et al., 2015).

No híbrido H1863, cerca de 67% dos sítios de rDNA 45S estão aptos à transcrição (hipometilados ou hiper/hipometilados). Esse status epigenético, combinado com a análise da expressão diferencial dos genes ribossomais 45S, indica, assim como para *U. brizantha*, a ocorrência do fenômeno de dominância nucleolar (ND). O trabalho de Paula et al. (2016) já havia apontado evidências sobre a regulação epigenética dos sítios de rDNA 45S nesses dois genótipos, onde marcas de H3K9me2 e 5-mCyt foram coincidentes na RON de alguns cromossomos, indicando controle da expressão gênica por meio do silenciamento dessas RONs.

Os resultados das análises moleculares, mostraram a dominância da expressão dos genes de rDNA 45S de *U. brizantha* sobre *U. ruziziensis* no híbrido H1863. Assim, é plausível inferir um cenário de ND, onde o padrão de sítios hipermetilados na citosina e com marcas heterocromáticas e, portanto, silenciados, foram herdados de *U. ruziziensis*, enquanto que a porção de rDNA dominante quanto à expressão originada de *U. brizantha* foi caracterizada pela hipometilação da citosina e da H3k9me2.

Esse fenômeno epigenético de regulação da região nucleolar é amplamente documentada em outras plantas, sendo descrita como um mecanismo reversível e regulado pelo estágio de desenvolvimento (CHEN, PIKAARD, 1997). Os genes silenciados de rDNA são efetivamente desregulados por inibidores químicos de metilação de DNA ou desacetilação de histonas, reforçando a implicação das modificações de cromatina na manutenção do silenciamento dos genes ribossomais. Esse processo foi descrito por Lawrence et al. (2004), que estudou a dominância nucleolar em um híbrido proveniente do cruzamento entre *A. arenosa* x *A. thaliana*, no qual verificou-se que era possível a reativação da NOR silenciada a partir de agentes que promovem a desacetilação de histonas e a desmetilação do DNA. Esses estudos tiveram resultados parecidos também em *Secale cereale* e em Triticale (CARPETA et al., 2007; CASTILHO et al., 1999). Entretanto, Borowska-Zuchowska e Hasterok (2017), ao investigarem o estado epigenético do gene rDNA 45S em um híbrido resultante de um cruzamento entre espécies de *Brachypodium distachyon* e *Brachipodyum stacei*, mostraram que os sítios de rDNA herdados de *B. stacei* apresentaram alto nível de metilação do DNA e de H3K9me2, caracterizando o estado inativo desses sítios, porém o tratamento com um agente hipometilante de DNA foi insuficiente para a reativação transcricional destes sítios, indicando que, embora os fatores epigenéticos tenham alta influência no estado de repressão dos genes ribossomais, fatores genéticos também podem estar envolvidos na supressão desses sítios.

*U. brizantha* cv. Marandu e *U. ruziziensis* tetraploidizada foram descritas possuindo 3,52 pg/2C (TIMBÓ et al., 2014) e 2,92 pg/2C (TIMBÓ et al., 2014a), respectivamente. Considerando as hipóteses relacionadas com os mecanismos de escolha do genoma dominante, a dominância dos genes ribossomais de *U. brizantha* sobre os de *U. ruziziensis* não pode ser explicada pela hipótese proposta por Viegas et al., (2002) onde o genoma de menor tamanho seria o genoma dominante.

A ND observada neste estudo pode ser relacionada com a composição e representatividade genômica dos parentais do híbrido H1863 demonstrada nos estudos citogenômicos de Paula et al. (2017). A sonda de DNA genômico (gDNA) de *U. brizantha* (alotetraploide com genomas  $BBB^1B^1$ ) hibridizou 70,57% do genoma do híbrido H1863 (genomas  $BB^1B^2B^2$ ) e somente 34,67% com sonda proveniente de *U. ruziziensis* (autotetraploide com genomas  $B^2B^2B^2B^2$ ). Esses resultados indicam maior representatividade ou homologia com as sequências dos genomas B e  $B^1$  de *U. brizantha* sobre o genoma  $B^2$  de *U. ruziziensis* nesse híbrido e corroboram a expressão diferencial dos sítios de rDNA 45S em favor do parental *U. brizantha*.

Em análises realizadas por Nani et al. (2016), foi observado heteromorfismo em relação aos sítios de rDNA 45S nos cromossomos das plantas parentais do híbrido H1863. Os blocos de rDNA 45S de *U. brizantha* apresentaram cerca de 0.65 a 1.43  $\mu\text{m}$  de comprimento em comparação com os de *U. ruziziensis*, com 0.39 a 1  $\mu\text{m}$ ., indicando que o número de cópias gênicas no cluster de rDNA 45S de *U. brizantha* é maior. Essa informação contribui também para explicar a transcrição preferencial dos genes herdados de *U. brizantha*. De forma análoga, em *Triticum*, Houchins et al. (1997) observaram que o rDNA com um espaçador intergênico mais longo (IGS) contendo mais elementos repetitivos a montante do local de iniciação da transcrição (TIS) dominam aqueles com IGS mais curtos. Considerando que os genes rDNA 45S se apresentam em forma de clusters gênicos, pode se inferir que o tamanho desse cluster possa influenciar na determinação do genoma dominante.

## 6. CONCLUSÃO

A metilação do DNA e a dimetilação da H3K9 tem papel fundamental no processo de determinação/manutenção do estado de condensação dos sítios de rDNA 45S, e estão diretamente associadas com as diferentes conformações dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos de *U. brizantha*, *U. ruziziensis* e respectivo híbrido.

A dominância nucleolar no híbrido entre *U. ruziziensis* e *U. brizantha* é resultado da expressão preferencial do genes de rDNA 45S herdados de *U. brizantha*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, Y.; YAMADA-AKIYAMA, H.; EBINA, M. Morphological diversity of chromosomes bearing ribosomal DNA loci in *Brachiaria* species. **Grassland Science**, Hoboken, v. 56, n. 4, p. 217-223, December 2010.
- ARGEL, P. J. et al. **Cultivar Mulato II (Brachiaria híbrida CIAT 36087)**: Gramínea de alta qualidade e produção forrageira, resistente às cigarrinhas e adaptada a solos tropicais ácidos. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 2007. 22 p.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 381-395, February 2011.
- BASAPPA, G. P.; MUNIYAMMA, M.; CHINNAPA, C. C. An investigation of chromosome numbers in the genus *Brachiaria* (Poaceae: Paniceae) in relation to morphology and taxonomy. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 11, p. 2297-2309, November 1987.
- BERNINI, C.; MARIN-MORALES, M. A. Karyotype analysis in *Brachiaria* (Poaceae) species. **Cytobios Journal**, Cambridge, v. 104, n. 407, p. 157-171, January 2001.
- BOČKOR, V.V. et al. Inhibition of DNA methylation alters chromatin organization, nuclear positioning and activity of 45S rDNA loci in cycling cells of *Q. robur*. **PloS one**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. 1-15, August 2014.
- BOLDRINI, K. R. et al. Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses  $x=6$  for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). **Genet Mol Res**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 1444-1450, December 2009.
- BOROWSKA-ZUCHOWSKA, N.; HASTEROK, R. Epigenetics of the preferential silencing of *Brachypodium stacei*-originated 35S rDNA loci in the allotetraploid grass *Brachypodium hybridum*. **Scientific reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1-12, July 2017.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611-622, February 2009.
- CAPERTA, A.D.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C.S.; PREUSS, S. Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizer in *Secale cereale*. **Protoplasma**, Wien, v. 232, p. 55-59, December 2007.
- CARNAHAN, H. L., Hill, H. D. Cytology and genetics of forage grasses. **The Botanical Review**, New York, v. 27, n. 1, p. 1-162, Jan 1961.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. **Heredity**, Grã-Bretanha, v. 70, n. 5, p. 515-519, May 1993.

- CASTILHO, A. et al. 5-Methylcytosine distribution and genome organization in *Triticale* before and after treatment with 5-azacytidine. **Journal of Cell Science**, London, v. 112, n. 23, p. 4397-4404, December 1999.
- CHELYSHEVA, L. A.; GRANDONT, L.; GRELON, M. Immunolocalization of meiotic proteins in Brassicaceae: Method 1. In: PAWLOWSKI, W. P.; GRELON, M.; ARMSTRONG, S. **Plant Meiosis: Methods and Protocols**. New York: Springer Science+Business Media, 238 p., 2013.
- CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. **Genes & development**, Woodbury, v. 11, n. 16, p. 2124-2136, August 1997.
- CHRISTOPHER, J.; ABRAHAM, A. Studies on the cytology and phylogeny of south Indian grasses III. Subfamily VI: Panicoideae, tribe (i) the Paniceae. **Cytologia**, Tokyo, v. 41, n. 3-4, p. 621-637, February 1976.
- COMAI, L. et al. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 9, p. 1551-1567, September 2000.
- DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen & Unwin, 519 p., 1955.
- DAUJAT, S., et al. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1. 4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 280, n. 45, p. 38090-38095, August 2005.
- DUJARDIN, M. Additional chromosome numbers and meiotic behavior in tropical African grasses from western Zaire. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, n. 8, p. 864-876, April 1979.
- ELLIS, T. N. et al. Methylated and undermethylated rDNA repeats are interspersed at random in two higher plant species. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 73-80, Jan 1990.
- FERREIRA, M. T. **Relação entre as Metilações do DNA e da histona H3 com o comportamento dos sítios de rDNA 45S em cromossomos e núcleos interfásicos de *Lolium e Festuca***. 2017. 65 p. Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade federal de Lavras, LAVRAS, 2017.
- FUCHS, J. et al. Chromosomal histone modification patterns: from conservation to diversity. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 4, p. 199-208, Apr. 2006.
- FUKS, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. **Current opinion in genetics & development**, London, v. 15, n. 5, p. 490-495, October 2005.

GRUMMT, I; PIKAARD, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 4, n. 8, p. 641-649, August 2003.

GUETG, C., SANTORO, R. Formation of nuclear heterochromatin: the nucleolar point of view. **Epigenetics**, Barcelona, v. 7, n. 8, p. 811-814, June 2012.

HADJIOLOV A. A. **The nucleolus and ribosome biogenesis**. Cell Biology Monographs New York:Springer-Verlag, 263 p., 1985.

HEMLEBEN, V. et al. Molecular cell biology: organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolus structure. In: ESSER, K., LÜTTGE, U., BEYSCHLAG, W. & MURATA, J., Eds., **Progress in Botany 65**. Springer-Verlag, Berlin, p. 106–146. 2004.

HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P.; GÉBRANE-YOUNÈS, J. Emerging concepts of nucleolar assembly. **J Cell Sci**, v. 115, n. 11, p. 2265-2270, June 2002.

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

HOUCHINS, K. et al. Cytosine methylation and nucleolar dominance in cereal hybrids. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 255, n. 3, p. 294-301, July 1997.

HUANG, S.; ROTHBLUM, L. I.; CHEN, D. Ribosomal chromatin organization. **Biochemistry and cell biology**, Ottawa, v. 84, n. 4, p. 444-439, June 2006.

ISHIGAKI, G. et al. Induction of tetraploid ruzigrass (*Brachiaria ruziziensis*) plants by colchicine treatment of in vitro multipleshoot clumps and seedlings. **Grassland science**, Hoboken, v. 55, n. 3, p. 164-170, August 2009.

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

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. Chromatin-modifying and-remodeling complexes. **Current opinion in genetics & development**, London, v. 9, n. 2, p. 148-151, April 1999.

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

JASENCAKOVA, Z. et al. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 11, p. 2087-2100, November 2000.

LAM, E.; KATO, N.; WATANABE, K. Visualizing Chromosome Structure/Organization. **Annual Reviews Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 537–54, June 2004.

- LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular cell**, Freeman, v. 13, n. 4, p. 599-609, February 2004.
- LEWIS, M. S.; CHEVERUD, J. M.; PIKAARD, C. S. Evidence for nucleolus organizer regions as the units of regulation in nucleolar dominance in *Arabidopsis thaliana* Interecotype Hybrids. **Genetics**, Baltimore, v. 167, n. 2, p. 931-939, June 2004.
- MARQUES, A. et al. Characterization of eu- and heterochromatin of *Citrus* with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. **Cytogenetic and genome research**, Basel, v. 134, n. 1, p. 72-82, April 2011.
- MENDES-BONATO, A. U. et al. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell biology international**, Aberdeen, v. 26, n. 7, p. 641-646, July 2002.
- McSTAY, U. Nucleolar dominance: a model for rRNA gene silencing. **Genes & Development**, Woodbury, v. 20, n. 10, p. 1207-14, February 2006.
- MORRONE, O.; ZULOAGA, F. O. Revision de las especies sudamericanas nativas e introducidas de los géneros *Brachiaria* e *Urochloa* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Darwiniana**, Buenos Aires, v. 31, n. 1/4, p. 43-109, 1992.
- MUKAI, Y.; ENDO, T. R.; GILL, B. S. Physical mapping of the 18S. 26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. **Chromosoma**, Berlin v. 100, n. 2, p. 71-78, August 1991.
- NANI, T. F. et al. Physical Map of Repetitive DNA Sites in spp.: Intravarietal and Interspecific Polymorphisms. **Crop Science**, Madison, v. 56, n. 4, p. 1769-1783, May 2016.
- NANI, T. F. et al. Location of low copy genes in chromosomes of *Brachiaria* spp. **Molecular biology reports**, Rockville, v.45, n 1 p. 1-10, Jan 2018.
- NATH, J.; SWAMINATHAN, M. S. Chromosome numbers of some grasses. **Indian J. Genet**, New Delhi, v. 17, p. 102, 1957.
- NEVES, N. et al. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cytogenetic and genome research**, Basel, v. 109, n. 1-3, p. 104-111, March 2005.
- NIELEN, S. et al. Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 23, n. 1, p. 45-51, March 2010.
- OLSON, M. O. J.; DUNDR, M.; SZEBENI, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. **Trends in cell biology**, London, v. 10, n. 5, p. 189-196, May 2000.
- PAULA, C. M. P., SOBRINHO, F. S., TECHIO, V. H. Chromosomal distribution of H3K4me2, H3K9me2 and 5-methylcytosine: variations associated with polyploidy and

hybridization in *Brachiaria* (Poaceae). **Plant cell reports**, New York, v. 35, n. 6, p. 1359-1369, June 2016.

PAULA, C. M. P.; SOBRINHO, F. S.; TECHIO, V. H. Genomic Constitution and Relationship in *Brachiaria* (Poaceae) Species and Hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 57, n. 5, p. 2605-2616, August 2017.

PENTEADO, MI de O. et al. Determinação de ploidia e avaliação da quantidade de DNA total em diferentes espécies do gênero *Brachiaria*. **Embrapa Gado de Corte - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Campo Grande, 32p. Maio 2000.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, May 2001.

PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, n. 11, p. 495-500, November 2000.

PIKAARD, C.S. Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. **The Arabidopsis Book**, Rockville, p. 1-24, August 2002.

PIKAARD, C. S. Nucleolar dominance. **Encyclopedia of Life Sciences**, Chichester, Ed. John Wiley & Sons, 2014.

POSTEPSKA-IGIELSKA, A.; GRUMMT, I. NoRC silences rRNA genes, telomeres, and centromeres. **Cell Cycle**, Buffalo, v. 13, n. 4, p. 493-494, February 2014

REEDER, R. H. Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants. **Journal off Cell Biol**, New York, v. 101, n. 5, p. 2013-2016, November 1985.

RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. D.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAASS, B. L.; VALLE, C. B. do (Org.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Colombia: CIAT, 1996. p. 1-15.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. **Nature Reviews Genet**. London, v. 7, n. 5, p. 395-402, May 2006.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. U. A new basic chromosome number for the genus *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Genetics Research and Crop Evolution**, Gatersleben, v. 53, n. 1, p. 7-10, May 2006.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. U. A mutation in the spindle checkpoint arresting meiosis II in *Brachiaria ruziziensis*. **Genome**, Ottawa, v. 46, n. 4, p. 724-728, August 2003.

ROCHA, L. C. et al. Dynamics of 45S rDNA sites in the cell cycle: fragile sites and chromosomal stability in *Lolium* and *Festuca*. **Genetics and molecular research: GMR**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 1, p 1-9. January 2017.

SALARIATO, D. L. et al. Molecular phylogeny of the subtribe Melinidinae (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) and evolutionary trends in the homogenization of inflorescences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Illinois, v. 56, n. 1, p. 355-369, July 2010.

SANTORO, R.; LI, J.; GRUMMT, I. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. **Nature genetics**, London, v. 32, n. 3, p. 393-396, November 2002.

SCHANK, S. C.; SOTOMAYOR-RÍOS, A. Cytological studies on *Brachiaria* species. In: **Soil Crop Sci Soc Fla Proc**. 1968.

SCHWARZACHER, H. G.; WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Human genetics**, Berlin, v. 63, n. 2, p. 89-99, November 1983.

SEIFFERT, N. F. **Gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria***. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 83 p., 1984.

SHAW, P. The Plant Nucleolus. In: GREILHUBER J.; DOLEZEL J.; WENDEL J. (eds). **Plant Genome Diversity Volume 2**. Springer Vienna, p. 65-76, 2013.

SILVA, M. et al. Interplay of ribosomal DNA loci in nucleolar dominance: dominant NORs are up-regulated by chromatin dynamics in the wheat-rye system. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 12, p. 1-7, December 2008.

SOLTIS, P. S. et al. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current opinion in genetics & development**, London, v. 35, p. 119-125, December 2015.

SOUZA SOBRINHO, F. Melhoramento de forrageiras no Brasil. In: **Forragicultura e pastagens: temas em evidência**. Lavras: UFLA, 2005. p. 65-120.

SUZUKI, G. et al. DNA methylation and histone modification in onion chromosomes. **Genes Gent Syst**, Fukuoka, v. 85, n. 6, p. 377-382, December 2010.

SWENNE, A.; LOUANT, U. P.; DUJARDIN, M. Induction par la colchicine de formes autotétraploïdes chez *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard (Graminée). **Agron. Trop**, Maracay, v. 36, n. 2, p. 134-141, 1981.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. Oxford: Blackwell Science Ltda Blackwell Publishing company, p. 304, 2003.

TAKAMORI, L. M. et al. Identification of Endogenous Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in *Urochloa brizantha* Under Abiotic Stresses. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 1-11, August 2017.

TANG, W-Y. HO, S-M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**. Dresden, v. 8, n. 2, p.173-82, June 2007.

TIMBÓ, A. L. O. et al. Nuclear DNA content and chromosome number in *Brachiaria* spp. genotypes. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 1, p. 62-67, March 2014.

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

TUCKER, S.; VITINS, A.; PIKAARD, C. S. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. **Curr Opin Cell Biol**, Bethesda, v. 22, n. 3, p. 351–356, June 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Cattle Selected Countries Summary**. Foreign Agricultural Service, 2016. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cattle+Selected+Countries+Summary&hidReportRetrievalID=2575&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acessado em: 15 de Dezembro de 2017.

VALLE, C. B.; SINGH, R. J.; MILLER, D. A. Pachytene chromosome of *Brachiaria ruziziensis*. *Ger. Et Evrard. Plant Breeding*, Berlin, v. 78, n. 1, p. 75-78, February 1987.

VALLE, C. B. New sexual accessions in *Brachiaria*. **Apomixis Newsletter**, Paris, v. 3, p. 11–13, 1991.

VALLE, C. B.; PAGLIARINI, M. S. Biology, cytogenetics, and breeding of *Brachiaria*. In: SINGH, R. J. (Ed.). **Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement**, v. 5 forage crops. Boca Raton: CRC, p. 103-105, 2009.

VALLE, C. B.; SAVIDAN, Y. Genetics, cytogenetics and reproductive biology of *Brachiaria*. In: MILES, J. W. et al. (Ed.). **Brachiaria: biology, agronomy, and improvement**. Cali: CIAT; Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1996. p. 147-163. (CIAT. Publication, 259).

VALLE, C. B. et al. Melhoramento genético de *Brachiaria*. In: RESENDE, M. S. R.; VALLE, C.B.; JANK, L. **Melhoramento de forrageiras tropicais**, Campo Grande: EMBRAPA, v. 1, p. 13-53, 2008.

VIEGAS, W. et al. Nucleolar dominance: a ‘David and Goliath’ chromatin imprinting process. **Current Genomics**, Paris, v. 3, n. 6, p. 563-576, December 2002.

VOLKOV, R. A.; KOMAROVA, N. Y.; HEMLEBEN, V. Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. **Systematics and Biodiversity**, London, v. 5. n. 3, p. 261–276, March 2007.

WAKO, T. et al. Cell cycle-dependent and lysine residue-specific dynamic changes of histone H4 acetylation in barley. **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 49, n. 6, p. 643-651, August 2002.

ZERPA, D.M. Numero cromosomico de *Brachiaria decumbens*. **Agron. Trop. Venezuela**, Maracay, v. 2, p. 315, 1952.

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