



**FERNANDA MOTTA DA COSTA SANTOS**

**ASPECTOS DA DINÂMICA CROMOSSÔMICA  
E FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3  
RELACIONADOS COM A ELIMINAÇÃO  
CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS DE CAPIM-  
ELEFANTE E MILHETO  
(*Pennisetum* Rich., POACEAE)**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**FERNANDA MOTTA DA COSTA SANTOS**

**ASPECTOS DA DINÂMICA CROMOSSÔMICA E  
FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3 RELACIONADOS COM A  
ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS DE CAPIM-  
ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum* Rich., POACEAE)**

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

Orientadora

Dra. Lisete Chamma Davide

**LAVRAS - MG**

**2013**

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

Santos, Fernanda Motta da Costa.

Aspectos da dinâmica cromossômica e fosforilação da histona H3 relacionados com a eliminação cromossômica em híbridos de capim-elefante e milheto (*Pennisetum* Rich., Poaceae) / Fernanda Motta da Costa Santos. – Lavras : UFLA, 2013.

99 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Bibliografia.

1. Pareamento meiótico. 2. Hibridização *in situ*. 3. Poliploidia. 4. Imunolocalização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

**FERNANDA MOTTA DA COSTA SANTOS**

**ASPECTOS DA DINÂMICA CROMOSSÔMICA E  
FOSFORILAÇÃO DA HISTONA H3 RELACIONADOS COM A  
ELIMINAÇÃO CROMOSSÔMICA EM HÍBRIDOS DE CAPIM-  
ELEFANTE E MILHETO (*Pennisetum* Rich., POACEAE)**

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

APROVADA em 04 de abril de 2013.

Dra. Giovana Augusta Torres UFLA

Dr. José Marcello Salabert de Campos Universidade Federal de Juiz de  
Fora/MG

Dra. Vânia Helena Techio UFLA

Dra. Juliane Dornellas Nunes Embrapa Gado de Leite- Juiz de  
Fora/MG

Dra. Lisete Chamma Davide  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2013**

À Raquel, Ricardo, Aline, João Vitor e Gustavo, pelo carinho e por acreditaram  
em mim,  
**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos;

À Profa. Dra. Lisete Chamma Davide, pela orientação, pela paciência e amizade dedicadas;

À banca examinadora, pelos conselhos e críticas essenciais para a conclusão deste trabalho;

Aos Professores do Departamento de Biologia, pelos valiosos conhecimentos transmitidos;

Às Profas. Dra. Giovana Augusta Torres e Dra. Vânia Helena Techio, pela valorosa contribuição e auxílio prestados;

À Dra. Juliane Dornellas Nunes, pelo apoio com a coleta de material;

Às amigas, Amanda, Angélica e Édila, pela ajuda na confecção de lâminas, sem as quais este trabalho não seria possível;

Às minhas grandes e queridas amigas, Kátia e Iara, pela amizade sincera e carinho dedicado;

Aos amigos do Laboratório de Citogenética, pelo convívio e pelo apoio nas dificuldades do dia a dia;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente cooperaram para a realização e sucesso deste trabalho.

## RESUMO GERAL

O capim-elefante (*P. purpureum* Schumach) e o milheto (*P. glaucum* (L.) R. Brown.) são forrageiras de elevada importância econômica. Híbridos entre estas espécies são triploides ( $2n = 3x = 21$  cromossomos) e estéreis. A duplicação cromossômica tem sido empregada como forma de restaurar a fertilidade do híbrido interespecífico, obtendo-se plantas hexaploides. No entanto, plantas mixoploides são observadas com número cromossômico variando de 14 a 42, resultantes da eliminação cromossômica. Neste trabalho foram realizados estudos sobre o pareamento meiótico entre os genomas das espécies parentais, sobre a possibilidade de ocorrência de eliminação preferencial de cromossomos e sobre a fosforilação da histona H3 na serina 10 e sua relação com a eliminação cromossômica nos híbridos poliploidizados. Para isso foram empregadas as metodologias de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e genômica (GISH) em células germinativas e de imunolocalização em células somáticas e germinativas. O pareamento intergenômico foi observado, além da ocorrência de possíveis rearranjos genômicos envolvendo os cromossomos das duas espécies parentais nos híbridos hexaploides. Por meio da FISH, a sonda de DNAr 45S mostrou sinal de fluorescência em cromossomos adiantados ou atrasados em provável processo de eliminação. O sinal da sonda genômica (GISH), contendo o DNA do parental milheto, foi observado nos cromossomos de ambos os parentais, indicando possíveis rearranjos genômicos. A histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f), por meio de imunolocalização, apresentou-se localizada na região pericentromérica cromossômica desde a prófase até a telófase durante o ciclo celular. Na meiose, a H3S10f é enriquecida na região pericentromérica e se estende ao longo dos braços cromossômicos no milheto e é limitada à região pericentromérica no híbrido hexaploide. Cromossomos sem o sinal da fosforilação foram observados no híbrido poliploidizado. Em meiócitos de híbridos poliploidizados são eliminados tanto cromossomos inteiros do capim-elefante e do milheto quanto cromossomos contendo rearranjos. Pareamento intergenômico, rearranjos genômicos e a eliminação de sequências de DNAr 45S ocorrem após a hibridização e poliploidização. A distribuição dos sinais da H3S10f indica uma provável relação da fosforilação com a função de união cromatídica e cromossômica em genótipos de *Pennisetum* sp.

Palavras-chave: Pareamento meiótico. Hibridização *in situ*. Capim-elefante. Milheto. Poliploidia. Fosforilação de histonas. Imunolocalização.

## GENERAL ABSTRACT

Elephant grass (*P. purpureum* Schumach) and millet (*P. glaucum* (L.) R. Brown.) are fodder plants of high economic importance. Hybrids of these species are triploid ( $2n = 3x = 21$  chromosomes) and sterile. Chromosome duplication has been employed as a means to restore the fertility of the interspecific hybrid, obtaining hexaploid plants. However, mixoploid plants are observed with chromosomal number ranging from 14 to 42, resulted of chromosomal elimination. In this work we performed studies on the meiotic pairing between the parent species genomes, on the possibility of occurring preferential elimination of chromosomes and on the phosphorylation of histone H3 on serine 10 and their relation with chromosomal elimination on the polyploidized hybrids. In order to do this we employed fluorescent (FISH) and genomic (GISH) *in situ* hybridization methodologies on germ cells and immunolocating methodologies on somatic and germ cells. The intergenomic pairing was observed, in addition to the occurrence of possible genomic rearrangements involving the chromosomes of both parent species on the hexaploid hybrids. Using the FISH, the DNAr 45S probe showed signs of fluorescence on early of late chromosomes, probably in elimination process. The genomic probe signal (GISH), containing the millet parent DNA, was observed on the chromosomes of both parent plants, indicating possible genomic rearrangements. The phosphorylated histone H3 on serine 10 (H3S10f), by means of immunolocating, was located at the pericentromeric chromosomal region from the prophase to the telophase during the cell cycle. On the meiosis, the H3S10f is enriched in the pericentromeric region and extends along the chromosomal arms in the millet and is limited to the pericentromeric region in the hexaploid hybrid. Chromosomes without the phosphorylation signal were observed on the polyploidized hybrid. On polyploidized hybrid meiocytes, whole elephant grass and millet chromosomes as well as chromosomes containing rearrangements are eliminated. Intergenomic pairing, genomic rearrangements and the elimination of DNAr 45S sequences occur after hybridization and polyploidation. The distribution of the H3S10f signals indicate a probable relation of phosphorylation with the function of chromatid type and chromosomal union on *Pennisetum* sp. genotypes.

Keywords: Meiotic pairing. *In situ* hybridization. Elephant grass. Millet. Polyploidy. Histone phosphorylation. Immunolocating.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução geral .....	9
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1 <i>Pennisetum purpureum</i> e <i>Pennisetum glaucum</i> : importância econômica, híbridos e caracterização citogenética.....	13
2.2 Alterações genômicas consequentes da hibridação e poliploidia.....	20
2.3 Papel da fosforilação da histona H3 na Serina 10 na manutenção da coesão entre cromátides e sua relação com a eliminação cromossômica.....	26
REFERÊNCIAS .....	33
CAPÍTULO 2 Pareamento cromossômico e comportamento de sequências de DNAr no processo de eliminação cromossômica em híbridos de <i>Pennisetum purpureum</i> Schumach e <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R.Br .....	42
1 INTRODUÇÃO .....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Material Genético .....	47
2.2 Preparações Citogenéticas.....	47
2.3 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente e genômica (FISH e GISH) .....	47
3 RESULTADOS .....	49
4 DISCUSSÃO .....	60
5 CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS .....	68
CAPÍTULO 3 Fosforilação da histona H3 na serina 10 em <i>Pennisetum</i> spp. e sua relação com a eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos .....	72
1 INTRODUÇÃO .....	74
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1 Material genético .....	77
2.2 Análise Mitótica .....	77
2.3 Análise Meiótica.....	78
2.4 Imunodeteccção .....	78
3 RESULTADOS .....	80
4 DISCUSSÃO .....	90
5 CONCLUSÕES .....	96
REFERÊNCIAS .....	97

## CAPÍTULO 1 Introdução geral

### 1 INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schumach) e o milheto *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. são forrageiras de elevada importância econômica devido ao seu alto potencial de produção de forragem de boa qualidade associada à palatabilidade e vigor (SOUZA SOBRINHO et al., 2005). A proximidade genética existente entre estas espécies permite aos melhoristas explorar o potencial do germoplasma de ambas em combinações híbridas. O híbrido interespecífico entre o capim-elefante e o milheto reúne as características de forragem do capim-elefante com a qualidade de forragem, resistência à seca e doenças, tolerância a baixos níveis de fertilidade do solo, produção de sementes não deiscentes e de maior tamanho do milheto. Tais características fazem com que a obtenção destes híbridos se torne uma estratégia eficaz na busca por cultivares superiores, visto que a qualidade da forragem do híbrido é superior à dos parentais, além de ter melhor aceitação pelos bovinos (PEREIRA et al., 2000).

O capim-elefante é uma espécie aloploide com genomas A'A'BB e  $2n=4x=28$  cromossomos. Já o milheto é uma espécie diploide, com genomas AA e  $2n=2x=14$  cromossomos. O híbrido resultante do cruzamento entre estas espécies é um triploide ( $2n=3x=21$  cromossomos, genomas AA'B) que apresenta alta produção de forragem. Devido a sua condição triploide, entretanto, o híbrido apresenta infertilidade, limitando seu emprego no melhoramento genético do capim-elefante em função da impossibilidade de ser utilizado em cruzamento e da dificuldade de implementação de pastagens devido à ausência de sementes.

Uma solução para este problema é a restauração da fertilidade por meio de duplicação do conjunto cromossômico, obtendo-se, assim, plantas hexaploides (AAA'A'BB com  $2n=6x=42$  cromossomos), que apresentem meiose regular e, conseqüentemente, produção de gametas e sementes viáveis. O híbrido triploide apresenta células somáticas com número constante de cromossomos, meiose irregular e menor quantidade de DNA em relação ao esperado (BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, 2006). O híbrido poliploidizado, no entanto, é mixoploide, com número cromossômico variando de 14 a 42, alterações cromossômicas mitóticas e meióticas, baixa viabilidade de pólen, eliminação de cromossomos e quantidade de DNA abaixo do esperado (ANDRADE-VIEIRA, 2010; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009).

De acordo com Andrade-Vieira (2010), a eliminação cromossômica nos híbridos hexaploides entre capim-elefante e milheto é casual, não havendo prevalência quanto ao genoma parental que é eliminado. A variação no comportamento dos híbridos perante a eliminação cromossômica permitiu a distinção destes em dois grupos: um com tendência a manter maior número de cromossomos nas células, sendo 38 o número mais frequente (mais próximo do esperado, 42 cromossomos) e o segundo com maior perda de cromossomos, tendo a maioria das células apresentando 28 cromossomos. A distinção dos grupos quanto à eliminação se manteve ao se comparar a dinâmica de eliminação dos cromossomos do capim-elefante, sendo que o primeiro grupo apresentou moda de 2 e o segundo, moda de 10 cromossomos eliminados, sugerindo que as diferenças no número resultante de cromossomos nos híbridos podem se dever também à variação na dinâmica de eliminação do genoma do capim-elefante.

Alto grau de mixoploidia também foi constatado por Leão et al. (2011) em raças cromossômicas tetraploides (AAA'B) e pentaploides (AA'A'BB),

resultantes do retrocruzamento do híbrido hexaploide com seus parentais capim-elefante (A'A'BB) e milho (AA), com maior variação no número cromossômico entre os pentaploides.

Em células somáticas, a eliminação cromossômica nos híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho está relacionada à hibridação seguida da indução de poliploidização (CAMPOS et al., 2009; LEÃO, 2009). Em híbridos poliploidizados surgem conflitos entre os genomas parentais no núcleo da célula híbrida que podem ocasionar a eliminação de cromossomos (GERNAND et al., 2005; SALENTIJN et al., 2009). Durante a meiose segregação anormal de cromossomos é considerada uma das causas de eliminação cromossômica (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000) estando relacionada ao pareamento irregular dos cromossomos na meiose, como ocorre nos híbridos poliploidizados de capim-elefante e milho (PAIVA et al., 2012).

A eliminação cromossômica também pode estar relacionada à coesão entre cromátides irmãs durante a metáfase. A fosforilação na serina 10 da histona H3 (H3S10f) é uma modificação pós-traducional com importante atuação na manutenção da coesão e posterior segregação de cromátides (CERUTTI; CASAS-MOLLANO, 2009; KASZÁS; CANDE, 2000). Falhas no processo de fosforilação podem levar a uma menor associação de coesinas na região pericentromérica, resultando em baixa atividade centromérica (ECKER; GRAVDAHL; MEGEE, 2007), o que pode afetar processos importantes da divisão celular durante o período pós-metáfase, levando à segregação anormal de cromossomos, tendo como consequência a eliminação cromossômica (HANS; DIMITROV, 2001).

A mixoploidia é um fenômeno que dificulta a obtenção de híbridos interespecíficos estáveis e, conseqüentemente, diminui sua viabilidade de uso no melhoramento genético do capim-elefante. Entretanto, raças cromossômicas

tetraploides e pentaploides avaliadas por Leão (2009) apresentaram bom desempenho agrônômico, indicando que estes genótipos têm potencial de uso no melhoramento. O entendimento do processo de eliminação cromossômica nos híbridos poliploidizados de capim-elefante e milho poderá ajudar na caracterização de mixoploides, o que viabiliza a seleção de genótipos com baixa frequência de mixoploidia, levando a uma estabilidade genômica das populações que estão em processo de melhoramento, visando obtenção de cultivares superiores.

Desta forma, o objetivo com o presente trabalho foi:

- a) estudar o pareamento meiótico em híbridos hexaploides parciais e o comportamento dos sítios de DNAr 45S e 5S durante a eliminação cromossômica por meio da análise em alterações meióticas utilizando hibridização *in situ* fluorescente e genômica.
- b) estudar a fosforilação da histona H3 na serina 10 no ciclo celular e meiose em genótipos de *Pennisetum* spp. e verificar a sua relação com a eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos poliploidizados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Pennisetum purpureum* e *Pennisetum glaucum*: importância econômica, híbridos e caracterização citogenética

As gramíneas estão entre as principais fontes de alimentação humana, bem como para alimentação animal. Dentro deste grupo encontra-se o gênero *Pennisetum* pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, que é considerado um dos mais importantes e representativos desta família. Distribuído por toda a faixa tropical do planeta, o gênero possui 140 espécies, que se caracterizam pela alta complexidade, ampla variabilidade genética e heterogeneidade, devido aos inúmeros arranjos taxonômicos observados entre as espécies (JAUHAR; HANNA, 1998; SCHMELZER, 1997; XAVIER et al., 1995).

As diferentes espécies de *Pennisetum* são reunidas em cinco seções taxonômicas, distinguidas por suas características morfológicas: *Penicillaria*, *Brevivalvula*, *Gymnothrix*, *Heterostachya* e *Eu-Pennisetum*, conforme classificação feita por Stapf e Hubbard (1934), revisados por Martel et al. (2004). As espécies pertencentes ao gênero *Pennisetum* constituem um grupo heterogêneo, apresentando diferentes números básicos de cromossomos ( $x = 5, 7, 8$  e  $9$ ) e níveis de ploidia que variam de diploide a octaploide (MARTEL et al., 1997).

Algumas espécies do gênero *Pennisetum* possuem importância agrônômica pela sua utilização como forrageiras. Destas, as mais relevantes são *P. glaucum* (milheto) ((L.) R. Br.) e *P. purpureum* Schumach (capim-elefante) (SCHMELZER, 1997). O germoplasma de *Pennisetum* encontra-se dividido em três conjuntos gênicos, baseado na facilidade de introgreir o germoplasma selvagem em espécies cultivadas. As relações genéticas existentes ente o milheto

domesticado (*P. glaucum*) e seus parentes selvagens (*P. glaucum* ssp. forma *P. mollissimum* e *P. violaceum*) colocam estas espécies como componentes do conjunto gênico primário; o conjunto gênico secundário é composto pela espécie *P. purpureum*, que juntamente com o conjunto gênico primário, formam um clado monofilético correspondendo a seção morfológica de *Penicilaria*, com número cromossômico básico igual a 7 e diferentes tamanhos cromossômicos (MARTEL et al., 2004). A junção destes dois conjuntos em uma seção morfológica diferenciada reflete uma repadronização cromossômica durante a evolução dentro do gênero, ocorrendo perda ou ganho cromossômico, devido a irregularidades meióticas ou modificações na composição de pares de bases, levando às modificações no tamanho dos cromossomos (MARTEL et al., 1997). As outras espécies do gênero, sendo todas silvestres, constituem o conjunto gênico terciário (MARTEL et al., 1997).

*P. glaucum* (milheto) possui alto valor nutricional, considerado superior ao do trigo, do arroz e do milho em relação ao conteúdo mineral, além de apresentar 16% de proteína. Considerada um dos principais cereais, pois serve de base da alimentação de diversas populações da África e da Índia, esta espécie é importante agronomicamente, pois também é cultivada para a produção de ração animal, por meio da utilização de seus grãos e produção de forragem pelo uso de suas folhas e colmos (PANTULU; RAO, 1982).

O milheto é uma espécie diploide, alógama e anual, com número cromossômico definido como  $2n = 2x = 14$  cromossomos e genoma AA (MARTEL; RICHROCH; SAAR, 1996). Seus cromossomos são metacêntricos e submetacêntricos; o cromossomo maior é 1,5 (JAUHAR, 1981) a 1,6 (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003) vezes mais extenso que o cromossomo menor, o que permite classificar seu cariótipo como simétrico, de acordo com Stebbins (1958). Estudos meióticos conduzidos por Techio, Davide e Pereira (2006), envolvendo o milheto mostraram a formação de sete

bivalentes, com rápida terminalização de quiasmas e baixa taxa de anormalidades (0.4%) durante a diacinese e metáfase I. Os bivalentes formados apresentaram orientação regular na metáfase I, disjunção na anáfase I e fertilidade do pólen acima de 92% (SUJATA et al., 1989; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). Segundo Jauhar (1981), algumas populações de milheto podem apresentar formação de quadrivalentes durante a diacinese e metáfase I. A associação ocorre entre bivalentes muito similares, embora seus relacionamentos genéticos e filogenéticos não tenham ainda sido determinados.

*P. purpureum*, conhecida popularmente como capim-elefante, é uma gramínea tropical perene, alógama, cujas características morfológicas apresentam ampla variabilidade. Sendo uma das espécies mais conhecidas e de maior importância econômica do gênero *Pennisetum*, é amplamente difundida no Brasil e utilizada como forrageira por possuir características favoráveis como, boa qualidade, palatabilidade, vigor e persistência. É cultivado em condições ambientais divergentes e a maioria das cultivares produz sementes minúsculas, deiscentes e de baixo vigor, o que limita a expansão da área cultivada devido à necessidade de propagação vegetativa (PEREIRA et al., 2001).

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide ( $2n = 4x = 28$ ), com genomas A'A'BB e comportamento diploide normal (JAUHAR, 1981; JAUHAR; HANNA, 1998; KRISHNASWAMY; RAMAN, 1954). Diversos estudos sugerem que os cromossomos do genoma A' são homólogos/homeólogos aos do genoma A do milheto (JAUHAR, 1968, 1981; PANTULU, 1967; SREE RANGASAMY, 1972; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005, 2006). A definição da espécie doadora do genoma B, bem como a origem alotetraploide ou diploide de *P. purpureum* poderiam ser testadas pelo emprego de técnicas de hibridização *in situ* genômica (GISH), a partir da

hibridização utilizando sondas genômicas de outras espécies pertencentes ao gênero (MARTEL et al., 1997).

O cariótipo do capim-elefante é constituído de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um acrocêntrico (JAUHAR, 1981), sendo, portanto, incluído na categoria 2b da classificação de assimetria proposta por Stebbins (1958). Estudos realizados por Barbosa, Davide e Pereira (2003) corroboram os anteriores e relatam que a diferença de comprimento relativo entre o maior e o menor par de cromossomos, em alguns genótipos, é praticamente o dobro, podendo-se classificar tais cariótipos como assimétricos. Embora seja uma espécie tetraploide, o capim-elefante apresenta meiose caracterizada pela formação de 14 bivalentes durante a diacinese e metáfase I, ou seja, apresenta comportamento diploide normal, em termos de segregação cromossômica, possivelmente devido à presença de mecanismos supressores do pareamento homeólogo, semelhante ao identificado no trigo hexaploides (TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006). Nesta espécie, este mecanismo ocorre pela ação do gene Ph1, supressor do pareamento homeólogo. Há indícios de que existam outros genes supressores e promotores do pareamento homólogo e homeólogo em diversos cromossomos do trigo e também em outras espécies, como o centeio, *Triticum turgidum* e *T. timopheevii* (SEARS, 1976). Este sistema de diploidização é que garante a estabilidade genética e fertilidade no trigo, assim como no capim-elefante.

Techio, Davide e Pereira (2006) estudaram a meiose no capim-elefante e observaram que, apesar de se comportar como um típico diploide, anormalidades como a presença de cromossomos pegajosos, núcleos assíncrônicos e a formação de micronúcleos na meiose I estavam presentes, sendo mais evidentes em um acesso, que é proveniente de cultura de tecidos e, portanto, mais suscetível a alterações citogenéticas devido aos meios de cultura artificiais e reguladores de

crescimento. O número de cromossomos atrasados variou de 1 a 4 na telófase I, com fertilidade do pólen atingindo aproximadamente 78%.

A especiação por meio de hibridação interespecífica é um mecanismo importante na evolução das plantas, sobretudo das angiospermas (HEGARTY; HISCOCK, 2005). Em se tratando do gênero *Pennisetum*, de acordo com Hanna e Dujardin (1986), o fluxo gênico entre *P. purpureum* e *P. glaucum* pode ocorrer naturalmente. Ao cruzar o capim-elefante ( $2n = 4x = 28$ ) com o milheto ( $2n = 2x = 14$ ), obtém-se híbridos interespecíficos triploides ( $3x$ ) que são denominados PMN (do inglês pearl millet e napiergrass). Estes híbridos superam seus genitores em produção e qualidade forrageira, revelando ser uma alternativa para a obtenção de cultivares superiores contribuindo para ampliar a produção e a rentabilidade da pecuária leiteira. Segundo Pereira et al. (2000), híbridos triploides têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira, já tendo sido selecionados materiais com 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim-elefante. A obtenção dos triploides pode ser por polinização manual e a propagação pode se dar vegetativamente ou por meio de sementes híbridas comerciais. Entretanto, a maior limitação em relação à utilização do híbrido triploide é a infertilidade, a qual constitui uma barreira para o programa de melhoramento genético.

Os híbridos interespecíficos possuem  $2n = 3x = 21$  cromossomos, e genomas AA'B, dos quais 7 cromossomos são oriundos do diploide ( $2x$ ) *P. glaucum* e 14 do tetraploide ( $4x$ ) *P. purpureum*. Em função do maior tamanho dos cinco primeiros cromossomos, o conjunto cromossômico de *P. glaucum* pode ser distinguido dos cromossomos de *P. purpureum* (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003). Barbosa, Davide e Pereira (2003), estudando a mitose de híbridos triploides interespecíficos em células somáticas, observaram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, de forma que a análise do cariótipo dos híbridos permitiu caracterizá-lo como assimétrico e incluí-lo na

categoria 2b de Stebbins (1958). Embora a contribuição do genitor capim-elefante, em termos de quantidade de DNA, determinada com base no comprimento do lote haploide (CTLH), seja similar àquela fornecida pelo milheto (BARBOSA; DAVIDE; PEREIRA, 2003), fenotipicamente os híbridos se assemelham mais ao capim-elefante. Alguns autores sugerem a hipótese de que a ocorrência desta semelhança fenotípica deve-se ao fato de que o genoma B tem um efeito dominante sobre o genoma A em capim-elefante (GONZALEZ; HANNA, 1984; JAUHAR; HANNA, 1998).

Na meiose, os 21 cromossomos dos híbridos triploides entre capim-elefante e milheto, geralmente formam 7 bivalentes e 7 univalentes durante o pareamento. A formação dos 7 bivalentes pode ser atribuída à sinapse entre os cromossomos dos genomas A e A', enquanto que os univalentes pertencem ao genoma B. Entretanto, irregularidades meióticas nestes híbridos foram relatadas na literatura. A formação de pontes, tétrades anormais e aborto de todas as quatro megásporas, foram observados e relatados (HANNA, 1981; JAUHAR, 1981). Techio, Davide e Pereira (2006) relataram a ocorrência de anormalidades desde as fases iniciais até a formação dos produtos meióticos. Entre as anormalidades observadas, encontram-se formação de univalentes e multivalentes, ascensão precoce de cromossomos tanto na primeira divisão quanto na segunda divisão meiótica, segregação irregular, pontes simples e múltiplas, cromossomos pegajosos, núcleo assincrônico, formação de células com tamanhos desiguais, citomixia, fuso anormal, células binucleadas e formação de micronúcleos.

A condição triploide do híbrido é responsável pelas anormalidades e consequente infertilidade, pois resulta na formação de univalentes, os quais levam à segregação irregular, induzindo à perda de material genético e originando gametas aneuploides (JAUHAR, 1981; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2006).

A esterilidade do híbrido impede sua propagação via sementes. Neste sentido, a restauração da sua fertilidade pode ser conseguida por meio da duplicação do complemento cromossômico, que se dá pelo uso da colchicina (BARBOSA et al., 2007; HANNA, 1981; HANNA et al., 1984), e tem como resultado a produção de híbrido hexaploide  $2n = 6x = 42$  cromossomos, genoma AAA'A'BB, e que apresenta megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário normal, condições necessárias para que haja uma meiose normal, e consequente formação de sementes, principal interesse dos programas de melhoramento (HANNA, 1981). Em estudos realizados por Barbosa et al. (2007), híbridos hexaploides obtidos via duplicação do complemento cromossômico de híbridos triploides entre capim-elefante e milheto, por meio de tratamento com colchicina, produziram pólenes viáveis, confirmando a restauração da fertilidade. Os híbridos hexaploides resultantes da duplicação se destacam não apenas pelas qualidades nutritivas superiores às dos parentais (milheto e capim-elefante), mas também pela produção de sementes maiores, não deiscentes e pela melhor aceitação pelo gado. Isso faz com que estes híbridos sejam considerados genótipos promissores para o programa de melhoramento de capim-elefante, além da possibilidade de propagar estes híbridos via semente, permitindo a expansão das áreas cultivadas de capim-elefante, trazendo consideráveis contribuições para a pecuária leiteira (CAMPOS et al., 2009).

Assim como no híbrido triploide, o híbrido hexaploide (6x) apresenta uma maior semelhança ao capim-elefante, devido a uma maior contribuição genômica deste e, sobretudo, à dominância do genoma B sobre o genoma A (JAUHAR; HANNA, 1998). Krishnaswamy e Raman (1954) consideram o genoma B dominante, em função de sua manifestação fenotípica ser maior que os genomas A combinados, mesmo em condições onde se altera a proporção do genoma A em relação ao genoma B, de 2:1 para 5:1 – em híbridos com

constituição genômica AAAAA'B, a única dose do genoma B faz com que este se assemelhe mais ao *P. purpureum*, indicando dominância do genoma B sobre as cinco doses do genoma A.

Os híbridos entre *P. purpureum* e *P. glaucum* apresentam grande variabilidade fenotípica, o que permite a seleção de clones superiores, que posteriormente são propagados vegetativamente, uma vez que estes híbridos são estéreis, devido à sua condição triploide. A avaliação e caracterização morfológica das progênies triploides correspondem aos mesmos atributos utilizados para seleção de genótipos tetraploides, os quais se baseiam em características como qualidade, palatabilidade e vigor (HANNA, 1999; PEREIRA et al., 2000).

## **2.2 Alterações genômicas consequentes da hibridação e poliploidia**

A poliploidia é uma característica chave na evolução dos eucariotas. Poliploides existem em diversos grupos, incluindo animais, fungos e invertebrados, mas é especialmente prevalente nas plantas com a maioria, senão todas, as espécies vegetais tendo se originado de pelo menos um evento de poliploidização (ADAMS; WENDEL, 2005; LEVIN, 2002; OTTO; WHITTON, 2000; STEBBINS, 1950). A evolução de muitos grupos vegetais ocorreu por meio de dois mecanismos subsequentes: a hibridação entre espécies, seguida da poliploidização. Além de serem considerados mecanismos de extrema importância na evolução destes grupos vegetais, estes são também uma ferramenta estratégica em muitos programas de melhoramento genético (MAYROSE et al., 2010).

Implicações genéticas (e consequentemente evolutivas) na formação dos poliploides são frequentemente discutidas. Perdas no conteúdo de DNA, rearranjos genéticos, genômicos e cariotípicos, atribuídos a conflitos

intergenômicos que podem ocorrer em função da combinação de dois diferentes genomas parentais dentro de um mesmo núcleo são atribuídos a eventos de hibridização e poliploidia (COMAI, 2000; GERNAND et al., 2005; KASHKUSH; FELDMAN; LEVY, 2002; LEITCH; BENNETT, 2004; RIDDLE; BIRCHLER, 2003; SALENTIJN et al., 2009). A poliploidia leva a mudanças dinâmicas na organização genômica e eventos como a eliminação de sequências genômicas, a eliminação de cromossomos, ocorrência de rearranjos cromossômicos, alterações epigenéticas, silenciamento gênico e a ativação de genes e retroelementos que alteram a expressão de genes adjacentes podem ser citados como alterações/reorganizações que ocorrem após a hibridação (CHEN; NI, 2006; FELDMAN et al., 1997; LIU et al., 1996; LIU; WENDEL, 2003; OZKAN; LEVY; FELDMAN, 2001).

A eliminação não aleatória de sequências por meio de eventos de poliploidização em trigo foi verificada por Feldman et al. (1997). De acordo com os autores, a eliminação ocorre rapidamente, logo após a hibridação. O padrão similar de eliminação de sequências encontrado pelos autores em todas as plantas testadas, desde as espécies selvagens até hexaploides recém-sintetizadas, levou-os à conclusão de que a eliminação, nestes casos, ocorre por meio de um mecanismo preciso, que pode apresentar valor adaptativo. Modificações epigenéticas como a metilação de histonas H3 (BRASZEWSKA-ZALEWSKA; DZIURLIKOWSKA; MALUSZYNSKA, 2012; TAVERNA; COYNE; ALLIS, 2002) mudanças de expressão de genes e alterações cariotípicas podem ser entendidas como um ajuste do genoma frente a uma nova situação (LEVIN, 2002). Em algumas espécies, a eliminação somática total ou parcial de cromossomos de uma das espécies constituintes de um híbrido já foi amplamente estudada. Na família Poaceae, cruzamentos *Hordeum bulbosum* X *H. vulgare* (HO; KASHA, 1975), *Avena sativa* X *Zea mays* (RIERALIZARAZU; RINES; PHILLIPS, 1996), *Triticum aestivum* X *H. vulgare*

(BARCLAY, 1975) apresentaram eliminação parcial ou total de cromossomos de uma das espécies parentais.

A fragmentação cromossômica e consequente formação de micronúcleos, degradação da cromatina, não orientação dos cromossomos na placa metafásica, migração precoce nas metáfases e segregação tardia na anáfase são alterações citológicas diretamente relacionadas ao processo de eliminação cromossômica. A formação de micronúcleos em tétrades, durante a meiose também promove a eliminação cromossômica, como observado por Baptista-Giacomelli, Pagliarini e Almeida (2000), em estudos com *Avena sativa* (aveia). Os autores observaram que cromossomos não orientados na metáfase I e ascensão precoce de cromossomos em anáfase I também constituem indicativos de eliminação cromossômica.

Gernand et al. (2005), observaram eliminação cromossômica uniparental em híbridos de trigo (*Triticum aestivum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*), com perda dos cromossomos de milheto via formação de micronúcleos, acompanhada de heterocromatinização e fragmentação de DNA, em função da assincronia no processo de replicação. De acordo com os autores, a eliminação cromossômica tem início logo após a fertilização: os cromossomos ou fragmentos eliminados não se alinharam corretamente na metáfase, segregando tardiamente na anáfase e formando micronúcleos. Os autores observaram ainda que os cromossomos de milheto ocupavam uma posição periférica do núcleo interfásico dos híbridos, fato este que poderia estar diretamente ligado a eliminação de cromatina também durante a intérfase.

Várias evidências de alterações genômicas nos híbridos de capim-elefante e milheto têm sido constatadas na literatura. Comumente se observam tais alterações, sobretudo em híbridos induzidos à duplicação cromossômica por agentes antimitóticos. Nestes híbridos a eliminação cromossômica é comum e leva a grande variação no número cromossômico. O número de plantas

hexaploides estáveis com  $2n=6x=42$  é pequeno, comparado à frequência de plantas mixoploides com número cromossômico variando de 14 a 42 após a duplicação (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009). Alterações no comportamento meiótico como pareamento irregular na diacinese, presença de micronúcleos em tétrades, pontes em anáfase, cromossomos com migração precoce nas metáfases I e II e cromossomos com segregação tardia nas anáfases I e II, observadas por Paiva et al. (2012) produziram gametas aneuploides, o que refletiu em baixas taxas de viabilidade do pólen tanto em híbridos triploides quanto nos hexaploides analisados.

Estudos relatam indícios de perda de DNA e consequente eliminação de sequências genômicas em híbridos hexaploides de capim-elefante e milho. Martel et al. (1997) relatam as quantidades de DNA como sendo de 4,59 e 4,71pg, respectivamente, para o capim-elefante e o milho. A quantidade de DNA média para os genótipos de capim-elefante avaliados por Campos et al. (2009), por meio de citometria de fluxo, foi de 4,54 pg, enquanto para os genótipos de milho foi de 4,75 pg, de forma que uma quantidade de DNA média para os híbridos triploides de 4,65 pg (valor médio entre os pais), era esperada, mas os resultados apontaram uma quantidade de DNA média para os híbridos triploides de 4,51pg, correspondente a uma redução de 3% em relação ao esperado. Esta variação no conteúdo de DNA nos híbridos pode ser decorrente da eliminação de sequências de DNA e de cromossomos. Estudos realizados por Leão (2009) também reportam à variação no número de cromossomos em diferentes combinações híbridas resultantes do cruzamento entre capim-elefante e milho e mixoploidia em híbridos hexaploides, decorrentes da eliminação de cromossomos.

Bustamante (2009) avaliou o comportamento mitótico e o conteúdo de DNA em meristemas radiculares e folhas jovens nos mesmos hexaploides

avaliados por Paiva et al. (2012), sendo quatro genótipos selecionados de uma população obtida pela Embrapa Gado de Leite a partir de híbridos hexaploides introduzidos, em 1995, da Universidade da Florida, Estados Unidos; um genótipo selecionado da cultivar comercial 'Paraíso' e os demais resultantes de indução de poliploidia de híbridos triploides obtidos, no Brasil, por Barbosa (2004). De acordo com a autora, a mixoploidia se manteve nos híbridos avaliados. Alterações no ciclo celular também foram observadas (cromossomos pegajosos, pontes e cromossomos não orientados na metáfase ou perdidos na anáfase) e variação na quantidade de DNA.

Leão et al. (2011) relatam a ocorrência de mixoploidia em consequência da eliminação cromossômica em combinações pentaploides e tetraploides entre capim-elefante e milheto. Nas combinações genômicas pentaploides (AA'A'BB), resultantes do cruzamento do híbrido hexaploide com o capim-elefante, o número cromossômico variou de 20 a 34. As combinações tetraploides (AAA'B), resultantes do cruzamento do híbrido hexaploide com o milheto, apresentaram variação de 16 a 28 cromossomos. Os autores também observaram perda de DNA que variou de 14,71 a 19% nas combinações tetraploides e de 9,25 a 14,45% nas pentaploides.

Alterações genômicas e eliminação cromossômica decorrentes da hibridação interespecífica entre capim-elefante e milheto foram relatadas por Andrade-Vieira (2010). Ao avaliar a morfometria dos cromossomos dessas espécies, o conteúdo de DNA e as proporções genômicas dos parentais no híbrido, a autora observou que as espécies capim-elefante e milheto apresentam tamanhos cromossômicos sobrepostos enquanto o híbrido apresenta cromossomos com comprimento menor do que o esperado levando a alterações cariotípicas. Adicionalmente, ao comparar o híbrido com os parentais, foi possível identificar perda do conteúdo de DNA e alteração na relação dos genomas parentais no núcleo híbrido. Estes resultados demonstraram a

ocorrência de perdas de sequências genômicas após hibridação interespecífica entre capim-elefante e milho. Por meio da hibridização *in situ* genômica (GISH), a autora observou que a eliminação cromossômica é casual, não havendo prevalência na eliminação de um dos genomas parentais em questão. Plantas com número cromossômico próximo do esperado para o híbrido hexaploide ( $2n=6x=42$ ) foram observadas, demonstrando haver tendência de estabilização com uma menor perda cromossômica.

A eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos pode ser considerada uma ferramenta valiosa na obtenção de variabilidade em programas de melhoramento genético. Quando ocorre a eliminação cromossômica diferencial (parcial), esta pode ser usada na produção de linhas de adição, que podem ser definidas como sendo materiais nos quais se encontram cromossomos ou partes de cromossomos extras. Linhas de substituição também podem ser obtidas via eliminação cromossômica parcial, sendo, neste caso, obtidos materiais nos quais há substituição de cromossomos em espécies diferentes (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000). Além de linhas de adição e substituição, materiais haploides também podem ser obtidos quando ocorre a eliminação completa de um dos genomas parentais no híbrido interespecífico (JAUHAR et al., 2009).

No melhoramento do capim-elefante, ganhos têm sido observados após alguns ciclos de seleção conduzidos em populações de plantas provenientes de duplicação cromossômica induzida (PEREIRA et al., 2000). Entretanto, o uso de citótipos para obtenção de cultivares no programa de melhoramento do capim-elefante ainda depende do conhecimento acerca da eliminação preferencial de cromossomos, bem como o conhecimento acerca da reorganização genômica nestes híbridos, para melhor manipulação e exploração da variabilidade genética disponível.

Existem relatos da utilização da eliminação cromossômica como ferramenta em programas de melhoramento. Linhas de adição são utilizadas para transferência de genes em programas de melhoramento de *Avena* (FORSBERG, 1990). Haploides de trigo (*Triticum aestivum*) ( $2n=6x=42$ ) foram produzidos por meio de eliminação cromossômica após hibridação interespecífica com *Hordeum bulbosum* (BARCLAY, 1975; INAGAKI; TAHIR, 1990) e *Zea mays* (BITSCH; GRÖGER; LELLEY, 1998).

Tiwari et al. (2010), avaliaram anfiploides sintéticos de *Triticum-Aegilops*, e observaram que um dos genótipos apresentou estabilidade cromossômica na quarta geração de seleção, com alta fertilidade de pólen e pareamento regular na meiose. Este anfiploide parcial apresentou potencial para uso no programa de melhoramento do trigo para transferência de genes e desenvolvimento de linhas de introgressão.

### **2.3 Papel da fosforilação da histona H3 na Serina 10 na manutenção da coesão entre cromátides e sua relação com a eliminação cromossômica**

A interação que ocorre entre uma determinada molécula e um anticorpo que a reconhece é considerada uma interação altamente específica. A técnica de localização de produtos específicos por meio do uso de anticorpos marcados é de grande utilidade para a identificação e localização de proteínas e glicoproteínas e recebe o nome de imunolocalização (HAUSE, 2006; HAYAT, 2002). Esta técnica permite o mapeamento preciso de um produto particular em um determinado tecido ou célula e pode ser aplicada a todos os tipos de células (HAUSE, 2006). A base da técnica consiste, resumidamente, de uma imunocoloração na qual, uma vez que o tecido esteja incubado com os anticorpos, este é visualizado graças à presença de marcadores visuais. O sítio de reação do anticorpo é identificado por meio da visualização do marcador,

evidenciada por microscopia de luz, de fluorescência ou eletrônica, dependendo do marcador acoplado ao anticorpo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LACEY, 1989).

Independente do marcador utilizado para a localização das proteínas no tecido ou célula, a avaliação dos resultados obtidos pela técnica de imunolocalização é baseada na porcentagem de células positivamente coradas, bem como na intensidade de coloração. Pode-se dizer que a imunolocalização se apresenta como uma poderosa ferramenta não só de identificação de várias estruturas celulares normais ou patogênicas (por meio dos respectivos antígenos) e seus produtos específicos, como também promove um melhor entendimento das funções atribuídas a estes.

Durante as divisões celulares, as cromátides-irmãs permanecem unidas pelo centrômero até a anáfase, quando então se dissociam, permitindo a divisão equacional e/ou reducional dos cromossomos para as células-filhas. Esta união, chamada de coesão, é determinante para a captura dos microtúbulos na região centromérica, bem como para a biorientação, ou seja, a correta separação das cromátides para os polos opostos da célula, favorecendo a divisão precisa da célula.

A coesão ocorre graças a um complexo proteico denominado coesinas. Trata-se de um complexo formado por subunidades altamente conservadas desde leveduras até vertebrados complexos, cujos constituintes são 2 subunidades da família SMC (SMC1 e SMC3), 2 subunidades não-SMC (SCC 3 e Mcd1/SCC1), além de ATPases cromossomais. Embora o mecanismo pelo qual estas subunidades interajam ainda não seja totalmente conhecido, é sabido que este complexo forma um anel em torno das cromátides-irmãs, gerando uma tensão entre as cromátides, que as mantém unidas desde a fase S da interfase até a metáfase durante a divisão celular (ECKERT; GRAVDAHL; MEGEE, 2007). A perda da coesão da anáfase se dá pela clivagem das subunidades que compõem o

complexo (LEE; ORR-WEAVER, 2001). A coesão das cromátides é essencial para a divisão celular, de forma que o complexo coesinas tem um importante papel na segregação cromossômica e conseqüentemente na manutenção da integridade genômica (ECKERT; GRAVDAHL; MEGEE, 2007).

A associação entre as coesinas é enriquecida na região pericentromérica, embora durante a meiose, a coesão ocorra também ao longo dos braços cromossômicos até a anáfase I, se tornando pericentromérica a partir da prófase II até a anáfase II, quando ocorre a separação de cromátides-irmãs (KASZÁS; CANDE, 2000). Segundo Eckert, Gravdahl e Megee (2007), estudos acerca do papel da associação das coesinas para a segregação fiel dos cromossomos sugerem que o recrutamento de coesinas para a região pericentromérica seja mediado por modificações pós-traducionais de histonas (MPTs). A metilação de resíduos na lisina 9 na histona H3, foi responsável pelo recrutamento para a região centromérica da proteína Swi6, um ortólogo da HP1 (heterochromatin protein 1), encontrada na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, que é essencial para a formação da heterocromatina, por meio da ligação do cromodomínio desta proteína com o resíduo metilado da histona, permitindo a associação de Swi6 com coesinas em levedura.

A fosforilação na serina 10 da histona H3 (H3S10f) é uma modificação pós-traducional que, além de possuir importante atuação na coesão entre cromátides irmãs na metáfase I (KASZÁS; CANDE, 2000) e segregação de cromátides irmãs na segunda divisão da meiose (MANZANERO et al., 2000), atua também na compactação da cromatina (PÉREZ-CADAHÍA; DROBIC; DAVIE, 2009). A distribuição espaço-temporal destas histonas é variável entre as espécies, podendo ocorrer no início da condensação cromossômica ou em cromossomos já condensados, em todo comprimento do cromossomo ou apenas na região pericentromérica (HANS; DIMITROV, 2001).

Segundo Shibata e Murata (2004), há uma alta correlação entre H3S10f e atividade centromérica. De acordo com os autores, a fosforilação da serina 10 ocorre preferencialmente em centrômeros ativos de plantas, como verificado em seu trabalho utilizando imunolocalização com anticorpos anti-H3S10f em *Arabidopsis thaliana*. A fosforilação foi localizada na região pericentromérica em todos os cromossomos observados. O padrão temporal desta localização, observada a partir da prófase até a anáfase, sugere uma relação da fosforilação da histona H3 na serina 10 com a manutenção da coesão entre as cromátides na região pericentromérica dos cromossomos. É interessante observar que a fosforilação não foi observada em centrômeros inativos em *Hordeum vulgare* (cevada) no trabalho realizado por Houben et al. (1999). Visando observar a relação entre H3S10f e a condensação cromossômica em plantas, por meio de imunolocalização indireta, os autores verificaram que fosforilação na região pericentromérica possui um papel importante na estrutura do centrômero/cinetócoro em plantas, garantindo a estabilidade perante as forças geradas no cinetócoro durante a movimentação cromossômica ao longo da divisão celular, por meio da manutenção da coesão entre as cromátides.

Em um estudo envolvendo células mitóticas e meióticas de três linhagens de milho, sendo uma delas portadora do gene mutante *Afd1*, responsável por causar ausência da 1ª divisão meiótica, Kaszás e Cande (2000) observaram um padrão de fosforilação da histona H3 na serina 10 na região pericentromérica dos cromossomos correspondente à manutenção da coesão entre cromátides-irmãs, visto que o início da fosforilação ocorreu na prófase tardia e desapareceu na anáfase durante a mitose. Na meiose, a fosforilação ocorreu em fases iniciais, nas quais os cromossomos já estão compactados. Na linhagem mutante, os autores observaram cromossomos menos condensados na diacinese, resultante da supressão das fases de leptóteno e zigóteno, levando à

formação de univalentes, entretanto, todos os univalentes apresentaram fosforilação na região do centrômero durante a metáfase.

A distribuição espaço-temporal da fosforilação foi observada também por Manzanero et al. (2000). Em seu trabalho, os autores compararam o padrão de fosforilação da histona H3 entre meiócitos de plantas (*Secale cereale*, *Triticum aestivum*) e animal (*Eyprepocnemis plorans*), por meio da imunolocalização indireta com anticorpos contra H3S10f. O início da fosforilação ocorreu durante a primeira divisão meiótica, na transição do leptóteno para o zigóteno em plantas, enquanto em *E. plorans* ocorreu a partir do diplóteno. Em todas as espécies, a fosforilação terminou na citocinese. Os autores sugeriram ainda haver a relação entre a fosforilação da H3 na serina 10 com a manutenção da coesão entre cromátides, embora esta relação não seja muito bem definida devido ao padrão temporal de ambos os eventos de fosforilação e coesão serem diferente.

Paula (2012) avaliou o padrão de fosforilação da H3S10 durante a mitose e a meiose em genótipos diploides e tetraploides de *Brachiaria* spp. A autora não observou diferenças no padrão de fosforilação entre os genótipos diploides e tetraploides, entretanto, foram observadas diferenças na distribuição cromossômica da H3S10f ao comparar a mitose e a meiose. A autora notou ainda que cromossomos inteiros foram fosforilados, durante a meiose I, enquanto na meiose II e na mitose a fosforilação se apresentou restrita a região pericentromérica, sugerindo que a H3S10f está relacionada com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs durante as divisões celulares.

Devido à importância da formação do complexo coesinas para a divisão celular e, conseqüentemente da manutenção da coesão pela fosforilação da histona H3 na serina 10, falhas no processo de fosforilação podem levar a uma menor associação de coesinas na região pericentromérica, resultando em baixa atividade centromérica (ECKERT; GRAVDAHL; MEGEE, 2007). Neste

sentido, processos importantes da divisão celular durante o período pós-metáfase, podem ser afetados, levando à segregação anormal de cromossomos, tendo como consequência a eliminação cromossômica (HANS; DIMITROV, 2001).

Sakai et al. (2007), avaliaram o comportamento cromossômico e padrões de expressão de proteínas relacionadas ao evento de eliminação cromossômica em híbridos entre *Oryzias latipes* e *O. hubbsi* por meio de análises. Foram utilizados anticorpos contra  $\alpha$ -tubulina,  $\gamma$ -tubulina, proteína centromérica interior, Cdc20, Mad2, histona H3 fosforilada e subunidades de coesina (SMC1a, SMC3 e Rad21), citam que os padrões de expressão das proteínas avaliadas se mantiveram semelhante ao dos parentes selvagens, com exceção da histona H3 fosforilada, que se manteve presente em cromossomos atrasados na anáfase, indicando que, nestes híbridos, os estados de condensação da cromatina podem estar relacionados com a eliminação cromossômica, levando a ocorrência de cromossomos ainda condensados ou cromátides unidas na anáfase, uma vez que a fosforilação da histona H3, na maioria das espécies, atinge seu ápice durante a metáfase.

A perda da proteína centromérica CENH3 está diretamente envolvida com a eliminação uniparental dos cromossomos de *Hordeum bulbosum* em híbridos entre *Hordeum vulgare* e *Hordeum bulbosum*, como verificado por Sanei et al. (2011). Os autores observaram sinais positivos de CENH3 em cromátides segregantes e sinal negativo em cromossomos atrasados. Ishii et al. (2010), avaliando híbridos entre milho (*P. glaucum*) X trigo (*Triticum aestivium*) e milho X aveia (*Avena sativa*), verificaram que as coesinas presentes nos cromossomos do milho não se dissociam normalmente durante a divisão celular, dificultando a mobilidade dos cromossomos para os polos devido à tensão exercida pelas coesinas, causando não-disjunção cromossômica,

pontes cromossômicas e cromossomos quebrados, responsáveis pela eliminação cromossômica.

Desta forma, a técnica de imunolocalização mostra-se potencialmente útil na elucidação de como as anormalidades mitóticas e meióticas podem influenciar o processo de eliminação cromossômica.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidy in napiergrass x pearl millet hybrids treated with antimetabolic agents. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. **Trends in Genetics**, London, v. 21, n. 10, p. 539-543, Oct. 2005.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Comportamento genômico em híbridos de capim-elefante e milheto (*Pennisetum sp.* Schum., Poaceae)**. 2010. 119 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 681-684, 2000.
- BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetics of *Pennisetum purpureum* (Schumack) x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35, 2003.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 365-372, 2007.
- BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto**. 2004. 119 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- BARCLAY, I. R. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. **Nature**, Paris, v. 256, n. 1, p. 410-411, 1975.

BITSCH, C.; GRÖGER, S.; LELLEY, T. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat × maize crosses. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 319-323, 1998.

BRASZEWSKA-ZALEWSKA, A.; DZIURLIKOWSKA, A.; MALUSZYNSKA, J. Histone H3 methylation patterns in *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, and *Brassica carinata* species. **Genome**, Ottawa, v. 55, n. 1, p. 68-74, 2012.

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

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

CERUTTI, H.; CASAS-MOLLANO, J. A. Histone H3 phosphorylation. **Epigenetics**, Austin, v. 4, n. 2, p. 71-75, 2009.

CHEN, Z. J.; NI, Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 240-252, 2006.

COMAI, L. Genetic and epigenetic interaction in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 1, p. 387-399, 2000.

ECKERT, C. A.; GRAVDAHL, D. J.; MEGEE, P. C. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubulebased tension. **Genes Development**, Cold Spring Harbor, v. 21, n. 1, p. 278-291, 2007.

FELDMAN, M. et al. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosome. **Genetics**, New York, v. 147, n. 1, p. 1381-1387, 1997.

FORSBERG, R. A. The use of monosomic alien substitution lines in interploidy gene transfer in *Avena* Bulgar. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 27-30, 1990.

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

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

HANNA, W. W.; DUJARDIN, M. Cytogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilzer and its hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 1, p. 499-553, 1986.

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

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

HANNA, W. W. Method of reproduction in napiegrass and in the 3X and 6X allopolyploid hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 1, p. 123-126, 1981.

HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, Basingstoke, v. 20, n. 1, p. 3021-3027, 2001.

HAUSE, B. Immunolocalization. In: THE SAMUEL ROBERTS NOBLE FOUNDATION. **Medicago truncatula handbook**. 2006. Disponível em:  
<<http://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/Immunolocalization>>. Acesso em: 03 jun. 2012.

- HAYAT, M. A. **Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods**: for light and electron microscopy. New York: Kluwer Academic, 2002. 355 p.
- HEGARTY, M. J.; HISCOCK, S. J. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. **New Phytologist**, Cambridge, v. 165, n. 2, p. 411-423, Feb. 2005.
- HO, K. M.; KASHA, K. J. Genetic control of chromosome elimination during haploid formation in barley. **Genetics**, New York, v. 81, n. 1, p. 263-275, 1975.
- Houben, A. et al. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. **The Plant Journal**, Michigan, v. 18, n. 1, p. 675-679, 1999.
- INAGAKI, M.; TAHIR, M. Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and Maize Japan. **Journal of Breeding**, Tokyo, v. 40, n. 1, p. 209-216, 1990.
- ISHII, T. et al. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. **Chromosome Research**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 821-831, 2010.
- JAUHAR, P. P. **Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species**. New York: A. R. Liss, 1981. 289 p.
- JAUHAR, P. P. et al. Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to Fusarium head blight. **Genome**, Ottawa, v. 52, n. 5, p. 467-483, May 2009.
- JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 64, n. 1, p. 1-26, Dec. 1998.
- JAUHAR, P. P. Inter- and intra-genomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, Dordrecht, v. 39, n. 3/4, p. 360-370, 1968.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A. A. Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. **Genetics**, New York, v. 160, n. 1, p. 1651-1659, 2002.

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

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interspecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. x *P. purpureum* Schumach: III. the cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. **Genetica**, Netherlands, v. 27, n. 1, p. 253-272, Dec. 1954.

LACEY, A. J. **Light microscopy in biology: a practical approach**. Oxford: Oxford University, 1989. 329 p.

LEÃO, F. F. **Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-elefante e milheto**. 2009. 112 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LEÃO, F. F. et al. Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 712-719, 2011.

LEE, J. Y.; ORR-WEAVER, T. L. The molecular basis of sister chromatid cohesion. **Annual Reviews Cell Development Biology**, Palo Alto, v. 17, n. 1, p. 753-777, 2001.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, n. 1, p. 651-663, 2004.

LEVIN, D. A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. New York: Oxford University, 2002. 230 p.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 29, n. 1, p. 365-379, 2003.

LIU, S. C. et al. Genomewide high-resolution mapping by recurrent intermating using *Arabidopsis thaliana* as a model. **Genetics**, New York, v. 42, n. 1, p. 247-258, 1996.

MANZANERO, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 308-317, 2000.

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

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar./Apr. 1997.

MARTEL, E.; RICHROCH, A.; SAAR, A. Assessment of genome organization among diploid species ( $2n=2x=14$ ) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent in situ hybridization with DNA probes. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 4, p. 680-687, Aug. 1996.

MAYROSE, I. et al. Probabilistic models of chromosome number evolution and the inference of polyploidy. **Systematic Biology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 132-144, Mar. 2010.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 401-437, 2000.

- OZKAN, H.; LEVY, A. A.; FELDMAN, M. Allopolyploidy-induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group. **Plant Cell**, Berlin, v. 13, n. 1, p. 1735-1747, 2001.
- PAIVA, E. A. A. et al. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia**, Firenze, v. 65, n. 1, p. 114-120, 2012.
- PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p. 532-541, 1967.
- PANTULU, J. V.; RAO, K. Cytogenetics of pearl millet. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 61, n. 1, p. 1-17, 1982.
- PAULA, C. M. P. de. **Padrão de distribuição da histona H3 fosforilada na serina 10 durante a mitose e a meiose em espécies de *Brachiaria***. 2012. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- PEREIRA, A. V. et al. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L. et al. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.
- PEREIRA, A. V. et al. Variação da qualidade de folhas em capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, abr. 2000.
- PÉREZ-CADAHÍA, B.; DROBIC, B.; DAVIE, J. R. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 87, n. 5, p. 695-709, 2009.
- RIDDLE, N. C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics**, London, v. 19, n. 1, p. 597-600, 2003.

RIERA-LIZARAZU, O.; RINES, H. W.; PHILLIPS, R. L. Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 93, n. 1, p. 3-135, 1996.

SAKAI, C. et al. Chromosome elimination in the interspecific hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. hubbsi*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 697-709, 2007.

SALENTIJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 1, p. 10-48, 2009.

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

SCHMELZER, G. H. Review of *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae). **Euphytica**, Dordrecht, v. 97, n. 1, p. 1-20, 1997.

SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. **Annual Review in Genetics**, Palo Alto, v. 10, n. 1, p. 31-51, 1976.

SHIBATA, F.; MURATA, M. Differential localization of the centromerespecific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Cell Science**, London, v. 117, n. 1, p. 2963-2970, 2004.

SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim elefante e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 9, p. 873-880, 2005.

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

STAPF, O.; HUBBARD, C. E. *Pennisetum*. In: PRAIN, D. (Ed.). **Flora of tropical Africa**. Ashford: Reeve & Co, 1934. v. 9, p. 954-1070.

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 23, n. 1, p. 365-387, 1958.

STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. Columbia: Columbia University, 1950. 643 p.

SUJATA, D. M. et al. Meiotic studies in some species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). **Cytologia**, Tokyo, v. 54, n. 6, p. 641-652, 1989.

TAVERNA, S. D.; COYNE, R. S.; ALLIS, C. D. Methylation of histone H3 at Lysine 9 targets programmed DNA elimination in Tetrahymena. **Cell**, Cambridge, v. 110, n. 1, p. 701-711, 2002.

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

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

TIWARI, V. K. et al. Random chromosome elimination in synthetic *Triticum-Aegilops* amphiploids leads to development of a stable partial amphiploid with high grain micro- and macronutrient content and powdery mildew resistance. **Genome**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 1053-1065, 2010.

XAVIER, D. F. et al. **Caracterização morfológica e agronômica de algumas cultivares de capim elefante**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1995. 24 p. (Documentos, 60).

**CAPÍTULO 2 Pareamento cromossômico e comportamento de sequências de DNAr no processo de eliminação cromossômica em híbridos de *Pennisetum purpureum* Schumach e *Pennisetum Glaucum* (L.) R.Br**

**RESUMO**

O capim-elefante (*P. purpureum* Schumach.) e o milheto (*P. glaucum* (L.) R. Br.) são forrageiras de elevada importância econômica. A similaridade genética entre as espécies torna possível a obtenção de híbridos triploides (AA'B), com  $2n = 3x = 21$  cromossomos, com maior produção de forragem e melhor qualidade nutritiva. A condição triploide do híbrido causa esterilidade, e a duplicação cromossômica tem sido empregada como forma de restaurar a fertilidade do híbrido interespecífico. No entanto, plantas mixoploides são observadas com número cromossômico variando de 14 a 42, resultantes da eliminação cromossômica. Sabe-se que há eliminação de cromossomos de ambos os parentais, entretanto, não se sabe ainda se existe eliminação preferencial de cromossomos. É também relatado que os genomas parentais A e A' são homeólogos, mas não se conhece como ocorre a interação entre esses genomas nos híbridos. Desta forma, o objetivo com este estudo foi avaliar o pareamento meiótico dos híbridos poliploides sintéticos de capim-elefante e milheto, bem como o comportamento das sequências de rDNA em meiócitos apresentando cromossomos em provável processo de eliminação. Células germinativas de dois híbridos interespecíficos poliploidizados foram avaliadas por meio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando como sondas as sequências 45S e 5S DNAr, e hibridização *in situ* genômica (GISH), utilizando como sonda o DNA genômico do milheto. O pareamento intergenômico homeólogo foi observado em ambos os genótipos. Pela FISH, apenas a sonda de DNAr 45S mostrou sinal de fluorescência. Observou-se o sinal de sonda nos núcleos das células e em cromossomos adiantados ou atrasados. O sinal da sonda genômica (GISH), contendo o DNA do parental milheto, foi observado tanto em cromossomos do capim-elefante quanto do milheto, indicando homeologia e/ou possíveis rearranjos genômicos envolvendo os cromossomos das duas espécies parentais. Pareamento intergenômico, rearranjos genômicos e a eliminação de sequências de DNAr 45S ocorreram após a hibridização e poliploidização.

Palavras-chave: Homologia genômica. Hibridação interespecífica. Hibridização *in situ*. Eliminação cromossômica. Poliploidia.

**CHAPTER 2 Chromosomal pairing and behavior of DNA<sub>r</sub> sequences in the process of chromosomal elimination in *Pennisetum purpurem* Schumach and *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. hybrids.**

**ABSTRACT**

Elephant grass (*P. purpurem* Schumach.) and millet (*P. glaucum* (L.) R.Br.) are fodder plants of high economic importance. The genetic similarity between the species makes it possible to obtain triploid hybrids (AA'B), with  $2n = 3x = 21$  chromosomes, a larger forage production and better nutritional quality. The triploid condition of the hybrid causes sterility, and chromosomal duplication has been employed as a means to restore the fertility of the interspecific hybrid. However, mixoploid plants are observed with a chromosomal number ranging from 14 to 42, resulted of chromosomal elimination. It is known that there is chromosomal elimination of both parent species, however, we do not yet know if there is preferential elimination of chromosomes. It is also reported that parent genomes A and A' are homologous, but we don't know how the interaction between these genomes occurs in the hybrids. Thus, the objective of this work was to evaluate the meiotic pairing of the elephant grass and millet synthetic polyploidy hybrids, as well as the behavior of the rDNA sequences in meiocytes presenting chromosomes in a probable elimination process. Germ cells of two interspecific polyploidized hybrids were evaluated by means of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using the 45S and 5S rDNA sequences as probes, and genomic *in situ* hybridization (GISH), using the millet genomic DNA as probe. The homologous intergenomic pairing was observed in both genotypes. Using FISH, only the 45S rDNA probe showed signals of fluorescence. We observed the probe's signal in the cells' nucleus' and in the early or late chromosomes. The signal of the genomic probe (GISH), containing the DNA from the millet parent, was observed in elephant grass as well as millet chromosomes, indicating homology and/or possible genomic rearrangements involving chromosomes of both parent species. Intergenomic pairing, genomic rearrangements and the elimination of rDNA 45S sequences occurred after hybridization and polyploidation.

**Keywords:** Genomic homology. Interspecific hybridization. *In situ* hybridization. Chromosomal elimination. Polyploidy.

## 1 INTRODUÇÃO

As espécies *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br (milheto) e *Pennisetum purpureum* Schumach (capim-elefante) são forrageiras de elevada importância agrônômica devido ao seu alto potencial de produção de forragem. A similaridade existente entre estas espécies permite a obtenção de combinações híbridas que são de grande utilidade em programas de melhoramento genético, uma vez que tais combinações permitem à exploração do potencial do germoplasma de ambas as espécies, auxiliando a busca por cultivares superiores.

O capim-elefante é uma espécie alopoliploide com genomas A'A'BB e  $2n=4x=28$  cromossomos, enquanto o milheto é uma espécie diploide, com genomas AA e  $2n=2x=14$  cromossomos. O híbrido resultante é um triploide, com genomas AA'B e  $2n=3x=21$  cromossomos e que apresenta qualidade e produção de forragem superior aos parentais (PEREIRA et al., 2000). Entretanto, a condição triploide do híbrido o torna estéril devido a irregularidades meióticas, limitando seu emprego no melhoramento genético do capim-elefante pela impossibilidade de realização de cruzamentos. O uso destes híbridos pode ser viabilizado por meio da duplicação do complemento cromossômico, obtendo-se plantas hexaploides (AAA'A'BB com  $2n=6x=42$  cromossomos), buscando-se, desta forma, restaurar a fertilidade do híbrido.

Estudos envolvendo o comportamento genômico de híbridos triploides e hexaploides entre capim-elefante e milheto mostraram que o triploide apresenta número cromossômico somático estável, enquanto o híbrido poliploidizado é mixoploide, com números cromossômicos que variam de 14 a 42. Ambos apresentam irregularidades mitóticas e meióticas, além de baixa viabilidade de pólen, e quantidade de DNA abaixo do esperado (BARBOSA et al., 2007; BUSTAMANTE, 2009; CAMPOS et al., 2009; PAIVA et al., 2012; TECHIO; DAVIDE; PEREIRA, 2005; THECHIO et al., 2006a, b).

Estudos anteriores no híbrido triploide mostraram que os genomas A e A' são homeólogos (JAUHAR, 1981; TECHIO et al., 2006a) e a formação de multivalentes decorrentes desta homeologia em híbridos poliploidizados de capim-elefante e milho foi constatada por Paiva et al. (2012). Apesar desta homologia, não se conhece como esses genomas interagem no híbrido poliploidizado. O estudo comparativo do comportamento meiótico dos híbridos, sobretudo as observações do pareamento cromossômico utilizando sondas genômicas, permite averiguar a interação entre os genomas parentais, bem como fornece o entendimento de fenômenos como rearranjos genômicos decorrentes da hibridação seguida de poliploidização.

A combinação de dois genomas parentais dentro de um mesmo núcleo pode, por vezes, incorrer em eliminação de sequências de DNA e de cromossomos e/ou rearranjos genômicos (GERNAND et al., 2005; SALENTIJJN et al., 2009). A identificação de cromossomos e sequências eliminadas é de grande importância uma vez que muitas destas sequências podem estar associadas à características agrônomicas de interesse. No caso dos híbridos poliploidizados de capim-elefante e milho a variação no número cromossômico se deve à eliminação de cromossomos de ambos os parentais, como verificado em metáfases mitóticas por Andrade-Viera (2010). No entanto, não se sabe se existem cromossomos que sempre permanecem na combinação híbrida, o que poderia ser avaliado a partir do acompanhamento do comportamento de cromossomos em processo de eliminação apresentando marcas específicas. Neste contexto, as regiões de DNA ribossomal são de vital importância para a célula, uma vez que sua expressão dá origem a uma das subunidades formadoras do complexo ribossômico, essencial para a síntese proteica e a eliminação destas sequências em híbridos poderia afetar não apenas o seu comportamento agrônomico, mas o desenvolvimento da planta como um todo. Desta forma, a caracterização dos híbridos mixoploides quanto à perda de

sequências e eliminação cromossômica poderá ajudar na identificação de plantas estáveis ou na obtenção de linhas de adição ou de substituição (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000), portadoras de combinações gênicas viáveis para a introdução de características de interesse no melhoramento genético de *Pennisetum* spp. A exploração da variabilidade genética e manipulação do germoplasma disponível podem ser facilitadas pelo conhecimento quanto aos aspectos envolvidos na esterilidade dos híbridos interespecíficos, de forma a contribuir com o aumento da produção e melhor adaptação das espécies às diferentes condições ambientais.

O objetivo com este trabalho foi estudar o pareamento meiótico em híbridos hexaploides parciais (mixoploides) por meio de hibridização *in situ* genômica, bem como o comportamento dos sítios de DNAr 45S e 5S durante a eliminação cromossômica por meio da análise em alterações meióticas utilizando hibridização *in situ* fluorescente.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material Genético**

Para este estudo foram utilizados dois híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto, submetidos à duplicação cromossômica *in vitro*, a cultivar comercial Paraíso e o genótipo PCM0702-30 (oriundo do segundo ciclo de seleção da população de híbridos interespecíficos poliploidizados PCM0701), oriundos do Programa de Melhoramento Genético do Capim-elefante, gerenciado pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

### **2.2 Preparações Citogenéticas**

Botões florais jovens foram coletados, selecionados e as anteras retiradas sob microscópio estereoscópio. As anteras passaram por processo de digestão enzimática com pectinase-celulase (100U: 200U) por 01 h10 m e posteriormente foram fixadas por 24 horas em fixador Carnoy álcool etílico: ácido acético (2:1) a -4 °C. Após este período de fixação, as anteras foram lavadas em fixador Carnoy por 3 vezes de 5 minutos cada. As lâminas foram confeccionadas pelo método de secagem à chama, segundo protocolo descrito por Dong et al. (2000).

### **2.3 Hibridização *in situ* fluorescente e genômica (FISH e GISH)**

A hibridização *in situ* foi realizada em células germinativas em meiose I. Para a realização da hibridização as lâminas foram desnaturadas com 100 µL de formamida 70% em 2X SSC em estufa a 85 °C por 1 min e 20 seg. e em seguida passaram por três lavagens de 5 minutos cada, em concentração crescente de

etanol (70% -100%) para remoção da formamida. A mistura de hibridização foi preparada com 10 µL de formamida 100%, 2 µL de 20X SSC pH=7,0, 2 µL de sonda marcada com digoxigenina, 2 µL de sonda marcada com biotina e 4 µL de dextran sulfato 50%, totalizando 20 µL da mistura, sendo desnaturada a 95 °C por 8 minutos, seguida de 5 minutos no gelo. Após a desnaturação a mistura foi aplicada sobre a preparação cromossômica deixando-se hibridizar por 24 a 37 °C em câmara úmida.

O excesso de sonda foi retirado com lavagens em 2X SSC por 5 minutos, 2X SSC a 42 °C por 10 minutos e 1X TNT por 5 minutos, sob agitação. As sondas utilizadas para a hibridização *in situ* foram marcadas com biotina-16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP por meio de reação de *Nick translation* (sondas de DNAr 45S e 5S para FISH e sondas do parental, milho, para GISH). Para a detecção da digoxigenina (DIG) foi utilizado anticorpo anti-DIG conjugada com rodamina, emitindo fluorescência vermelha, e para a detecção da biotina foi utilizado anticorpo estreptavidina conjugada com Alexafluor 488, emitindo fluorescência verde. Os anticorpos (anti-dig e estreptavidina) foram aplicados sobre a preparação cromossômica após a lavagem da sonda e incubados por 1h a 37 °C em câmara úmida seguindo de 3 lavagens de 5 minutos em 1X TNT e 1 lavagem em 1X PBS a temperatura ambiente e sob agitação, para remoção do excesso de anticorpos. Posteriormente, as lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI (2 µg/mL) e analisadas em Microscópio Fluorescente Olympus BX60 com câmara monocromática refrigerada nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI), 490/525 (Alexafluor 488) e (Rodamina). Para cada genótipo, entre 15 e 25 células, em cada uma das fases meióticas entre diacinese e telófase I foram avaliadas quanto à localização dos sítios de DNAr 45S e 5S e dos genomas parentais.

### 3 RESULTADOS

O sinal da sonda genômica (GISH) contendo o DNA genômico do parental milho foi observado durante o pareamento meiótico nos híbridos hexaploides cultivar Paraíso e PCM0702-30. Em ambos os genótipos foram observados números reduzidos de cromossomos, sendo que na cultivar Paraíso, essa variação foi de 22 a 38 em configurações que variaram entre trivalentes, bivalentes e univalentes. Para o genótipo PCM0702-30 a variação foi de 26 a 38, nas mesmas configurações.

A formação de univalentes esteve presente em 100% das células avaliadas nos dois genótipos. Multivalentes apresentando pareamento intragenômico envolvendo os cromossomos do capim-elefante foram observados em 48% das células do genótipo PCM0702-30, e em 72% das células da cultivar Paraíso. O pareamento intragenômico envolvendo cromossomos do milho foi observado em apenas 5% das células da cv. Paraíso. O pareamento intergenômico nos multivalentes da cultivar Paraíso foi observado em 88% das células avaliadas. No genótipo PCM 0702-30, 92% das células apresentaram multivalentes com pareamento intergenômico (Tabela 1). Os sinais da sonda genômica de milho também foram observados em diversas regiões dos cromossomos do capim-elefante, indicando a ocorrência de homeologia e/ou possíveis rearranjos genômicos envolvendo os cromossomos das duas espécies parentais (Figura 1). Ademais, nenhum meiócito apresentando somente cromossomos de capim-elefante ou apenas cromossomos do milho foi observado.

Tabela 1 Frequência observada (%) de células apresentando pareamento intra- e intergenômico nas diferentes configurações em diacineses dos híbridos hexaploides entre capim-elefante e milho cv. Paraíso e PCM 0702-30

	PCM0702-30	Paraíso
Univalentes	100	100
<b>Pareamento intragenômico</b>		
Bivalentes		
Capim-elefante	100	97
Milheto	76	80
Multivalentes		
Capim-elefante	48	72
Milheto	-	5
<b>Pareamento intergenômico</b>		
Multivalentes	92	88
Bivalentes	4	11

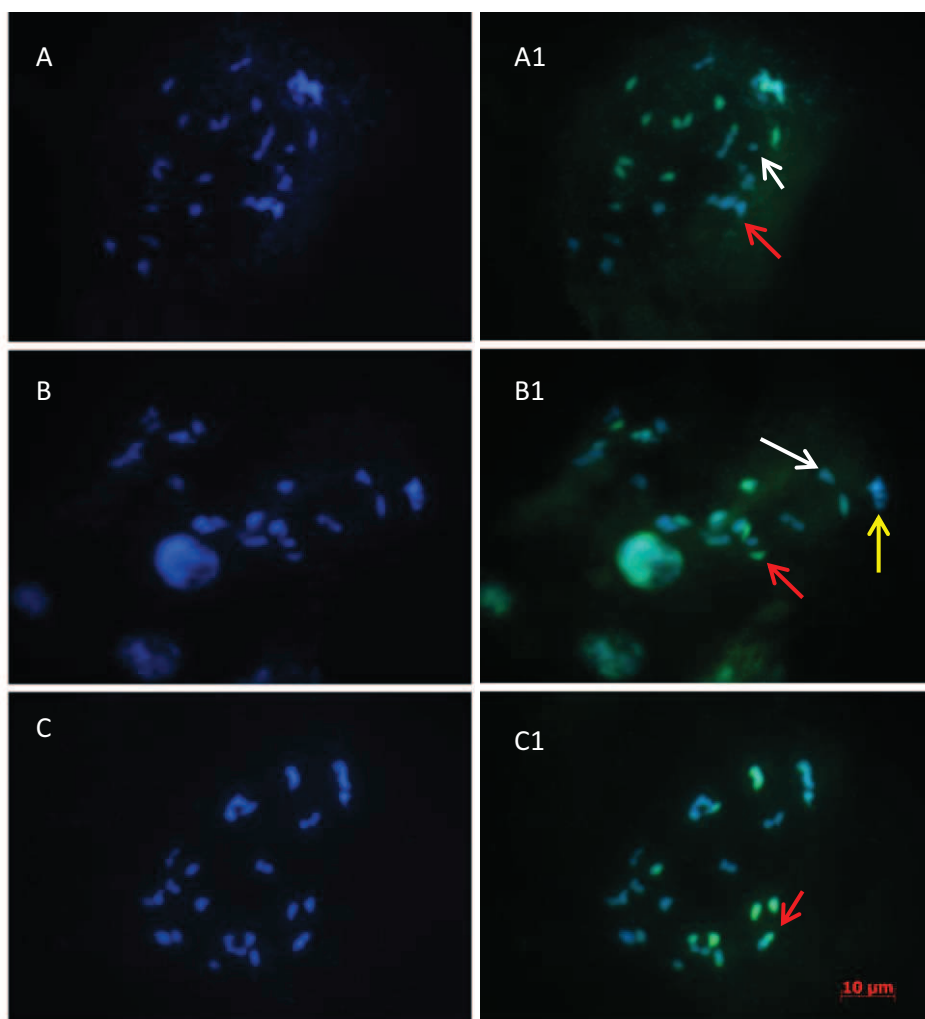


Figura 1 Hibridização *in situ* utilizando sonda genômica de milho em diacinese na cultivar Paraíso

Nota: (A, B e C) Cromossomos visualizados com DAPI (A1, B1 e C1) Cromossomos contendo o sinal da sonda genômica evidenciando os cromossomos de milho. Formação de univalentes e multivalentes em A1 (setas branca e vermelha, respectivamente), pareamento intragenômico e intergenômico e bivalente em B1 (setas amarela, vermelha e branca, respectivamente) e rearranjos cromossômicos em C1 (seta).

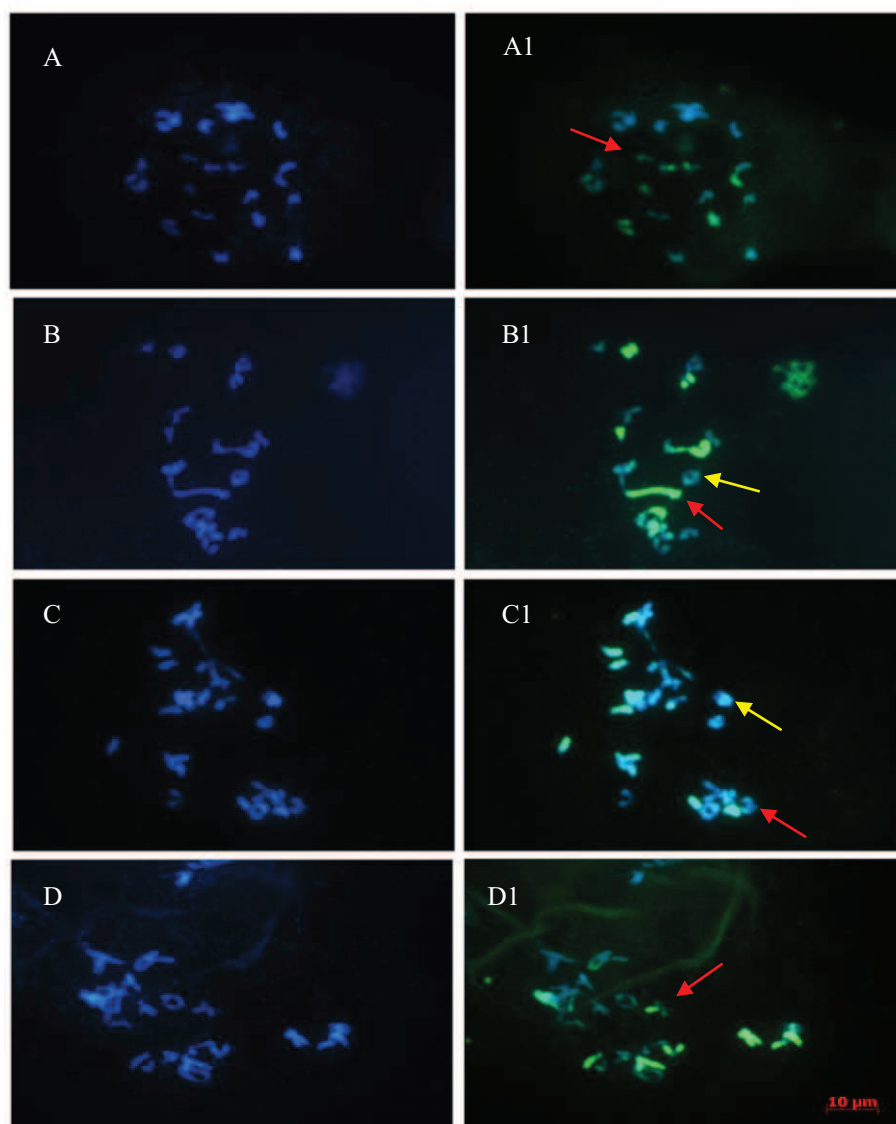


Figura 2 Hibridização *in situ* utilizando sonda genômica de milheto em diacineses no genótipo PCM 0702-30

Nota: (A, B, C e D) Cromossomos visualizados com DAPI (A1, B1, C1 e D1) Cromossomos com sinal da sonda genômica evidenciando os cromossomos de milheto. Formação de univalentes em A1 (seta), bivalente e multivalentes em B1 (setas amarela e vermelha, respectivamente), pareamento intragenômico e intergenômico em C1 (setas amarelas e vermelhas, respectivamente) e rearranjos cromossômicos em D1 (seta).

Nos dois híbridos avaliados também foram observadas irregularidades nas metáfases I com ascensão precoce de cromossomos; anáfases I com cromossomos atrasados, ponte simples e/ou pontes múltiplas e telófases I com cromossomos perdidos e micronúcleos. A porcentagem média de anormalidades mostrou-se alta para ambos os genótipos analisados, sendo 82,3% para o híbrido Paraíso e de aproximadamente 70% para o híbrido PCM 0702-30 (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência (%) de anormalidades observadas durante a meiose nos híbridos hexaploides cultivar Paraíso e PCM 0702-30

	Frequência (%)	
	Paraíso	PCM0702-30
Metáfase I	68,11	94,44
Anáfase I	88,8	72,7
Telófase I	90,9	36,6
Média	82,3	67,91

Quando se utilizou as sondas de DNAr 45S e 5S por meio da FISH, somente as sondas de DNAr 45S foram detectadas nos cromossomos dos híbridos hexaploides parciais testados, nas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I (Figuras 3 e 4). O número de sinais para o genótipo cultivar Paraíso variou entre 4 e 11, com moda de 7 e 8. Para o genótipo PCM0702-30 este número variou entre 2 e 9 marcas, com moda de 4 marcas (Tabela 3). Em avaliações anteriores realizadas por Andrade-Vieira (2010) em células mitóticas de híbridos triploides entre capim-elefante e milho, o número de sinais de DNAr 45S encontrado foi 4, correspondendo aos dois cromossomos com gene de RNAr 45S observados no milho (VIII e IX) e dois de capim-elefante (VI e XII). Em um híbrido poliploidizado com 42 cromossomos, o número esperado de sinais seria, conseqüentemente, 8 marcas. O número mais frequente de sinais

observados na cultivar Paraíso (entre 7 e 8) apresentou-se próximo ao esperado para genótipos hexaploides

Tabela 3 Variação no número de sinais de DNAr 45S nos híbridos hexaploides cultivar Paraíso e PCM0702-30

Células com sítios 45S em cromossomos		
Paraíso	perdidos (%)	No. de sinais (Moda)
Metáfase I	25	4 a 11 (7 e 8)
Anáfase I	16,6	4 a 11 (9)
Telófase I	13,8	5 a 11 (7 e 8)
Total (%)	55	
PCM 0702-30		No. de sinais
Metáfase I	4	4 a 8 (4)
Anáfase I	8	4 a 9 (4)
Telófase I	4	5 a 8 (8)
Total (%)	16	

O sinal da referida sonda foi observado tanto no núcleo das células quanto em cromossomos adiantados ou perdidos. Um maior número de marcas, entretanto, foi observado nos núcleos (Figuras 3 e 4). Na cultivar Paraíso, 55% das células avaliadas apresentaram sinais de 45S em cromossomos atrasados ou perdidos. No genótipo PCM0702-30 este número foi menor, com um total de 16% de células com sítios de 45S sendo eliminados. Não foi possível encontrar as fases subsequentes da meiose II, embora sinais tenham sido observados em uma anáfase II da cultivar Paraíso, totalizando 9 marcas, sem a presença de sinais em cromossomos em processo de eliminação.

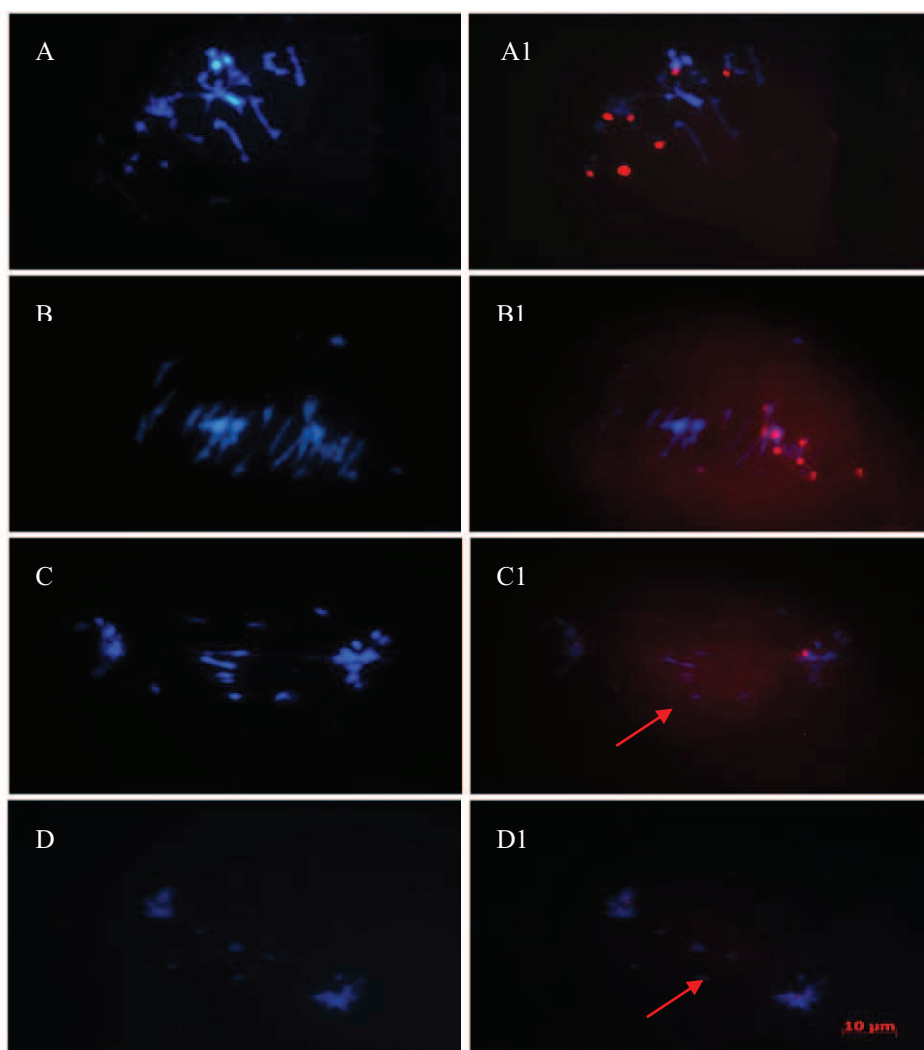


Figura 3 Hibridização *in situ* utilizando sondas de DNAr 45S no híbrido cultivar Paraíso

Nota: Cromossomos adiantados na metáfase I (A), cromossomos contendo sinal da sonda (A1). Metáfase I com cromossomos adiantados (B), cromossomos contendo sinal da sonda (B1) evidenciando a variação no número de sinais. Cromossomos atrasados na anáfase I (C), cromossomos contendo sinal da sonda (C1) Cromossomos perdidos na telófase I (D) cromossomos contendo sinal da sonda (D1). As setas em C1 e D1 indicam cromossomos em processo de eliminação contendo sequências de DNAr 45S.

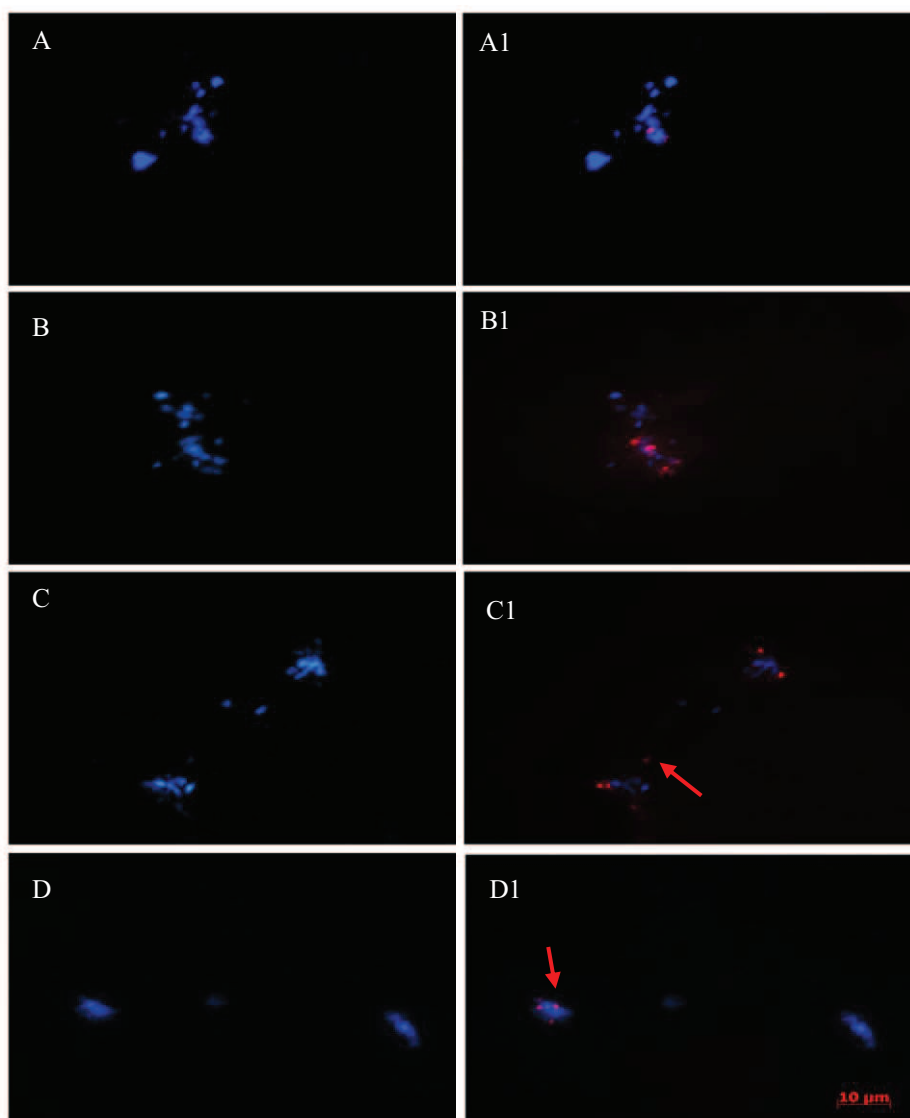


Figura 4 Hibridização *in situ* utilizando sondas de DNAr 45S no híbrido PCM0702-30

Nota: Cromossomos adiantados na metáfase I (A), cromossomos com sinal da sonda (A1); cromossomos adiantados na metáfase I (B), cromossomos com sinal da sonda (B1) evidenciando a variação no número de sinais; Cromossomos atrasados na anáfase I (C), cromossomos com sinal da sonda (C1) evidenciando sequências de DNAr 45S em cromossomos em processo de eliminação (seta); Telófase com micronúcleo (D), cromossomos com sinal da sonda (D1) evidenciando sinais permanecendo no complemento cromossômico (seta).

O sinal da sonda genômica (GISH) contendo o DNA genômico do parental milheto foi observado em ambos os híbridos hexaploides parciais testados durante as fases de metáfase I, anáfase I e telófase I. A presença do sinal da sonda genômica foi observada, tanto no complemento cromossômico quanto em cromossomos adiantados na metáfase e atrasados na anáfase, bem como em cromossomos perdidos na telófase. Em todas as fases observadas, entre os cromossomos adiantados e atrasados, bem como nas pontes observadas em algumas anáfases, estão presentes tanto os cromossomos do capim-elefante quanto os do milheto. Em nenhum dos genótipos avaliados foi observada a eliminação preferencial quanto ao genoma parental. Entre os cromossomos em processo de eliminação, rearranjos genômicos foram observados em cromossomos que apresentavam segmentos de ambos os parentais em 50, 7% das células avaliadas da cultivar Paraíso e 50% das células do genótipo PCM0702-30 (Figuras 5 e 6).

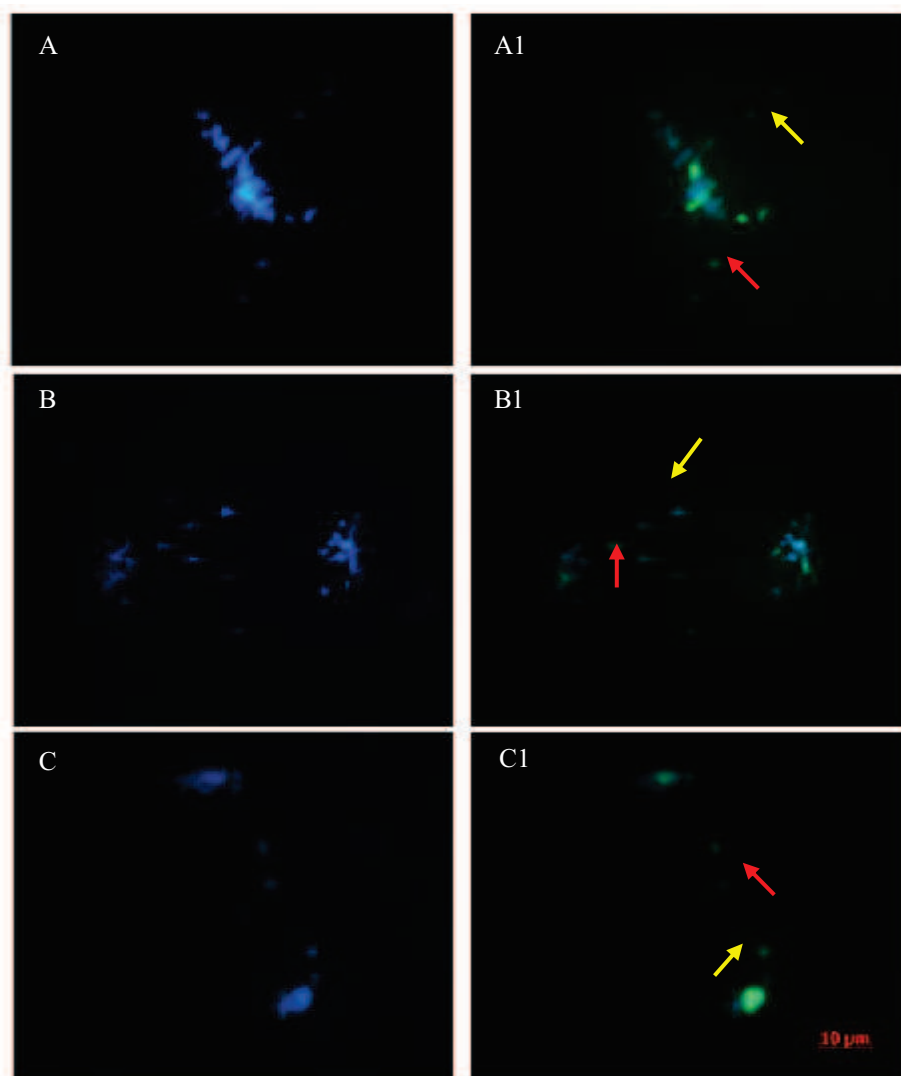


Figura 5 Hibridização *in situ* genômica no híbrido hexaploide cultivar Paraíso: Cromossomos adiantados na metáfase I (A), cromossomos com o sinal da sonda (A1). Cromossomos atrasados na anáfase I (B), sinal da sonda (B1). Cromossomos perdidos na telófase I (C), sinal da sonda (C1). Setas amarelas indicam cromossomos do capim-elefante e setas vermelhas indicam cromossomos do milheto

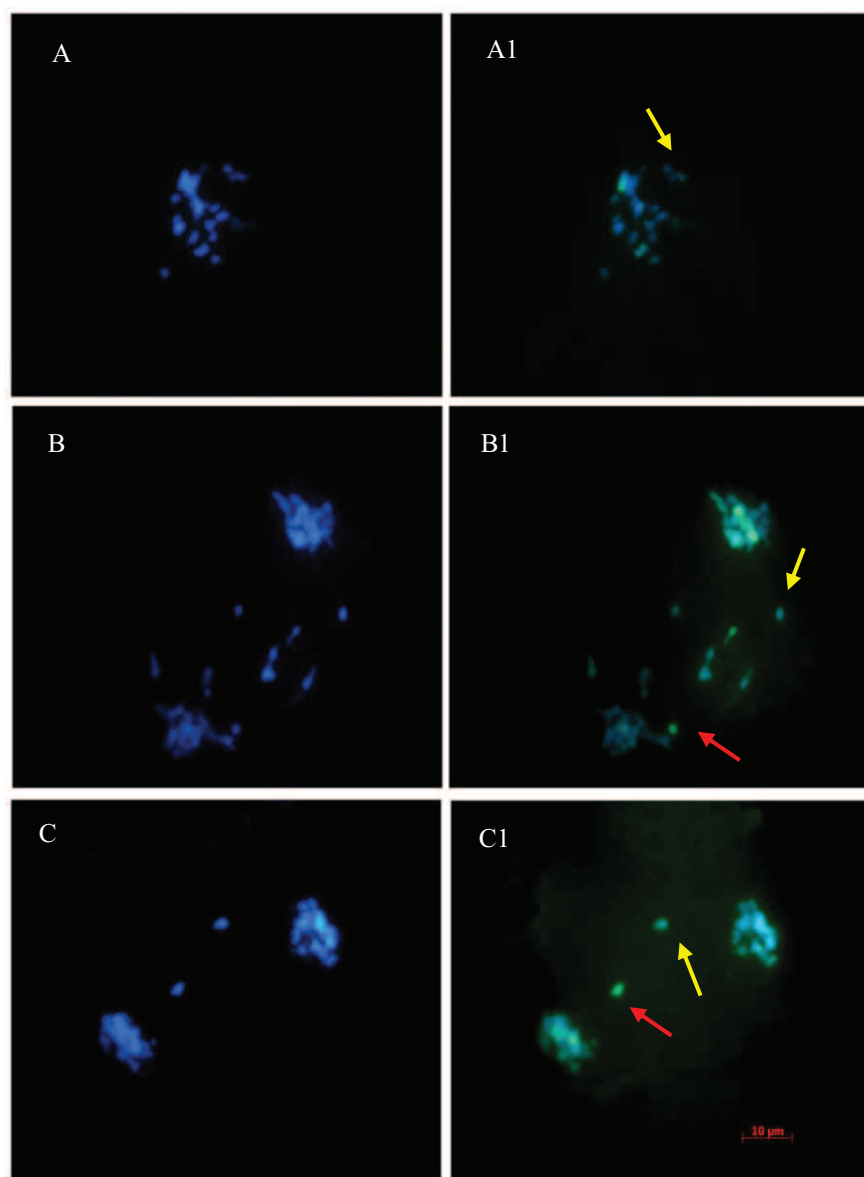


Figura 6 Hibridização *in situ* genômica no híbrido hexaploide PCM0702-30: Cromossomos adiantados na metáfase I (A), sinal da sonda (A1). Cromossomos atrasados na anáfase I (B), sinal da sonda (B1). Cromossomos perdidos na telófase I (C), sinal da sonda (C1). Setas brancas em A1 e B1 indicam cromossomos com rearranjo genômico em processo de eliminação. Setas amarelas indicam cromossomos do capim-elefante e setas vermelhas indicam cromossomos do milheto

#### 4 DISCUSSÃO

O estudo acerca do comportamento meiótico de híbridos entre capim-elefante e milho durante o pareamento é de grande importância tanto para o entendimento do grau de afinidade genética entre ambas as espécies parentais quanto para melhor compreender o processo de eliminação cromossômica que ocorre nestes híbridos. As análises da diacinese nos híbridos hexaploides parciais entre capim-elefante e milho indicaram número reduzido de cromossomos e formação de uni e multivalentes, corroborando com trabalho anterior realizado por Paiva et al. (2012). Esses autores avaliaram híbridos hexaploides nacionais e americanos e constataram as mesmas anormalidades acima citadas durante a diacinese nos dois grupos de híbridos. A alta frequência de univalentes e multivalentes observada no presente trabalho ocorreram devido a um alto grau de repetição de certas regiões em função da presença de dois genomas A e dois A' no híbrido hexaploide, associado a uma possível ausência de genes supressores do pareamento homeólogo (ANDRADE-VIEIRA et al., 2013; PAIVA et al., 2012; TECHIO et al., 2006a).

Na análise do pareamento cromossômico nos híbridos avaliados neste trabalho, formação de bivalentes e multivalentes intergenômicos foi observada em uma frequência superior a 80% em ambos os genótipos. O pareamento cromossômico é um importante indicativo do grau de relacionamento filogenético entre espécies. Isso porque apenas cromossomos que apresentem homologia se pareiam na meiose, de forma que o pareamento meiótico em híbridos indica o grau de relacionamento entre as espécies parentais (DEWEY, 1982 citado por TECHIO, 2002, p. 26).

Uma razão para a ocorrência de homeologia entre os parentais dos híbridos de capim-elefante e milho poliploidizados seria a existência de um ancestral comum entre as duas espécies (MARTEL et al., 1997, 2004). Esta

homeologia resulta na formação de bivalentes nos híbridos triploides a partir do pareamento preferencial envolvendo os cromossomos A do milho e A' do capim-elefante, visto que a diferença estrutural entre estes genomas é menor do que a existente entre estes e o genoma B (TECHIO et al., 2006a). As configurações cromossômicas assumidas durante o pareamento intergenômico nos híbridos interespecíficos possuem total relação com a similaridade estrutural entre os cromossomos das espécies parentais e com o grau de afinidade genômica destas espécies (TECHIO; DAVIDE, 2007). Entretanto, a existência de homeologia e ausência de genes supressores do pareamento podem resultar em pareamento incorreto, levando a formação de univalentes e a ocorrência de multivalentes intragenômicos, como observado nos híbridos avaliados neste trabalho. Em função do pareamento incorreto, estes cromossomos tendem a não segregarem normalmente, podendo gerar perdas cromossômicas (TECHIO; DAVIDE, 2007).

Cromossomos de capim-elefante contendo sequências do genoma do milho foram observados nos dois genótipos avaliados, o que pode ser explicado tanto pela homeologia genômica quanto pela ocorrência de rearranjos genômicos. A ocorrência de rearranjos pode ainda ser causa do pareamento incorreto e formação de multivalentes observados durante a meiose dos híbridos hexaploides, como constatado por Paiva et al. (2012). Embora não tenha sido possível determinar quais sequências ou braços cromossômicos sofreram rearranjos, a ocorrência destes é de grande importância para o melhoramento, pois permite a transferência de genes de interesse agrônomo, devido ao fato de que a expressão de um gene envolvido no processo de rearranjo raramente é alterada quando transferido para um cromossomo não homólogo (CASSOLA; BRAMMER, 2011), contribuindo de forma significativa para o melhoramento.

A hibridização *in situ* nos meiócitos dos híbridos hexaploides, utilizando a sonda de DNAr 45S revelou que o sinal da referida sonda manteve-se em

grande parte no núcleo das células, sendo observados poucos sinais em cromossomos perdidos. As regiões de DNAr 45S estão localizadas em tandem na região organizadora do nucléolo (RON), podendo haver variação quanto ao número de unidades repetitivas (PIKAARD, 2000). Quando se realiza a hibridização *in situ* com sonda de DNAr 45S essa variação no número de unidades repetitivas influenciará a intensidade do sinal observado nos cromossomos que possuem a RON (PIKAARD, 2000). No híbrido hexaploide, seriam esperados 8 cromossomos contendo sinais de 45S, resultantes da duplicação do complemento cromossômico do híbrido triploide. Entretanto, uma variação de 4 a 11 marcas observadas nos híbridos hexaploides avaliados neste trabalho, sugerindo haver perda de sequências de 45S ou múltiplas cópias da mesma ocorrendo em função da reorganização genômica subsequente à poliploidização.

O número de sítios de DNAr 45S mais frequente no genótipo PCM 0702-30 foi 4, semelhante ao encontrado no híbrido triploide avaliado por Andrade-Vieira (2010). Esta variação entre os genótipos pode ser explicada em função dos possíveis rearranjos genômicos que ocorrem após a duplicação cromossômica, que podem levar a alterações quanto à posição dos sítios DNAr e número de cópias desta sequência. A diminuição no número de sítios pode ser explicada também pelas perdas de material genético que podem ocorrer em organismos com altos níveis de ploidia (CHESTER et al., 2010; SOLTIS; SOLTIS, 1995). De acordo com Freeling et al. (2012), a perda de material genético pode ocorrer quando há um efeito de dominância no qual o produto gênico de uma das cópias é majoritário em relação à outra, menos expressa, resultando na inativação e perda da mesma.

A presença de sinais da sonda de 45S em cromossomos possivelmente eliminados, verificada em 16% das células no genótipo PCM0702-30 e em 55% das células na cv. Paraíso sugere que alguns sítios de DNAr 45S tendem a ser

mantidos nas células, e outros são perdidos, possivelmente devido a inativação de algumas RONS. Alguns sítios de DNAr 45S em híbridos entre capim-elefante e milho coincidem com regiões heterocromáticas, como foi observado nos híbridos triploides por Andrade-Vieira (2010), de forma que os cromossomos eliminados nos híbridos hexaploides cultivar Paraíso e PCM0702-30, observados neste estudo, que portavam sinais da sonda, poderiam ainda ser portadores de sequências inativas de DNAr 45S, razão esta pela qual foram observados sinais e cromossomos perdidos durante a meiose I nestes híbridos.

Sítios inativos de DNAr possuem uma maior propensão a polimorfismos intraespecíficos e conseqüentemente, maior propensão à eliminação. Os mecanismos de duplicação e dispersão de unidades repetitivas de DNAr 45S é neutralizado pela dinâmica de inativação e posterior eliminação de sítios de DNAr 45S, o que leva à observação de um pequeno número de sítios na maioria das espécies (ROA; GUERRA, 2012). Essa inativação ocorre em função do efeito de compensação de dosagem, fenômeno que ocorre com frequência em híbridos interespecíficos, principalmente os aloploiploides e possui relação direta com a dominância nucleolar observada nestes híbridos (PIKAARD, 2000; SUMMER, 2003). Alterações epigenéticas, sobretudo as alterações nos padrões de metilação do DNA, atuam diretamente na regulação da expressão gênica, e podem estar assim relacionadas com a inativação das RONS (GUILLÉN et al., 2004). A dominância nucleolar, que ocorre quando genomas de duas ou mais espécies são reunidos no núcleo de uma mesma célula híbrida, leva a um controle na dosagem de genes para RNAr, uma vez que estas sequências são idênticas em espécies intercruzantes, resultando em um aumento expressivo na quantidade de ribossomos. O controle na dosagem destes genes se dá por meio da inativação de algumas RONS (PIKAARD, 2000).

A presença de DNAr no cromossomo IX do híbrido triploide avaliado por Andrade-Vieira et al. (2013) correspondeu a uma região heterocromática,

sugerindo ser este gene transcricionalmente inativo (SUMMER, 2003), o que permite supor que ao menos dois sítios de genes RNAr 45S estão localizados em regiões heterocromáticas e são inativos nos híbridos triploides. Estas mesmas sequências ocorrem no híbrido poliploidizados, e podem, portanto, se tratar de sequências inativas, e podem, portanto ser passíveis de eliminação. Guillén et al. (2004) propõem que alguns genes ribossomais em chimpanzés que se localizam adjacentes a regiões heterocromáticas podem estar sujeitos ao efeito de variação de posição, devido à proximidade da heterocromatina, o que poderia alterar a atividades destas RONS. Em *Crotalaria juncea* pequenos sítios de DNAr mapeados no cromossomo 4 são adjacentes á região de heterocromatina pericentromérica e parecem sofrer o mesmo efeito de posição (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). A eliminação destas sequências podem ainda ter relação com inativação ou mudança de posição das mesmas decorrentes do rearranjo genômico observado nos híbridos avaliados neste trabalho.

A mixoploidia em híbridos de capim-elefante e milho é descrita em diversos trabalhos (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; BUSTAMENTE, 2009; CAMPOS et al., 2009; LEÃO et al., 2011; PAIVA et al., 2012). As anormalidades verificadas durante a meiose I de híbridos entre capim-elefante e milho, sugerem que a eliminação cromossômica em meiócitos destes híbridos pode ocorrer em função destas irregularidades.

O uso da técnica de hibridização *in situ* com a sonda genômica do parental milho, revelou que não há eliminação uniparental e nem mesmo eliminação preferencial quanto ao genoma parental eliminado, sendo eliminados tanto cromossomos do capim-elefante, quanto do milho durante a meiose nos híbridos hexaploides, corroborando estudos anteriores realizados por Andrade-Vieira (2010) em metáfases mitóticas. Além disso, entre os cromossomos em processo de eliminação, segmentos cromossômicos de ambos os parentais em

alguns cromossomos também foram observados, sugerindo a ocorrência de rearranjos genômicos. A reunião dos genomas homeólogos A' e A do capim-elfante e milheto, respectivamente, que se encontram duplicados associados à possibilidade de que as duas espécies podem apresentar ciclos celulares diferentes, não havendo sincronia entre os genomas durante a divisão celular, podem ser responsáveis pelas irregularidades meióticas que levam à eliminação cromossômica (PAIVA et al., 2012).

A eliminação de cromossomos é um fenômeno que ocorre com frequência em híbridos interespecíficos e intergenéricos, dando origem a uma grande variação no número cromossômico nestes híbridos. Esta eliminação pode ser diferencial (parcial), quando há eliminação de alguns cromossomos do completo cromossômico no híbrido, ou total, quando há eliminação completa de um dos genomas parentais e é de grande utilidade em programas de melhoramento genético, tanto para a produção de linhas de adição e substituição (eliminação diferencial), quanto para a obtenção de plantas haploides (eliminação total) (BAPTISTA-GIACOMELLI; PAGLIARINI; ALMEIDA, 2000).

O comportamento cromossômico durante a meiose em híbridos interespecíficos é de grande utilidade para estabelecer a relação filogenética entre diferentes espécies, bem como na definição de suas posições taxonômicas e evolutivas. No melhoramento genético, a análise do pareamento genômico em híbridos interespecíficos permite obter o conhecimento necessário para promover a melhor troca de alelos, auxiliando no planejamento e definição de cruzamentos. A eliminação de cromossomos contendo sequências específicas é um importante indicativo acerca da estabilidade genômica em híbridos poliploidizados. Por esta razão, o entendimento acerca do pareamento cromossômico e das alterações genômicas decorrentes em híbridos de capim-elfante e milheto abre a possibilidade de melhor seleção de genótipos estáveis e

consequentemente uma melhor manipulação das populações e exploração da variabilidade genética, para fins de melhoramento genético e obtenção de cultivares de melhor rendimento, resistência e adaptabilidade.

## **5 CONCLUSÃO**

A eliminação cromossômica em meiócitos de híbridos hexaploides de capim-elefante e milho na meiose é biparental, não havendo prevalência quanto ao genoma eliminado. Pareamento intergenômico, rearranjos genômicos e a eliminação de sequências de DNAr 45S ocorrem após a hibridização e poliploidização.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidy in napiergrass x pearl millet hybrids treated with antimetabolic agents. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Comportamento genômico em híbridos de capim-elefante e milheto (*Pennisetum sp.* Schum., Poaceae)**. 2010. 119 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Biparental chromosome elimination in artificial interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* Schum. and *P. glaucum* (L.) R. Br. **Crop Science**, Madison, v. 3, n. 1, p. 10-55, 2013.
- BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 681-684, 2000.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 365-372, 2007.
- BUSTAMANTE, F. O. **Variações cromossômicas associadas à poliploidização em híbridos de *Pennisetum spp.***: um estudo temporal e tecido específico. 2009. 57 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- CAMPOS, J. M. S. et al. In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Westport, v. 128, n. 1, p. 101-104, Feb. 2009.
- CASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Translocações cromossômicas entre trigo e centeio: uma alternativa ao melhoramento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1307-1314, 2011.

CHESTER, M. et al. Review of application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). **Genes**, Postfach, v. 1, n. 1, p. 166-192, 2010.

DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 101, n. 1, p. 1001-1007, 2000.

FREELING, M. et al. Fractionation mutagenesis and similar consequences of mechanisms removing dispensable or less-expressed DNA in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, Freiburg, v. 15, n. 2, p. 131-139, 2012.

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

GUILLÉN, A. K. Z. et al. Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 225-237, 2004.

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

LEÃO, F. F. et al. Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 712-719, 2011.

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

MARTEL, E. et al. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar./Apr. 1997.

- MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 65-72, 2007.
- PAIVA, E. A. A. et al. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia**, Firenze, v. 65, n. 1, p. 114-120, 2012.
- PEREIRA, A. V. et al. Variação da qualidade de folhas em capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim elefante x milheto (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, abr. 2000.
- PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, London, v. 16, n. 1, p. 495-500, 2000.
- ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 12, n. 225, p. 1-13, 2012.
- SALENTIJJN, E. M. J. et al. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 1, p. 10-48, 2009.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. The dynamic nature of polyploid genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, n. 18, p. 8089-8091, 1995.
- SUMMER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Berlin: Blackwell Publishing, 2003. 287 p.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 7-18, 2007.

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

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

TECHIO, V. H. et al. Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Acta Scientiarum Biology Science**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, 2006b.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

**CAPÍTULO 3 Fosforilação da histona H3 na serina 10 em *Pennisetum* spp.  
e sua relação com a eliminação cromossômica em híbridos  
interespecíficos**

**RESUMO**

A fosforilação da histona H3 na serina 10 (H3S10f) é uma modificação pós-traducional com importante atuação durante o ciclo celular e está associada com a compactação da cromatina, coesão entre cromátides irmãs e segregação de cromátides na mitose e na meiose. Falhas no processo de fosforilação podem levar a uma menor associação de coesinas nesta região, resultando em baixa atividade centromérica, segregação anormal de cromossomos e consequente eliminação cromossômica. Do cruzamento entre o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach, 2n=4x=28) e o milheto (*P. glaucum* (L.) R. Brown. 2n=2x=14) originam-se híbridos com 2n=3x=21 cromossomos, estéreis. A fertilidade destes híbridos pode ser restaurada via duplicação cromossômica obtendo-se plantas hexaploides, entretanto, a mixoploidia oriunda da eliminação de cromossomos é observada devido à eliminação cromossômica. O objetivo com este trabalho é estudar a fosforilação da histona H3 na serina 10 no ciclo celular e meiose em genótipos de *Pennisetum* spp. e verificar a sua relação com a hibridação, ploidia e eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos por meio de imunolocalização. Foram utilizadas pontas de raízes e anteras de milheto, de capim-elefante, de um híbrido triploide e um poliploidizado. As raízes e anteras foram fixadas em paraformaldeído 4%, maceradas em tampão fosfato-salino (PBS) 1X, bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 3% e incubadas com anticorpo primário (Rabbit polyclonal IgG, Sta. Cruz Biotechnology, USA) contra a H3S10f, que posteriormente foi detectado por um anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína – FITC (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Sta. Cruz Biotechnology, USA). A histona H3 fosforilada na serina 10 apresentou-se distribuída na região pericentromérica cromossômica desde a prófase até a telófase durante o ciclo celular, em todos os genótipos avaliados. Na meiose, o sinal de imunodeteção é enriquecido na região pericentromérica e se estende ao longo dos braços cromossômicos no milheto e no hexaploide é limitado à região pericentromérica. Na meiose do híbrido hexaploide foram encontradas irregularidades nas diacineses, metáfases I, anáfases I e telófases I, nas quais foram observados cromossomos sem o sinal da fosforilação. Este padrão de distribuição dos sinais indica uma provável relação da fosforilação da histona H3 com a função de união cromatídica e cromossômica em genótipos de *Pennisetum* sp.

Palavras-chave: Poliploidia. Imunolocalização. União cromatídica.

**CHAPTER 3 Phosphorilation of histone H3 in the serine 10 on *Pennisetum* spp. and its relation to chromosomal elimination in interspecific hybrids**

**ABSTRACT**

The phosphorylation of histone H3 on serine 10 (H3S10f) is a posttranslational modification with an important role during the cell cycle and is associated to chromatin compaction, cohesion between sister chromatids and segregation of chromatids in mitosis and meiosis. Flaws in the phosphorylation process may lead to a smaller association of coesins in this region, resulting in low centromeric activity, abnormal chromosomal segregation and consequent chromosomal elimination. The crossing between elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach,  $2n = 4x = 28$ ) and the millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brown.  $2n = 2x = 14$ ) originated hybrids with  $2n = 3x = 21$  chromosomes, sterile. The fertility of these hybrids may be restored via chromosomal duplication, obtaining hexaploid plants, however, the mixoploidy derived from the elimination of chromosomes is observed due to chromosomal elimination. The objective of this work was to study the phosphorylation of the histone H3 on serine 10 in the cell cycle and meiosis in *Pennisetum* spp. and verify its relation to hybridization, ploidy and chromosomal elimination in interspecific hybrids by means of immunolocating. We used millet, elephant grass root tips and anthers, of a triploid hybrid and a polyploidized hybrid. The roots and anthers were fixated in 4% paraformaldehyde. mashed in phosphate-buffered saline (PBS) 1X, blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) and incubated with primary antibody (Rabbit polyclonal IgG, Sta Cruz Biotechnology, USA) against H3S10f, which was posteriorly detected by a secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate – FITC (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Sta Cruz Biotechnology, USA). The histone H3 phosphorilated on the serine 10 was distributed in the pericentromeric chromosomal region from prophase until telophase during the cell cycle, in all evaluated genotypes. In the meiosis, the immunodetection signal is enriched in the pericentromeric region and extends along the chromosomal arms in the millet and, in the hexaploid, is limited to the pericentromeric region. In the meiosis of the hexaploid hybrid, we found irregularities in the diakineses, metaphases I, anaphases I and telophases I, in which we observed chromosomes in the phosphorylation signal. This signal distribution pattern indicates a probable relation of histone H3 phosphorilation with the function of chromatid and chromosomal union in *Pennisetum* sp. genotypes.

Keywords: Polyploidy. Immunolocating. Chromatid union.

## 1 INTRODUÇÃO

A histona H3, proteína associada ao DNA nuclear que compõe o nucleossomo, pode ser fosforilada em quatro resíduos, sendo eles as serinas 10 e 28 e as treoninas 3 e 11. Entre estes, a fosforilação na serina 10 (H3S10f) é a mais extensivamente estudada (ZHANG et al., 2005). A H3S10f é uma modificação pós-traducional com importante atuação na compactação da cromatina (PÉREZ-CADAHÍA; DROBIC; DAVIE, 2009), coesão entre cromátides irmãs na metáfase I (KASZÁS; CANDE, 2000) e segregação de cromátides irmãs na segunda divisão da meiose (MANZANERO et al., 2000). A distribuição espaço-temporal destas histonas é variável entre as espécies, podendo ocorrer no início da condensação cromossômica ou em cromossomos já condensados, em todo comprimento do cromossomo ou apenas na região pericentromérica (HANS; DIMITROV, 2001).

Durante a divisão celular, as cromátides-irmãs permanecem unidas pelo centrômero devido a uma tensão gerada por um complexo proteico denominado coesinas, o qual forma um anel em torno dessas cromátides, desde a fase S da intérfase até a metáfase. Esta coesão é determinante para a captura dos microtúbulos na região centromérica, garantindo, na anáfase, a correta separação das cromátides para os pólos opostos da célula, permitindo a divisão equacional e/ou reducional dos cromossomos para as células-filhas (ECKERT; GRAVDAHL; MEGEE, 2007).

Vários trabalhos sugerem o envolvimento da H3S10f com a coesão na região pericentromérica dos cromossomos em plantas (HOUBEN et al., 1999, 2007; KASZÁS; CANDE, 2000; SHIBATA; MURATA, 2004). Em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. a fosforilação da serina 10 ocorre preferencialmente na região pericentromérica de cromossomos com centrômeros ativos, indicando também uma correlação com a atividade centromérica (SHIBATA; MURATA,

2004). Portanto, falhas no processo de fosforilação podem levar a uma menor associação de coesinas na região pericentromérica, resultando em baixa atividade centromérica (ECKERT; GRAVDAHL; MEGEE, 2007), podendo levar à segregação anormal de cromossomos, tendo como consequência a eliminação cromossômica (HANS; DIMITROV, 2001).

Em híbridos de milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) X trigo (*Triticum aestivum* L.) e milheto X aveia (*Avena sativa* L.), as coesinas presentes nos cromossomos do milheto não se dissociaram normalmente durante a divisão celular, dificultando a mobilidade dos cromossomos para os polos devido à tensão exercida pelas coesinas, causando não-disjunção cromossômica, pontes e quebras cromossômicas que levaram à eliminação de cromossomos do milheto (ISHII et al., 2010).

A eliminação cromossômica também é comum em híbridos interespecíficos em *Pennisetum spp* após a indução de poliploidia. Do cruzamento entre o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach,  $2n=4x=28$ , A'A'BB) e o milheto (*P. glaucum*  $2n=2x=14$ , AA) originam-se híbridos com  $2n=3x=21$  cromossomos e genomas AA'B, estéreis. Estes híbridos apresentam estabilidade quanto ao número cromossômico somático, porém, a mixoploidia é observada tanto em híbridos cujo complemento cromossômico foi duplicado (ABREU et al., 2006; BARBOSA et al., 2007; CAMPOS et al., 2009), quanto em híbridos resultantes do retrocruzamento com os parentais (LEÃO et al., 2011). A compreensão de como ocorre o processo de eliminação cromossômica nestes híbridos é de fundamental importância para identificação de genótipos estáveis que podem contribuir para a obtenção de cultivares superiores, melhor adaptadas e de alto potencial de forragem.

Neste sentido, o objetivo com este trabalho é estudar a fosforilação da histona H3 na serina 10 no ciclo celular e meiose em genótipos de *Pennisteum*

spp. e verificar a sua relação com a hibridação, poliploidização e eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos e poliploidizados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material genético

O material botânico utilizado foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite, campo experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco-MG. Foram utilizados os genótipos dos parentais capim-elefante – BAG65 (*Pennisetum purpureum* Schumach) e milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) – BN2, do híbrido triploide resultante deste cruzamento (94442), bem como de um híbrido hexaploide parcial oriundo da duplicação cromossômica de híbrido triploide (PCM0702-03).

### 2.2 Análise Mitótica

Raízes provenientes de estacas foram coletadas e fixadas por 45 minutos em solução de paraformaldeído 4% contendo PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) em temperatura ambiente. Após o período de fixação, as raízes passaram por 4 lavagens de 10 minutos cada em PBS 1X, e por digestão enzimática com 45 µl de pectinase-celulase (4/2%) + 5 µl de pectolyase (5%), por 02 h 30 min. O meristema foi macerado sobre uma lâmina contendo uma gota de solução de PBS 1X com Triton X (1%). As lâminas foram confeccionadas pela técnica de sobreposição de lamínulas (FUKUI; NAKAYAMA, 1996), seguidas de aquecimento numa chama de lamparina, sendo o meristema esmagado sob uma lamínula para espalhamento das células, a qual foi retirada após imersão em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), por 4 minutos.

### **2.3 Análise Meiótica**

Botões florais jovens foram coletados, selecionados e as anteras retiradas sob microscópio estereoscópio. As anteras foram fixadas por 45 minutos em solução de paraformaldeído 4% contendo PBS 1X, em temperatura ambiente, lavadas em PBS 1X, 4 vezes, por 10 minutos cada, e digeridas com solução enzimática composta de pectinase-celulase (100U: 200U pH – 7,5) e cytohelicase (1%), por 01 h 10 min. As lâminas foram confeccionadas pela técnica de sobreposição de lamínulas (FUKUI; NAKAYAMA, 1996), na qual as anteras foram maceradas sobre uma lâmina contendo uma gota de solução composta de PBS 1X e Triton X (1%), aquecidas numa chama de lamparina e esmagadas com lamínula para a liberação dos meiócitos e rompimento da calose, a qual foi retirada após imersão em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), por 4 minutos.

### **2.4 Imunodeteção**

Para a detecção da H3S10f nas células mitóticas e meióticas foi utilizado o método descrito por Manzanero et al. (2000), com algumas modificações. Para tanto, as lâminas confeccionadas foram pré-tratadas com bloqueador (PBS, BSA e Triton-X) para evitar marcação inespecífica, durante 20 minutos, em câmara úmida a temperatura ambiente. Logo após, anticorpos primários anti- H3S10f (Rabbit polyclonal IgG, Sta. Cruz Biotechnology, USA) foram aplicados sobre as preparações cromossômicas e incubados por no mínimo 16 horas, a 4 °C, em câmara úmida. Posteriormente, o material foi lavado 3 vezes de 5 minutos cada em PBS 1X, e incubação com anticorpos secundários (Goat anti-rabbit IgG-FITC, Sta. Cruz Biotechnology, USA), a 37 °C, durante 02 h 00 min em câmara úmida. As preparações cromossômicas foram então contra-coradas com 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI) em Vectashield para observação de DNA

cromossomal. O material foi observado e fotografado em microscópio de fluorescência Olympus BX60 com câmara monocromática refrigerada nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 (DAPI) e 490/525 (Fluoresceína) e com câmara Axio Cam HRm (Zeiss). A determinação da localização da H3S10f se deu pela verificação da ocorrência e não ocorrência da imunodeteção. Entre 10 e 30 células de cada genótipo foram avaliadas durante a mitose e a meiose. As imagens foram capturadas pelo programa Axio Vision Rel. 4.8 e otimizadas por meio do software o Adobe Photoshop CS6.

### 3 RESULTADOS

No ciclo celular, em todos os genótipos avaliados, parentais, híbridos triploides e poliploidizados, o padrão de distribuição da fosforilação da histona H3 na serina 10 foi similar, sendo coincidente com a coesão, enriquecida na região pericentromérica, mostrando que tanto a hibridação quanto a poliploidização não alteraram a distribuição desta modificação pós-traducional (Figuras 1 a 4). Nos núcleos interfásicos não foram observados sinais da fosforilação. O início da fosforilação deu-se na prófase, fase esta em que os cromossomos se encontram em início do processo de condensação, prosseguindo na metáfase, quando a fosforilação atinge seu ápice, com sinal mais evidente, presente na região pericentromérica de todos os cromossomos. Na anáfase o sinal da fosforilação ainda se mantém, porém menos intenso, desaparecendo de forma gradual na telófase (Figuras 1 a 4). O número de sinais corresponde ao número de cromossomos encontrados nas células de capim-elefante (Figura 1), de milho (Figura 2) e do poliploidizado (Figura 4 B1), sendo 28, 14 e 42 cromossomos, respectivamente.

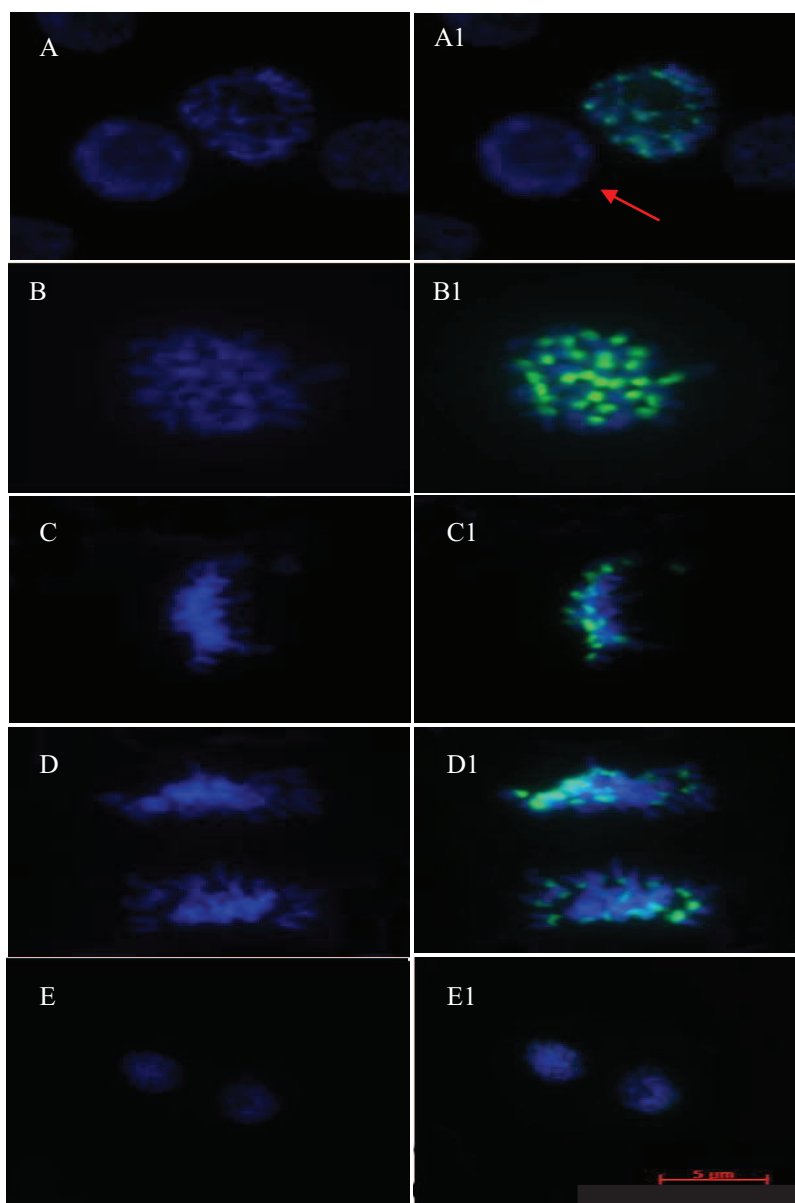


Figura 1 Imunodeteccção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante o ciclo celular no genótipo BAG65 (*Pennisetum purpureum* Schumach): (A) prófase, (B) pró- metáfase, (C) metáfase, (D) anáfase tardia e (E) telófase

Nota: A a E: DAPI. A1 a E1: Cromossomos contendo sinal da H3S10f. Seta vermelha em A1 evidencia núcleo interfásico sem sinal de fosforilação.

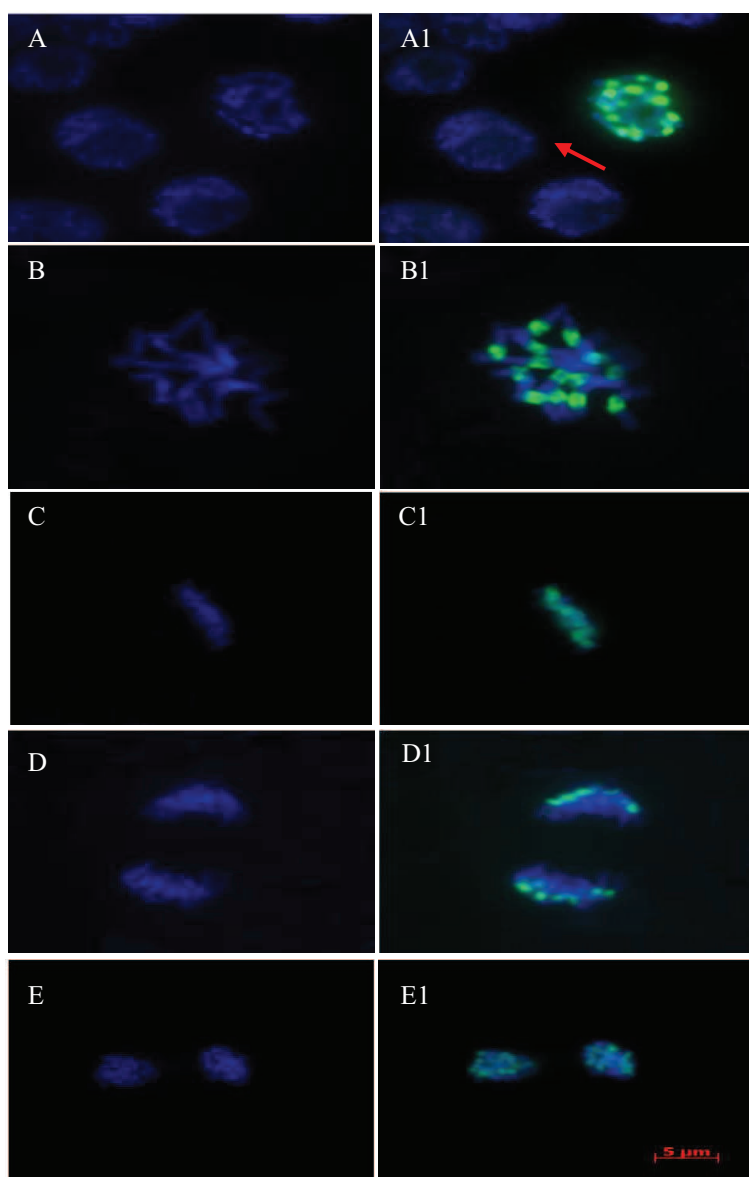


Figura 2 Imunodeteção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante a mitose no genótipo BN2 (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.): (A) prófase, (B) pró-metáfase, (C) metáfase e (D) anáfase, (E) telófase

Nota: A a E: DAPI. A1 a E1: Cromossomos com sinal da H3S10f. Seta vermelha em A1 evidencia núcleo interfásico sem sinal de fosforilação.

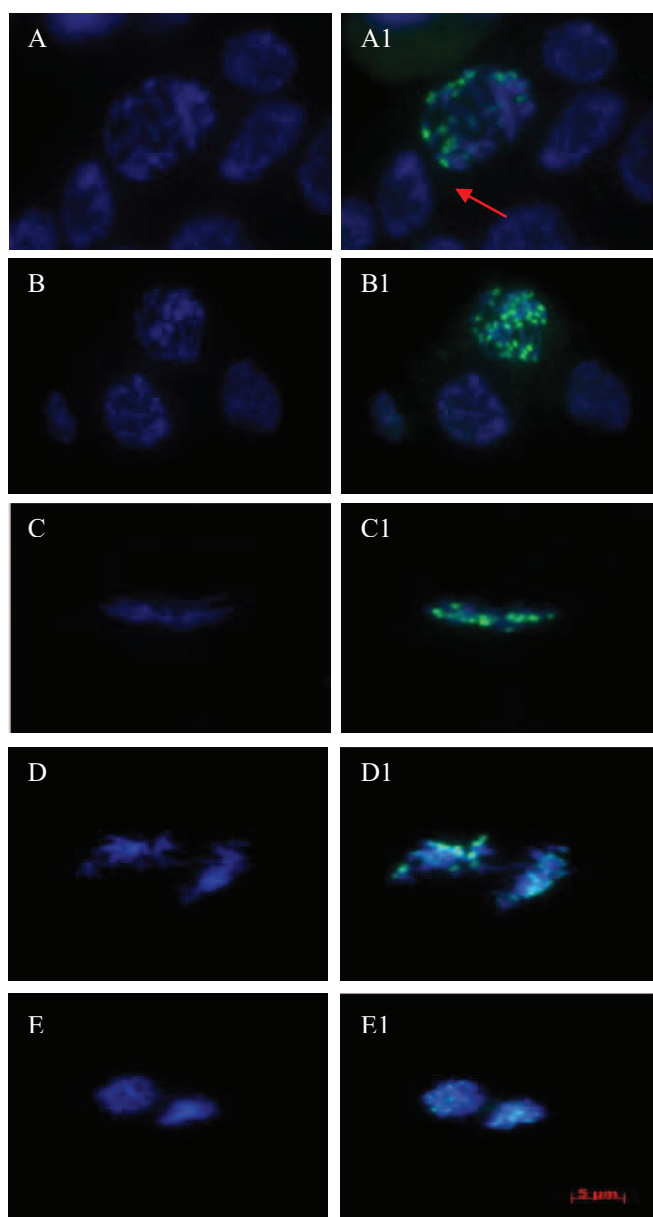


Figura 3 Imunodeteção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante a mitose no híbrido triploide (9444.2) (A) prófase, (B) pró-metáfase, (C) metáfase e (D) anáfase, (E) telófase. A a E: DAPI. A1 a E1: Sinal da H3S10f

Nota: Seta vermelha em A1 evidencia núcleo interfásico sem sinal de fosforilação.

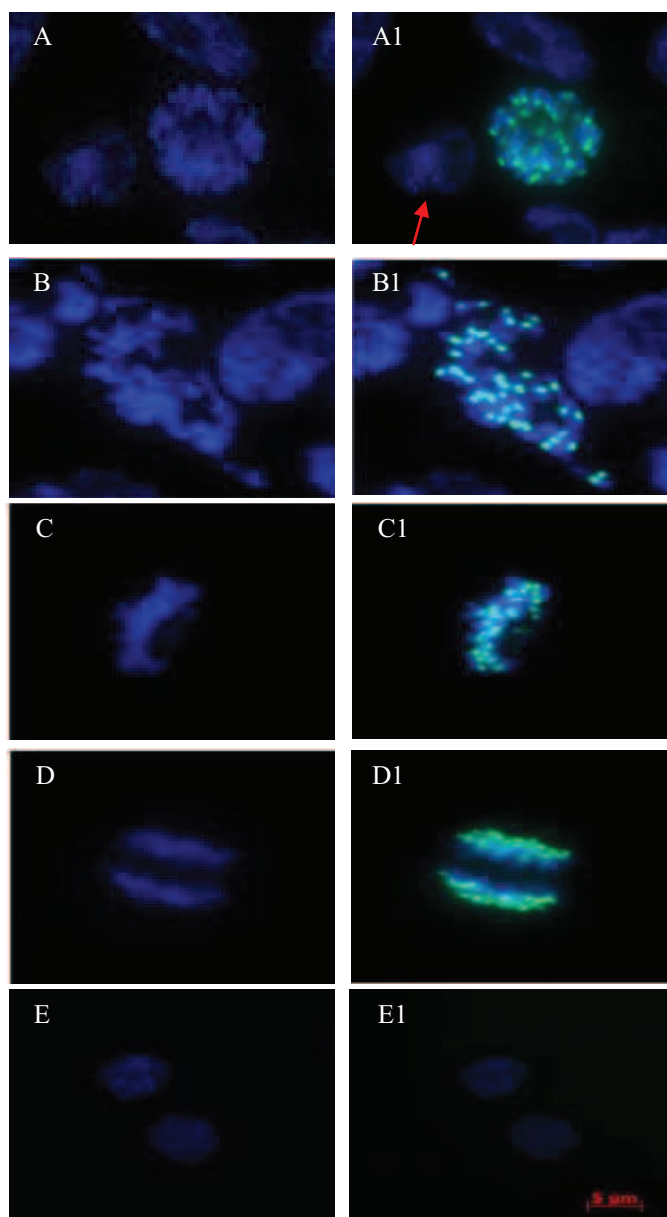


Figura 4 Imunodeteção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante a mitose no híbrido hexaploide PCM 0702-03 (A) prófase, (B) pró-metáfase, (C) metáfase e (D) anáfase, (E) telófase

Nota: A a E: DAPI. A1 a E1: Sinal da H3S10f. Seta vermelha em A1 evidencia núcleo interfásico sem sinal de fosforilação.

As análises na meiose com relação à localização da H3S10f foram realizadas somente para os genótipos BN2 (milheto) e PCM0702-30 (híbrido poliploidizado), tendo sido avaliados somente meiócitos em diacineses, metáfase I e telófase I. No milheto observou-se que, na metáfase I, o sinal de imunodeteção é enriquecido na região pericentromérica e se estende ao longo dos braços, marcando os cromossomos por inteiro (Figura 5). No genótipo poliploidizado, a fosforilação se limitou à região pericentromérica dos cromossomos, marcando fortemente essa região durante a diacinese, mantendo a intensidade do sinal durante a metáfase I (Figura 6).

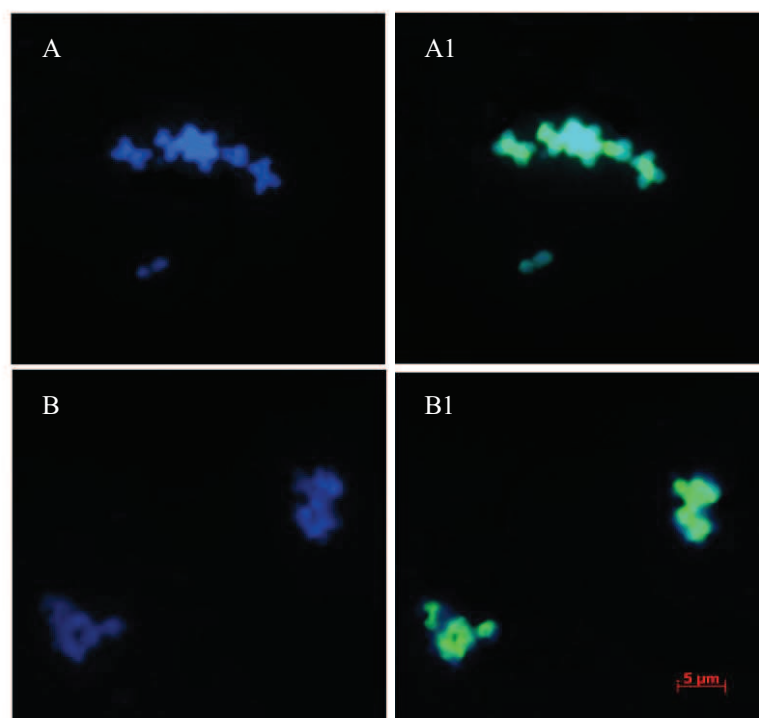


Figura 5 Imunodeteção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante a meiose no genótipo BN2 (milheto) (A) metáfase I, (B) telófase I. (A e B) Observação no DAPI

Nota: (A1 e B1) Observação com anticorpo contra H3S10f.

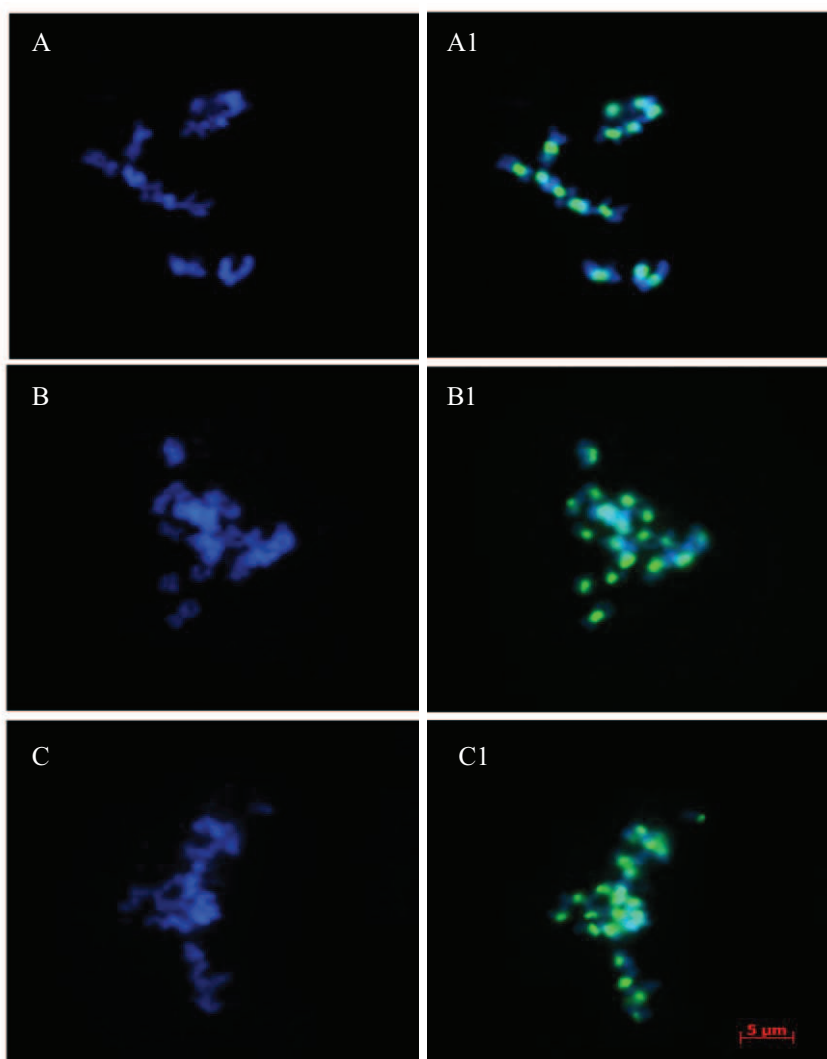


Figura 6 Imunodeteção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante a diacinese (A e B) e metáfase I (C) no genótipo hexaploide PCM 0702-03

Nota: (A e B) Observação no DAPI. (A1 e B1) Observação com anticorpo contra H3S10f.

A relação da fosforilação da histona H3 na serina 10 com a eliminação cromossômica foi avaliada no híbrido poliploidizado. Foram encontradas

irregularidades nas diacineses, metáfases I, anáfases I e telófases I. Nas diacineses foram observados bivalentes sem o sinal da H3S10f (Figura 7 A1). A ausência do sinal da fosforilação também foi observada em cromossomos em processo de eliminação na metáfase I, anáfase I e telófase I (Figura 7B1, C1 e D1).

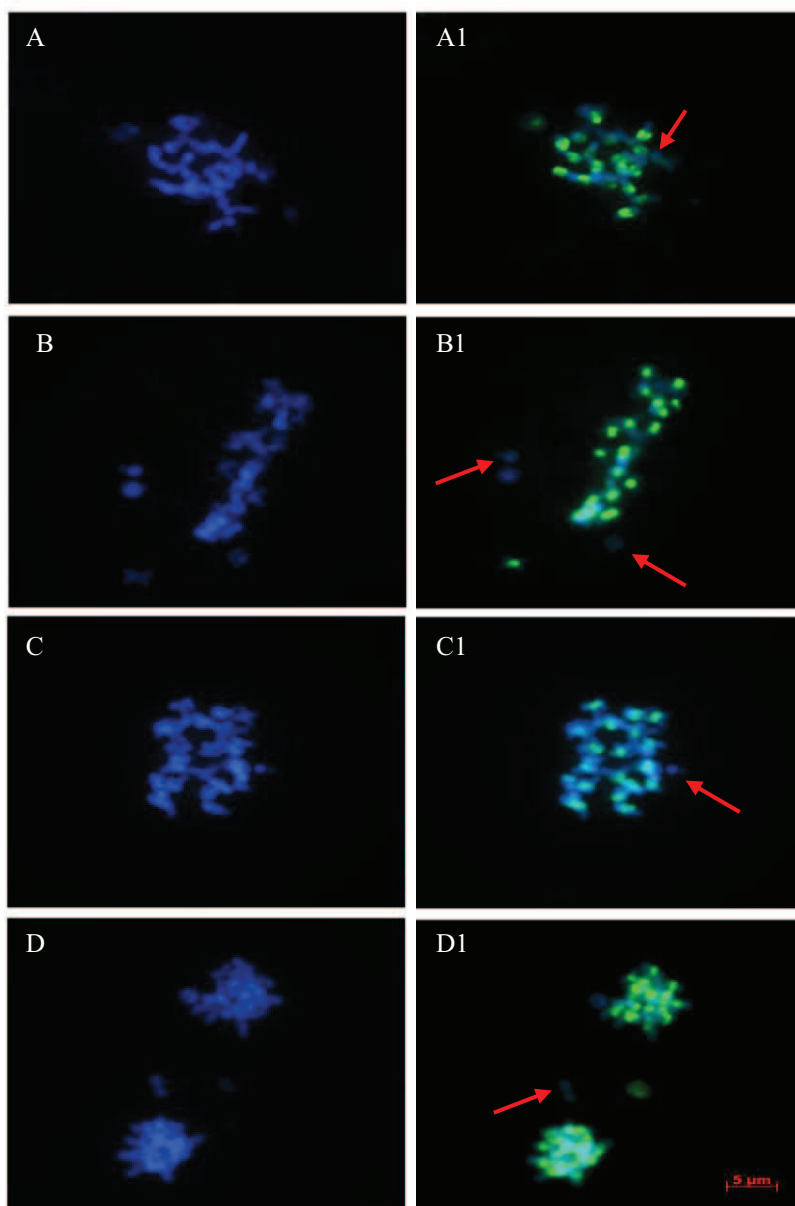


Figura 7 Imunodeteção da histona H3 fosforilada na serina 10 (H3S10f) durante a diacinese (A), metáfase I (B), anáfase I inicial (C) e telófase I (D) do híbrido poliploidizado PCM 0702-03

Nota: (A a D) DAPI. (A1, B1 e C1) Observação com anticorpo contra H3S10f. Setas vermelhas indicam cromossomos sem o sinal da fosforilação.

#### 4 DISCUSSÃO

A fosforilação da histona H3 na serina 10 (H3S10f) é uma das modificações pós traducionais mais bem estudadas e diversos autores associam esta modificação com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs (BANERJEE; CHAKRAVATI, 2011), com a condensação cromossômica (HANS; DIMITROV, 2001), morte celular, reparo, replicação e recombinação do DNA (OKI; AIHARA; ITO, 2001). Em animais, esta modificação ocorre durante o ciclo celular e se relaciona fortemente com a condensação cromossômica (MANZANERO et al., 2000; WEI et al., 1998). Em plantas, embora haja a concordância de diversos autores de que a fosforilação esteja envolvida com a condensação, estudos demonstram que os eventos desta modificação pós-traducional podem estar relacionados também com a coesão das cromátides irmãs (TOPP; DAWE, 2006), ocorrendo majoritariamente na região pericentromérica, desde a prófase até a anáfase, como foi constatado em *Arabidopsis* (SHIBATA; MURATA, 2004) e em gramíneas como milho (KASZÁS; CANDE, 2000), trigo (HOUBEN et al., 1999) e centeio (MANZANERO et al., 2000).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram os dados da literatura, em que a fosforilação da H3 na serina 10 correlaciona-se com a posição da cromatina pericentromérica (GERNAND; DEMIDOV; HOUBEN, 2003; MANZANERO et al., 2000; HOUBEN et al., 1999, 2007) desde a prófase até a telófase durante o ciclo celular dos parentais e híbridos interespecíficos. Nos genótipos avaliados de *Pennisetum* Rich. spp. o início do processo de fosforilação foi observado na prófase tardia e prometáfase, fases em que os cromossomos já se encontram em processos de compactação. Este fato, associado ao enriquecimento da fosforilação na região pericentromérica, permite supor que esta modificação, durante a mitose, não possui relação com a

condensação cromossômica, e sim com a coesão das cromátides, observação suportada também pelo fato de os sinais da H3S10f reduzirem na anáfase.

Em plantas, diversos estudos suportam a ideia de que a fosforilação seja requerida para a coesão de cromátides irmãs. Em *Brachiaria* spp., o padrão de fosforilação da H3S10 em genótipos diploides e tetraploides apresenta-se distribuído na região pericentromérica durante a mitose e meiose II, e ao longo dos cromossomos durante a meiose I, denotando correlação da fosforilação com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs durante as divisões celulares (PAULA, 2012).

A relação da H3S10f com a coesão entre cromátides irmãs também se verifica durante a meiose. Kaszás e Cande (2000) reforçam esta ideia em seu trabalho envolvendo 3 linhagens de milho, entre as quais uma continha um gene mutante (*Adf1*), que causa ausência da primeira divisão meiótica, devido à omissão das fases de leptóteno a paquíteno, resultando na formação de 20 univalentes que segregam de forma equacional na anáfase I, similar ao que ocorre durante a divisão mitótica. Em indivíduos normais, a distribuição espacial e temporal de ocorrência da fosforilação coincide com o tempo em que as cromátides irmãs permanecem unidas até a anáfase, sendo a região pericentromérica o maior sítio de fosforilação. Na segunda divisão meiótica, cromossomos do mutante *adf1* consistem de cromátides irmãs individuais e sinais de fosforilação não foram observados na região pericentromérica. A ausência de marcação nestes cromossomos suporta a hipótese que a H3S10f pode ser requerida mais para manutenção da coesão entre as cromátides irmãs do que para a condensação da cromatina, uma vez que nenhum sinal de fosforilação foi observado quando não houve coesão nas linhagens mutantes na metáfase II.

A fosforilação da H3 pode, portanto, estar relacionada com a manutenção e estabilização das coesinas, evitando sua dissociação. A manutenção da coesão entre as cromátides é de fundamental importância para a correta segregação das

cromátides durante a divisão celular. Esta coesão restrita a região pericentromérica é responsável por garantir a correta orientação do cinetócoro e estabilizar a conexão entre as cromátides irmãs perante as forças geradas pelas fibras do fuso (NASMYTH; HAERING, 2009).

Na meiose do genótipo PCM0702-03, avaliado no presente trabalho, a região cromossômica em que se verificou a fosforilação, limitada à região pericentromérica, coincidiu com resultados anteriores da literatura realizados em outras gramíneas, como *Brachiaria sp.*, (PAULA, 2012), *Secale cereale* L. e *Triticum aestivum* L., (MANZANERO et al., 2000), *Zea mays* L. (KASZÁS; CANDE, 2000). No milho, entretanto, a distribuição da H3S10f nos meiócitos apresentou-se não apenas pericentromérica, mas também ao longo dos cromossomos durante a meiose I.

Manzanero et al. (2000) também observaram sinais da fosforilação da histona H3 na serina 10 ao longo dos braços cromossômicos durante a meiose I em trigo e centeio. Os autores associaram este modelo de fosforilação com a coesão das cromátides, mais do que com a condensação dos cromossomos. A coesão entre as cromátides irmãs só se rompe na anáfase II, para permitir a segregação das cromátides para os pólos opostos da célula. Esta coesão é mantida no nível do centrômero e, durante a meiose I, pode ocorrer também ao longo dos braços cromossômicos, como observado neste estudo nos cromossomos do milho. Esse fato, contudo, não implica necessariamente que no milho haja uma associação da H3S10f com a condensação cromossômica, uma vez que, apesar da fosforilação ocorrer ao longo dos cromossomos, a marcação é mais forte na região pericentromérica, indicando que possivelmente a fosforilação se iniciou nessa região e se estendeu ao longo dos braços conforme a divisão avançou, atingindo seu ápice durante a metáfase. Este comportamento da fosforilação sugere uma possível relação da H3S10f com a coesão, visto que, para que houvesse relação desta com a condensação, a

marcação deveria ocorrer fortemente no cromossomo inteiro, e não com maior intensidade na região pericentromérica. Ademais, a coesão entre braços também ocorre, sendo proeminente no início do ciclo celular, sendo as coesinas removidas dos braços e mantidas na região pericentromérica no decorrer da divisão (MOSER; SWEDLOW, 2011).

No híbrido poliploidizado avaliado neste trabalho, foram observados alguns cromossomos sem o sinal da H3S10f durante a diacinese, metáfase I, anáfase I e telófase I. Esta ausência pode ter importante influência na eliminação cromossômica observada, uma vez que as falhas no processo de fosforilação poderiam alterar o processo de associação de coesinas, extremamente importante para a correta segregação dos cromossomos durante o ciclo celular.

No híbrido poliploidizado de *Pennisetum* Rich. spp. avaliado, anormalidades meióticas envolvendo a formação de pontes e cromossomos perdidos foram observadas. Tais anormalidades já foram relatadas anteriormente nestes híbridos (PAIVA et al., 2012). Considerando a localização da fosforilação da histona H3 na região pericentromérica pode-se supor que a atuação da H3S10f na atividade centromérica está relacionada também com eventos de eliminação cromossômica. Problemas na associação de coesinas podem ocasionar segregação anormal de cromossomos e de cromátides-irmãs, causa das anormalidades citadas cima, que tem como consequência à eliminação de alguns cromossomos. Eckert, Gravidahl e Megee (2007) sugeriram que modificações de histonas mediam o recrutamento de coesinas para a região do centrômero, sendo que cromossomos com baixa associação de coesinas pericentroméricas exibiram níveis maiores de separação cromatídica e perda cromossômica.

Possivelmente, devido à forte relação entre a H3S10f e a coesão entre cromossomos e cromátides-irmãs, a ausência de fosforilação nos cromossomos não marcados, como observado no híbrido hexaploide, pode resultar na baixa associação de coesinas nos mesmos, o que levaria consequentemente, à

eliminação destes cromossomos, em função das falhas durante a segregação. Neste genótipo, células com pelo menos 1 bivalente não marcado durante a diacinese na meiose I foram observadas. Este padrão se manteve também durante a metáfase e a telófase, o que permite sugerir uma relação desta fosforilação com a alta ocorrência de mixoploidia e consequente eliminação cromossômica neste híbrido. De acordo com Eckert, Gravdahl e Megee (2007), a coesão entre braços pode parcialmente compensar a ausência de coesão centromérica, mas não impedir a eliminação, pois a presença de coesinas centroméricas é responsável pela fidelidade na segregação. No genótipo avaliado com as pesquisas realizadas para este trabalho, à exceção do milho, não foi verificada coesão entre braços, o que pode gerar uma maior probabilidade de perda cromossômica, devido à redução da associação de coesinas pericentroméricas. Neste sentido, é possível que cromossomos não marcados observados no híbrido hexaploide avaliado neste trabalho possam ter sofrido eliminação devido à perda da associação de coesinas, já que a H3S10f possui atuação direta na manutenção destas durante o ciclo celular.

A influência das coesinas na eliminação cromossômica foi verificada por Ishii et al. (2010), que avaliaram a eliminação em híbridos de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) X trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho X aveia (*Avena sativa* L.). Nestes híbridos, as coesinas presentes nos cromossomos do milho não apresentaram dissociação normal durante a anáfase. Entretanto, em *Pennisetum* spp., estudos mais aprofundados são necessários para confirmar a hipótese de que a eliminação cromossômica nos híbridos poliploidizados está relacionada com ausência da fosforilação da histona H3 na serina 10 e consequente perda da atividade centromérica. Quando, eventualmente, observou-se uma metáfase I com um bivalente com marcação distante do conjunto cromossômico (Figura 8B), este, contudo, não deve ser compreendido

como um cromossomo adiantado ou perdido, visto que estava alinhado na placa metafásica, permanecendo dentro do conjunto cromossômico.

Estudos futuros podem ser conduzidos com o intuito de relacionar a eliminação cromossômica nos híbridos poliploidizados de capim-elefante e milho com outras proteínas, como a proteína centromérica (CENH3) ou outras modificações epigenéticas, como metilação e acetilação de histonas.

## 5 CONCLUSÕES

Durante a mitose do capim-elefante, do milho e do híbrido triploide, a localização espaço-temporal da fosforilação da histona H3 na serina 10 está relacionada com a manutenção da coesão entre cromátides irmãs.

A hibridação interespecífica e a indução de poliploidia não interferem na distribuição espaço-temporal da H3S10f nos genótipos de *Pennisetum* sp.

Nos híbridos hexaploides instáveis, a H3S10f está associada à coesão de cromátides na região pericentromérica de forma que a ausência de fosforilação em alguns cromossomos interfere na segregação cromossômica, podendo resultar em eliminação cromossômica.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. C. et al. Mixoploidy in napiergrass x pearl millet hybrids treated with antimetabolic agents. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1629-1635, nov. 2006.
- BANERJEE, T.; CHAKRAVATI, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. **Molecular Cell Biology**, Oxford, v. 31, n. 24, p. 48-58, 2011.
- BARBOSA, S. et al. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 365-372, 2007.
- CAMPOS, J. M. S. et al. In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**, Westport, v. 128, n. 1, p. 101-104, Feb. 2009.
- ECKERT, C. A.; GRAVDAHL, D. J.; MEGEE, P. C. The enhancement of pericentromeric cohesin association by conserved kinetochore components promotes high-fidelity chromosome segregation and is sensitive to microtubulebased tension. **Genes Development**, Cold Spring Harbor, v. 21, n. 1, p. 278-91, 2007.
- FUKUI, K.; NAKAYAMA, S. (Ed.). **Plant chromosomes: laboratory methods**. Boca Raton: CRC, 1996. 247 p.
- GERNAND, D.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A. The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 101, n. 1, p. 172-176, 2003.
- HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, Basingstoke, v. 20, n. 1, p. 3021-3027, 2001.
- HOUBEN, A. et al. Phosphorylation of histone H3 in plants: a dynamic affair. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1769, n. 1, p. 308-315, 2007.

- Houben, A. et al. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. **The Plant Journal**, Michigan, v. 18, n. 1, p. 675-679, 1999.
- ISHII, T. et al. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cells. **Chromosome Research**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 821-831, 2010.
- Kaszás, E.; Candé, W. Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 18, p. 3217-3226, 2000.
- Leão, F. F. et al. Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 712-719, 2011.
- Manzanero, S. et al. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. **Chromosoma**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 308-317, 2000.
- Moser, S. C.; Swedlow, J. T. How to be a mitotic chromosome. **Chromosome Research**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 307-319, 2011.
- Nasmyth, K.; Haering, C. H. Cohesin: its roles and mechanisms. **Annual Reviews Genetics**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 525-558, 2009.
- Okamoto, M.; Aihara, H.; Ito, T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. **Subcell Biochemistry**, Mainz, v. 41, n. 1, p. 319-336, 2001.
- Paiva, E. A. A. et al. Meiotic behavior in early and recent duplicated hexaploid hybrids of napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Caryologia**, Firenze, v. 65, n. 1, p. 114-120, 2012.

PAULA, C. M. P. de. **Padrão de distribuição da histona H3 fosforilada na serina 10 durante a mitose e a meiose em espécies de *Brachiaria***. 2012. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PÉREZ-CADAHÍA, B.; DROBIC, B.; DAVIE, J. R. H3 phosphorylation: dual role in mitosis and interphase. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 87, n. 5, p. 695-709, 2009.

SHIBATA, F.; MURATA, M. Differential localization of the centromerespecific proteins in the major centromeric satellite of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Cell Science**, London, v. 117, n. 1, p. 2963-2970, 2004.

TOPP, C. N.; DAWE, R. K. Reinterpreting pericentromeric heterochromatin. **Current Opinion in Plant Biology**, Freiburg, v. 9, n. 1, p. 647-653, 2006.

WEI, Y. et al. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, n. 1, p. 7480-7484, 1998.

ZHANG, X. et al. Phosphoserines on maize centromeric histone H3 and Histone H3 demarcate the centromere and pericentromere during chromosome segregation. **The Plant Cell**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 572-583, 2005.