



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Citogenética clássica e molecular de espécies do gênero
Manihot Miller (Euphorbiaceae Juss.)

GENIALDO RAMOS DOS SANTOS

Recife

2014

GENIALDO RAMOS DOS SANTOS

Citogenética clássica e molecular de espécies do gênero
Manihot Miller (Euphorbiaceae Juss.)

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Botânica - PPGB, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Botânica.

ORIENTADOR: PROFº DR. REGINALDO DE CARVALHO

CO-ORIENTADORA: DRª. LIDIANE DE LIMA FEITOZA

Recife

2014

Ficha catalográfica

S237c Santos, Genialdo Ramos dos
Citogenética clássica e molecular de espécies do
gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae Juss.) / Genialdo
Ramos dos Santos. – Recife, 2014.
54 f. : il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.
Dissertação (Mestrado em Botânica) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Biologia,
Recife, 2014.
Inclui referências e anexo(s).

1. Cromossomo 2. Polimorfismo cariotípico 3.
CMA/DAPI 4. FISH 5. Epigenética I. Carvalho, Reginaldo de,
orientador II. Título

CDD 581

Citogenética clássica e molecular de espécies do gênero *Manihot* Miller
(Euphorbiaceae Juss.)

GENIALDO RAMOS DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica. Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora :

Orientador:

Dr. Reginaldo de Carvalho, UFRPE

Banca Examinadora:

Prof^o. Dr. Edson Ferreira da Silva, UFRPE

Prof^o. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, UFPE

Prof^a. Dr^a. Margareth Ferreira Sales, UFRPE

Prof^a. Dr^a. Ana Christina Brasileiro-Vidal, UFPE (Suplente)

Data da aprovação: 04/08/2014

Dedico:

À Deus;

Aos meus Pais, Maria Cícera dos Santos Silva e
Gerivaldo Ramos da Silva;

A minha futura esposa Shanne Cristina da Silva;

E ao meu querido avô, Manoel Laurindo dos
Santos (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Cícera dos Santos Silva, meu pai Gerivaldo Ramos da Silva, que apesar das dificuldades enfrentadas para me educar durante a infância, me ensinaram a persistir e nunca desistir dos meus objetivos.

Agradeço aos meus irmãos, Geniclécio Ramos dos Santos, Givaldo Ramos dos Santos e Giselda Ramos dos Santos pelo incentivo, compreensão e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho, meu orientador, pela dedicação e paciência. Registro aqui minha imensa admiração, um exemplo de simplicidade e de sabedoria. Agradeço pela confiança depositada e por lições de vida adquiridas desde a minha graduação. Meu agradecimento em especial!

À Dr^a Lidiane de Lima Feitoza, minha co-orientadora e grande amiga, pela oportunidade e conhecimentos transmitidos. Meu eterno agradecimento!

Aos colegas de laboratório, Maria Angélica, Maria Luiza, Vanessa, Lamonier, Silmar, Viviane, Emmanuely, Iêda, Polyanna e Tássia, e tantos outros que a cada dia vem fazendo parte dessa minha segunda família, muito obrigado a todos vocês.

Ao CNPq pela bolsa sem a qual eu não conseguiria prosseguir nos estudos.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Botânica - PPGB pela oportunidade da realização do meu mestrado.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos taxonômicos do gênero <i>Manihot</i> Miller	3
2.2. Importância econômica do gênero <i>Manihot</i> Miller.....	4
2.3.Citogenética do gênero <i>Manihot</i> Miller.....	4
2.4.Técnicas Citogenéticas e suas aplicações.....	5
2.4.1.Coloração com o corante Giemsa.....	5
2.4.2.Coloração sequencial com Fluorocromos CMA/DAPI.....	6
2.4.3.FISH - Hibridização in situ fluorescente.....	7
2.5.Papel das proteínas histonas na cromatina de plantas.....	8
3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
MANUSCRITO.....	16
Resumo	18
Introdução.....	19
Material e métodos.....	20
Resultados.....	22
Discussão.....	23
Conclusões.....	27
Referências bibliográficas.....	28
Apêncices: figuras.....	34
Anexos.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Células mitóticas de *Manihot esculenta* Cranz. a- Padrão de condensação profásico revelado por Giemsa. b- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC. c-d – Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3K27me3 mostrando suas marcações terminais e na cromatina interfásica descondensada. Setas em d evidenciam blocos fortemente marcados com H3K27me3 na periferia do nucléolo. Barra = 10..... 34
- Figura 2** – Células mitóticas de *Manihot esculenta* var. mandiocaba. a- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC. b-c FISH com sondas de DNAr 5S e 45S evidenciando dois e seis blocos, respectivamente. d-e – Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3K27me3 mostrando suas marcações terminais e na cromatina interfásica descondensada (d1). f - Imunocoloração com a histona anti-H3S10f mostrando marcação na região pericentromérica em metáfase. Setas em d2 mostram cromatina difusa acetilada na prófase e em “e” evidenciam blocos fortemente marcados com H3K27me3 na periferia do nucléolo. Barra = 10 µm..... 35
- Figura 3** – Células mitóticas de *Manihot dichotoma* Ule. a- Padrão de condensação profásico proximal revelado por Giemsa. b- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC. c-d – FISH com sondas de DNAr 5S e 45S evidenciando dois e seis blocos, respectivamente. e-f - Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3S10f mostrando suas marcações terminais e pericentromérica, respectivamente. Barra = 10 µm..... 36
- Figura 4**– Células mitóticas de *Manihot elongata* P. Carvalho & M. Martins. a- FISH com sondas de DNAr 45S evidenciando seis blocos nas regiões terminais de cromossomos pro- metafásicos. b Coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC nos núcleos interfásicos e em prometáfase. Barra = 10 µm..... 37
- Figura 5** – Células mitóticas de *Manihot glaziovii* Muell. a- Padrão de condensação profásico proximal revelado por Giemsa. b- FISH com sondas de DNAr 45S evidenciando seis blocos terminais (setas). c - Imunocoloração com a histona anti-H4K5ac revelando marcação terminal em ambos os braços ou em apenas um braço (insertos e setas em c2). Em c1” seta indica cromocentro na periferia do nucléolo hipoacetilado. Observe também a cromatina difusa fortemente hiperacetilada. Barra = 10 µm..... 38

Figura 6 – Células mitóticas de *Manihot maracasensis* Ule..a- Coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelando doze bandas ricas em GC em metáfase. b-c – FISH com sondas de DNAr 5S e 45S evidenciando dois e seis blocos, respectivamente (setas). d-e - Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3S10f mostrando suas marcações terminais e pericentromérica, respectivamente. Em d1''' setas indica cromocentros hipoacetilados, inclusive na periferia do nucléolo que também encontra-se hipoacetilado. Observe também a cromatina difusa fortemente hiperacetilada em d2. Em e3''' inserto mostra marcação apenas pericentromérica. Barra = 10 µm..... 39

Figura 7 – Ideograma mostrando o número e posição das bandas CMA⁺ (amarelo), DNAr 45S (vermelho), DNAr 5S (verde claro), para cinco espécies do gênero *Manihot*..... 40

RESUMO

O gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae Juss) possui cerca de 100 espécies, sendo o Brasil central (Sul de Goiás e Oeste de Minas Gerais), considerado o maior centro de diversificação, seguido do Sudeste do México, Nordeste do Brasil e Sudeste do Mato Grosso. *Manihot* é originário do continente americano distribuindo-se desde os Estados Unidos até a Argentina. De todas as espécies do gênero, *M. esculenta* Crantz é a espécie mais importante do ponto de vista econômico, por ser uma das culturas alimentares mais difundidas no mundo. *Manihot* é um gênero taxonomicamente complexo por apresentar grande plasticidade morfológica além de híbridos interespecíficos naturais devido à fraca barreira de isolamento reprodutivo. Com o interesse de compreender melhor esse gênero do ponto de vista citogenético, o presente trabalho teve por objetivo analisar cinco espécies de *Manihot* através do emprego da técnica convencional, bandeamento CMA/DAPI, hibridização *in situ* (FISH) e imunocoloração. De uma forma geral, os dados apontaram uma forte semelhança cariotípica entre as diferentes espécies estudadas. O número diplóide corresponde à $2n = 36$, com cromossomos de pequeno tamanho, em média 2,5 micrômetros e morfologia de meta a subcêntrica. O padrão de condensação foi sempre profásico proximal, embora com pequenas diferenças no tempo de condensação entre braços de alguns dos cromossomos do cariótipo. Com exceção de *M. maracasensis* e *M. dichotoma*, que apresentou 12 bandas de heterocromatina (CMA⁺), a marcação com o fluorocromo cromomicina evidenciou, em geral, seis bandas CMA⁺ terminais. Em todas as espécies sempre houve a presença de outras pequenas bandas teloméricas fracamente coradas com CMA⁺. A FISH com sondas de DNA ribossomal evidenciou, em geral, seis sítios de DNAr 45S, sempre co-localizados com às bandas heterocromáticas CMA⁺. Dois sítios de DNAr 5S subterminais foram observados para todas as espécies estudadas. Contudo, observou-se polimorfismo para a espécie *M. dichotoma* que apresentou sete sítios de DNAr 45S. A imunocoloração com os anticorpos anti-H4K5ac e anti-H3K27me3 foi evidenciada na forma de bandas na eucromatina descondensada terminal dos cromossomos metafásicos e na cromatina difusa dos núcleos interfásicos. A marcação com anti-H3S10f ocorreu nos pericentrômeros dos cromossomos e ausente na intérfase. A contribuição desse trabalho foi estudar os tipos de cromatina e seu comportamento em diferentes estágios de compactação cromossômica, entender a constância cariotípica e as pequenas modificações surgidas por eventos carioevolutivos e caracterizar citogeneticamente as espécies de *Manihot* fornecendo parâmetros cariotípicos úteis do ponto de vista citotaxonômico.

Palavras-chave: Cromossomo, CMA/DAPI, Epigenética, FISH, Polimorfismo cariotípico.

ABSTRACT

The *Manihot* genus belongs to the family Euphorbiaceae and has 100 species. The central part of Brazil as South West of Goiás and Minas Gerais are considered the greatest center of diversification, followed by the Southeast of Mexico, northeastern of Brazil and southeastern of Mato Grosso. *Manihot* originates from the Americas being distributed from the United States to Argentina. *M. esculenta* Crantz is the most important of all species kind of economic point of view, as one of the most widespread food crops in the world. *Manihot* is a taxonomically complex genus by having large botanical plasticity beyond natural interspecific hybrids due to poor reproductive isolation barrier. To better understanding this genus in the cytogenetic, this study aimed to characterize five species of *Manihot* by employing the conventional technique, double staining with CMA and DAPI, fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunostaining. In general, the data showed a strong similarity between studied species. The diploid number corresponds to $2n = 36$ chromosomes with small size, on average 2.5 micrometers and morphology of metacentric to submetacentric. The condensation pattern was always proximal profásico, but with minor differences in the time of condensation between arms of some chromosomes of the karyotype. With the exception of *M. maracasensis* e *M. dichotoma*, which showed 12 heterochromatic bands (CMA⁺) showed with chromomycin, all the others species showed six terminal CMA⁺ bands. In all species, there was always the presence of other small telomeric bands weakly stained with CMA⁺. Fluorescence in situ hybridization with ribosomal DNA probes showed six bands or regions of the 45S rDNA, always corresponding to heterochromatic bands CMA⁺. Only two blocks of 5S rDNA subterminal were observed for all species. However, we observed polymorphism for the species *M. dichotoma* showed that seven regions of 45S rDNA. Immunostaining with anti-H4K5ac and anti-H3K27me3 antibodies was detected as bands in metaphase chromosomes terminal of euchromatin and decondensed chromatin of interphase nuclei diffuse. Labeling with anti-H3S10f pericentrômeros occurred in the chromosomes and absent in interphase. The contributions of this work was to study the types of chromatin and its behavior in different stages of chromosome condensation, understand the karyotypic stability and small changes emanating from carioevolutivos events and cytogenetically characterize the species *Manihot* providing useful karyotypic parameters to the cytotaxonomic.

Keywords: chromosomes, CMA/DAPI, Epigenetic, FISH, karyotypic polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae compreende cerca de 334 gêneros e mais de 8.000 espécies (WEBSTERS, 1994). Segundo Carneiro-Torres et al. (2002), as Euphorbiaceae estão entre as famílias de grande importância econômica por incluir a mandioca, seringueira, mamona, pinhão manso, entre outras, suas plantas são geralmente latescentes, monóicas ou dióicas, com flores díclinas, sendo as flores pistiladas caracterizadas pelo gineceu sincárpico, ovário súpero e em geral tricarpelar e trilocular.

O gênero *Manihot* Miller possui 100 espécies, sendo o Brasil, mais precisamente a região entre o Sul de Goiás, São Paulo e Oeste de Minas Gerais, considerado o principal centro de diversidade do gênero (ROGERS e APPAN, 1973; NASSAR, 1978; NASSAR, 2000). É originário do continente americano, distribuindo-se desde os Estados Unidos até a Argentina. De todas as espécies do gênero *Manihot*, *M. esculenta* Crantz é a mais importante, por ser uma das culturas alimentares mais difundidas no mundo, uma vez que se aproveita tanto a parte aérea como as raízes tuberosas, seja para o consumo humano ou animal, sendo utilizada como parte da composição de diversos outros produtos e subprodutos. A mandioca, por ser uma planta tropical e ter seu centro geográfico de especialização no Brasil, tem seu germoplasma distribuído por todo território nacional (ROGERS e APPAN, 1973). Porém, nos últimos anos, com a destruição do habitat natural, com a substituição de variedades locais por outras introduzidas e com a utilização em grandes áreas de umas poucas variedades melhoradas, tem levado de forma alarmante à perda de diversidade genética da mandioca. No Brasil, o maior banco de germoplasma de mandioca encontra-se na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical -CNPMPF em Cruz das Almas (BA), cujos acessos são oriundos de diferentes regiões do país.

Citologicamente, as espécies de *Manihot* analisadas até o momento apresentam $2n = 36$ cromossomos pequenos e muito similares (MAGOON *et al.* 1970; NASSAR, 2000; BAI *et al.* 1992; NASSAR *et al.* 2002; CARVALHO e GUERRA, 2002). A fórmula cariotípica para as espécies de *Manihot* é $16M (2Sat) + 2SM$, com heteromorfismo entre os cromossomos satelitados, além de seis sítios de DNAr 45S coincidindo com as bandas heterocromáticas CMA positivas, revelados após análise de trinta-nove cultivars de mandioca e oito espécies selvagens relacionadas ao gênero *Manihot* (CARVALHO e GUERRA, 2002). A presença de dois sítios de DNAr 5S em um par de homólogos tem sido identificado, além de alguns cromossomos apresentarem condensação da cromatina proximal desigual entre os braços cromossômicos (CARVALHO e GUERRA, 2002; SANTOS *et al.* 2012). A utilização de técnicas em citogenética clássica e molecular como a coloração com Giemsa 2%,

fluorocromos base específica CMA e DAPI, juntamente com hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e a imunocoloração, auxiliam na identificação de marcadores cromossômicos, na dinâmica e comportamento dos genomas durante as diferentes fases do ciclo celular e, na identificação de parâmetros citogenéticos utilizados na citotaxonomia e, no entendimento da evolução cariotípica. Com isso, o presente trabalho objetivou caracterizar de forma comparativa o cariótipo das espécies: *Manihot dichotoma* Ule, *Manihot esculenta* Crantz, *Manihot elongata* P. Carvalho & M. Martins, *Manihot glaziovii* Muell, e *Manihot maracasensis* Ule, visando identificar polimorfismos cariotípicos, estudar o comportamento e os tipos de cromatina e fornecer diferentes parâmetros citogenéticos aplicados na citotaxonomia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos taxonômicos do gênero *Manihot* Miller

O gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae Juss.) possui aproximadamente 100 espécies, sendo originário do continente americano e distribuindo-se desde os Estados Unidos até a Argentina (ROGERS; APPAN, 1973). No Brasil são encontradas 78 espécies, cerca de 80% do total, sendo 68 delas endêmicas (CORDEIRO et al., 2013), com grande concentração nos ecossistemas cerrados e caatinga (OLIVEIRA, 2011). A região central do Brasil é considerada o principal centro de diversidade por apresentar um grande número de espécies nativas do gênero e por algumas dessas serem consideradas espécies rudimentares como *M. anômala* Pohl, *M. stipulares* Pax, *M. longipetiolata* Pohl, *M. stricta* Baillon. O Sudeste do México, Nordeste do Brasil e Bolívia compõem o segundo centro de diversidade. Outra área de ocorrência natural de muitas espécies no Brasil é a região amazônica (NASSAR, 2000; OLSEN e SCHAAL, 2001). Contudo, são indicados dois centros de diversificação: o primeiro no planalto central do Brasil e o segundo na costa Oeste do México e Guatemala (VALLE, 1991).

O gênero *Manihot* Miller é composto por 19 seções, onde 13 delas englobam as espécies com ocorrência no Brasil, morfologicamente são reconhecidas pelas folhas que em geral são lobadas, de tonalidades purpúreas, presença de látex e inflorescências racemosas ou paniculadas (ROGERS & APPAN, 1973). Suas espécies são perenes desenvolve-se em áreas abertas ou de florestas e apresentam habito de crescimento desde ervas, subarbustos, arbustos e raramente árvores ou trepadeiras (ROGERS e APPAN, 1973; SOARES, 1995; JUDD et. al, 1999; CARMO JUNIOR et. al, 2013).

As folhas são membranáceas ou coriáceas, inteiras ou lobadas, apresentando de 3 a 11 lobos, lanceolados, obovados, ovados ou reniformes, o pecíolo apresenta cor e tamanhos variados (SOARES e SALVIANO, 2000). As inflorescências são do tipo racemo ou panícula, as flores estaminadas e pistiladas ocorrem na mesma planta, sendo as estaminadas na parte superior, monoclamídeas, cálice com cinco sépalas imbricadas e 10 estames. As flores pistiladas, na parte basal, são bem maiores, apresentam ovário súpero, tricarpelar e trilobular, com um óvulo em cada lóculo, estiletos em número de três, curtos e unidos entre si. O estigma é carnoso, ondulado e bem desenvolvido. O fruto é esquizocápáceo, tricoca, apresentando carpóforo, com deiscência septicida e loculicida, superfície geralmente lisa, podendo haver espécies com frutos alados. Os frutos amadurecem e secam depois de seis meses quando se abrem e expulsam as sementes a grandes distâncias. As sementes são carunculadas,

apresentando superfície lisa e brilhante coberta por manchas escuras (ROGERS e APPAN, 1973; CARVALHO e FUKUDA et al, 2006).

2.2. Importância econômica do gênero *Manihot* Miller

Os primeiros registros do cultivo de mandioca nas Américas datam de 1.400 anos aC em um pré-histórico vilarejo da civilização Maya em El Salvador. No Brasil, foram encontradas gravuras de raízes semelhantes às de mandioca em um sítio arqueológico de Minas Gerais há aproximadamente 800 anos dC (FREITAS; MARTINS, 2003). Provavelmente, o processo de domesticação se deu pela produção e utilização das raízes de espécies como *Manihot flabellifolia* e *M. peruviana* (ALLEN, 1987). Estudos mostram os Estados do Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Acre como possíveis regiões brasileiras de domesticação da mandioca por populações indígenas. A introdução em outros continentes como o africano e o asiático se deu no século XVI com as grandes navegações (OLSEN e SCHAAL, 2001; ROGERS e APPAN, 1973).

2.3. Citogenética do gênero *Manihot* Miller

A análise genética da diversidade e da relação entre diferentes espécies, populações e indivíduos tem sido intensamente estudada como estratégia para o entendimento de questões evolutivas e citotaxonômicas.

As barreiras de isolamento reprodutivo em espécies de *Manihot* são fracas, permitindo a ocorrência de hibridação interespecífica natural e artificial entre *M. esculenta* e espécies silvestres (NASSAR et al., 1996). Na natureza, sobretudo na região do semiárido brasileiro (caatinga), por exemplo, existem diversos prováveis híbridos (JENNINGS, 1976). Todas as espécies do gênero *Manihot* analisadas citologicamente apresentem $2n = 36$ com cromossomos pequenos e muito similares (CARVALHO e GUERRA, 2002). A utilização de técnicas de citogenética molecular com a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) pode auxiliar na identificação de marcadores cromossômicos ou diferenças na constituição genômica que permitam a distinção entre as espécies do gênero. A FISH tem sido extensamente aplicada recentemente no mapeamento físico de sequências e na caracterização de espécies vegetais. Esta técnica permite a localização *in situ* de sequências de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) no cromossomo, no citoplasma, nas organelas ou no tecido estudado (GUERRA, 2004). Com esta técnica pode-se localizar sequências de cópia única, sequências repetitivas, cromossomos específicos ou genomas inteiros.

Poucos estudos incluindo técnicas de bandeamento mais refinadas foram realizados na família Euphorbiaceae, provavelmente devido ao pequeno tamanho dos cromossomos.

Carvalho *et al.* (1999) descreveram o primeiro triploide espontâneo no gênero, a cultivar Maniêba de *M. esculenta* com $2n = 54$. Posteriormente, Carvalho e Guerra (2002) caracterizaram citogeneticamente 39 cultivares de *Manihot esculenta* Crantz e outras oito espécies deste gênero oriundas de diversos bancos de germoplasma do Nordeste do Brasil. Os autores encontraram $2n = 36$ cromossomos em todos os acessos analisados, excetuando-se a cultivar maniêba de *M. esculenta* que apresentou $2n = 54$, caracterizando-se como um triploide natural e reforçando dados prévios de Carvalho *et al.* (1999). Este último representa o trabalho citológico mais completo para o gênero *Manihot* até o presente momento. Nesse trabalho, foram utilizados a coloração com fluorocromos, o bandeamento C com Giemsa, a coloração com nitrato de prata para verificação do número de nucléolos e a hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNA ribossomal 5S e 45S em algumas espécies do gênero *Manihot*. Os resultados com fluorocromos CMA/DAPI revelaram pequenos polimorfismos mesmo entre espécies de mesmo número cromossômico. A hibridização *in situ* revelou seis sítios de DNAr 45S colocalizados com os blocos de CMA⁺ além de dois outros cromossomos portando dois sítios de DNAr 5S. Os resultados demonstram que estes tipos de marcadores podem ser muito úteis na caracterização de espécies e cultivares, bem como para estudos evolutivos.

2.4. Técnicas Citogenéticas e suas aplicações

2.4.1. Coloração com o corante Giemsa

Os primeiros estudos relacionados à citogenética de plantas foram restritos à determinação do número e da morfologia cromossômica com o uso de colorações convencionais, por exemplo, o uso do corante Giemsa, embora ainda seja rotineiramente empregado nos laboratórios de citogenética (Guerra, 2000). Além de permitir uma contagem rápida dos cromossomos, a coloração convencional, também permite visualizar e distinguir as regiões mais condensadas/descondensadas da cromatina, facilitando o entendimento dessa estrutura devido à uma maior individualização de cada cromossomo, e dessa maneira, a técnica tem se mostrado valiosa em estudos citogenéticos mais clássicos, ou seja, simples, porém bastante informativos. Por exemplo, Lombello e Forni-Martins (1998) realizaram contagens cromossômicas com montagem de idiograma (representação esquemática do conjunto haploide cromossômico) a partir da coloração convencional em três gêneros pertencentes à família Sapindaceae, entre eles *Serjania* Mill, com números cromossômicos $2n = 12$ e $2n = 22$ observados em 21 espécies. Consideráveis variações no comprimento cromossômico inter e intra-específicas ocorreram em *Serjania*, sugerindo evolução cariotípica decorrente de rearranjos cromossômicos.

No gênero *Urvillea* Kunth variações no número e comprimento cromossômico foram observadas. Além disso, variações interespecíficas também ocorreram na espécie *Urvillea ulmaceae*, que apresentou um grande número de cromossomos pequenos, $2n = 86$. Acredita-se que a origem dessa espécie esteja relacionada à poliploidia seguida de aneuploidia reducional. Melo (2009) encontrou variação no número cromossômico, no tamanho e no nível de ploidia para espécies do gênero *Solanum* L (Solanaceae) utilizando a coloração convencional. Contudo, para as espécies vegetais cujos cromossomos são semelhantes no tamanho e na morfologia, estas análises convencionais não são muito eficientes. Carvalho e Guerra (2002) observaram que as espécies de *Manihot* avaliadas apresentavam um cariótipo semelhante com $2n = 36$, cromossomos pequenos, variando de metacêntrico a submetacêntrico. Informações adicionais para *Manihot* só foram possível com o uso aliado de outras técnicas.

2.4.2. Coloração sequencial com os Fluorocromos CMA/DAPI

A caracterização do conjunto cromossômico de uma espécie é fundamental para a pesquisa citogenética, sendo assim, novas técnicas visando contornar as limitações encontradas na coloração convencional foram desenvolvidas. A introdução das técnicas de bandeamento cromossômico ocorreu por volta de 1970 e possibilitou a exploração de novos enfoques na caracterização cromossômica pela coloração diferencial de determinadas regiões. Baseando-se no padrão de distribuição das bandas foi possível identificar com mais clareza os pares de homólogos (Schwarzacher et al., 1980).

Alguns corantes possuem propriedades fluorescentes específica a determinadas sequências de base nos ácidos nucléicos. Podem ser encontrados fluorocromos com afinidade pelas bases adenina timina (AT), como é o caso do 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), da quinacrina e do Hoechst 33258. E outros que coram as regiões ricas em guanina e citosina (CG), destacando-se a cromomicina A₃ (CMA) e a mitramicina. O DAPI e o CMA são os mais empregados no estudo de cromossomos de plantas (SUMNER, 2003; KIM et al., 2002). Carvalho e Guerra (2002) observaram padrões de bandas semelhantes entre cultivares e espécies de *Manihot* ao utilizarem os corantes CMA/DAPI, sugerindo alta estabilidade cariotípica do gênero. Os mesmos tipos de corantes foram aplicadas em espécies de *Citrus* por Carvalho et al. (2005). Essas espécies foram caracterizadas e diferenciadas através da quantidade de heterocromatina CG ou AT positiva. Embora o gênero apresentasse estabilidade numérica e morfológica ($2n=18$), estudos prévios com bandeamento CMA haviam identificado heterozigose para bandas heterocromáticas. Nesse trabalho, pode-se observar que quatro cultivares de *C. limon* L apreesntou o mesmo padrão de bandas CMA⁺ e

sítios de DNAr, indicando que foram originados a partir de um germoplasma simples e em seguida diferenciadas por mutações somáticas distintas. Já as espécies *C. Jambhiri* Lush, *C. limonia* Osbeck e *C. volkameriana* Ten. & Pasq apresentaram cariótipo similares, e diferiram de *C. limon* pela ausência de apenas uma banda telomérica. Outras espécies como *C.aurantifolia* Swing e *C. limettioides* Tan exibiram maiores diferenças para regiões heterocromáticas. A espécie *C. medica* foi o único acesso homozigoto para bandas heterocromáticas e sítios de DNAr, confirmando hipótese anterior de que as demais espécies seriam híbridos naturais.

No gênero *Solanum*, a distribuição da heterocromatina constitutiva foi avaliada com esses fluorocromos base-específicos em nove espécies, além de oito cultivares de *Solanum lycopersicon* e foi observado que a maior fração de heterocromatina estava associada à região organizadora de nucléolos (RON), com ocorrência de pequenas variações no número e na localização destas bandas (BRASILEIRO-VIDAL, et al., 2009).

2.4.3. FISH – Hibridização *in situ* fluorescente

É uma técnica que possibilita detectar sequências específicas de ácidos nucléicos DNA ou RNA diretamente sobre os cromossomos, organelas ou em tecidos provenientes de cortes anatômicos (LEITCH et al. 1994). Diante da sua alta especificidade e sensibilidade, o uso de FISH tem sido útil para uma visualização precisa dos sítios de DNA ribossomais, sequências teloméricas, centrômeros, detecção de translocações, trissomias, fusões cromossômicas, entre outros.

A HIS (hibridização *in situ*) foi desenvolvida em 1969 por Gall e Pardue para análise cromossômica e tem sido uma das técnicas mais importantes e informativas graças a sua alta especificidade, sendo então empregada nas mais diversas áreas, como na biologia do desenvolvimento, na citotaxonomia, melhoramento genético e citogenética médica. O princípio da técnica consiste no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais por meio de aquecimento podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e em seguida renaturadas, voltando a ser fita dupla. Se no momento da renaturação do DNA houver uma sonda disponível em solução, as sondas competirão com as fitas de DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas ao DNA alvo, ao invés da fita complementar original (GUERRA, 2004).

Sondas são derivadas a partir de fragmentos de DNA ou RNA que foram isolados, purificados e amplificados para uso. Podem ser de sequência única ou repetida. As sequências repetidas podem estar organizadas no cromossomo em *tandem*, ou seja, uma seguida à outra, formando blocos de DNA-alvo, ou podem se encontrar dispersas no complemento

cromossômico, intercaladas com diversos outros tipos de seqüências. As sondas de DNA repetitivo mais utilizadas são os DNAs satélite, o gene que codifica o RNA ribossomal 5S e a seqüência que codifica o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S, amplamente conhecidos como DNAr 5S e 45S, respectivamente (SUMNER, 2003).

2.5.Papel das proteínas histonas na cromatina de plantas

O DNA nuclear em eucariotos está associado com histonas e outras proteínas formando uma estrutura complexa denominada cromatina. O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, formado por um centro proteico em que o DNA enrola-se em, aproximadamente, 1,7 voltas e em torno de 147 pares de bases (pb). O centro é composto por um octâmero contendo duas de cada uma das quatro principais histonas (H2A, H2B, H3, H4), onde as histonas H2A e H2B formam dois dímeros e as histonas H3 e H4 formam um tetrâmero (JIN et al., 2008; KOUZARIDES, 2007).

Em relação à cromatina, o genoma dos eucariotas é organizado em duas regiões distintas, a eucromatina e a heterocromatina, que são caracterizadas por apresentarem diferentes graus de compactação da cromatina e estão relacionadas com o controle da expressão gênica e comportamento dos cromossomos durante a divisão celular (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; FUCHS et al. 2006) .

A heterocromatina representa as regiões cromossômicas que permanecem condensadas durante todo o ciclo celular, podendo ser classificadas em heterocromatina facultativa ou constitutiva. A heterocromatina facultativa ocorre em apenas um dos cromossomos do par, e é ativo em apenas um curto período de tempo do ciclo de vida, se mantendo epigeneticamente reprimido e heterocromático o restante da vida do indivíduo, já a heterocromatina constitutiva ocorre no par de cromossomos homólogos e normalmente é transcricionalmente inativa, constituída por sequencias de DNA altamente repetitivas e com poucos genes. A eucromatina comparada com a heterocromatina é uma região bastante descondensada com presença de genes ativos. Algumas regiões da eucromatina são enriquecidas com certas modificações de histonas, enquanto outras são relativamente desprovidas de modificações. No geral, essas modificações ocorrem em “ilhas”, que tendem a serem regiões de regulação da transcrição ou são regiões de transcrição ativa (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; SUMNER, 2003).

A remodelação da cromatina pode vir a impedir ou facilitar a ligação dos fatores de transcrição aos seus respectivos sítios e, por consequência promover o silenciamento ou a ativação gênica. Desse modo a regulação epigenética refere-se às alterações hereditárias que não estão associadas à sequencias de DNA, mas que podem ser herdadas de uma geração para outra (FUCHS et al, 2006; LEWIN, 2004) . Uma característica marcante das histonas é suas

cadeias de aminoácidos terminais, chamadas de “cauda” N-terminal, com grande número e tipo de modificações pós-traducionais que apresentam. Modificações que também podem ocorrer no núcleo das histonas, porém, em menor frequência devido à restrição estrutural da molécula (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Existem diferentes tipos de alterações encontradas nas histonas, tais como acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação entre outros, e que geralmente estão associados com diferentes funções (CHEN et al., 2010; KOUZARIDES, 2007).

A histona H4K5ac (ac - acetilação) é uma marca universal associada à expressão de genes (revisado por GRUNSTEIN, 1997) e tem sido observada desde mamíferos, aves, insetos e plantas até fungos e protozoários (WATERBORG, 2011). A acetilação da histona H4 também determina a recombinação gênica e está diretamente relacionada à ativação transcricional, sendo por isso fortemente associada à expressão dos genes de DNAr 45S localizado nas RONS (JASENCAKOVA et al., 2001). Híbridos de *Brassica L* (Brassicaceae), por exemplo, apresentaram algumas RONS não ativas que, quando tratadas com agentes hiperacetilantes, foram normalmente ativadas (CHEN e PIKAARD, 1997). Em *Costus* e *Eleutherine* (Iridaceae), a acetilação da H4K5ac foi fortemente relacionada com as regiões de condensação tardia localizadas nas regiões terminais dos cromossomos mitóticos e meióticos (FEITOZA e GUERRA, 2011).

De acordo com Finnegan et al. (2000), a metilação de algumas isoformas da H3K4 potencializa a transcrição, enquanto que a metilação de H3K9, H3K27 e H4K20 marcam a estrutura da cromatina reprimida (ou da repressão gênica). Houben et al. (2006) observaram que a metilação da histona H3K4 citologicamente definida na eucromatina e a metilação da histona H3K9 restrita à heterocromatina tiveram sua distribuição influenciada pelo tamanho genômico. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, com tamanho genômico em torno de ~170Mpb, observou-se que os pontos de metilação da histona H3K9 correspondia a heterocromatina, enquanto que metilação da H3K4 ocorria restrito apenas na eucromatina, associada sempre a atividade transcricional de genes independentemente do tamanho do genoma. Em *Drosophila* e algumas espécies de plantas, de modo semelhante, H3K9me1/me2 e H3K27me1/me2 são enriquecidas nas regiões cromossômicas mais condensadas (FUCHS et al., 2006).

A fosforilação da H3S10f é uma das modificações epigenéticas mais bem estudadas e seu possível papel tem sido investigado desde o protozoário *Tetrahymena thermophila* (WEI et al., 1998) até mamíferos (HENDZEL et al., 1997). Em geral, foi observada uma correlação temporal entre a fosforilação da H3 e os estágios iniciais de condensação da cromatina, embora existam evidências em contrário. Hendzel et al. (1997) foram um dos primeiros

autores a sugerir e demonstrar uma relação espaço-temporal entre a condensação da cromatina e a fosforilação da H3S10 em mitose de mamíferos. Em seu trabalho, ficou demonstrado que a fosforilação mitótica da H3 iniciava aleatoriamente na heterocromatina pericentromérica em células interfásicas em G2. Após o início, a fosforilação da H3 parecia se espalhar por toda a cromatina condensada pouco antes da formação de cromossomos prófásicos.

Dados mais recentes apontam um papel da H3S10f tanto para condensação cromossômica, quanto para coesão entre cromátides-irmãs e expressão gênica (Houben et al., 2007), e acredita-se que de maneira isolada ou em associação com outras modificações de histonas, a H3S10f possa desempenhar vários outros papéis importantes nos núcleos das células.

REFERÊNCIAS

- ALLEM, A. C. *Manihot esculenta* is native of the neotropics. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.71, p.22-24, 1987.
- BAI, K. V.; ASIEDU, R.; DIXON, A. G. O. Cytogenetics of *Manihot* species and interspecific hybrids. **Working Document (CIAT)**, 1992.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARRIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 381-395.2011.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARVALHEIRA, G.; GUERRA, M. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 851-859, 2009.
- CARMO JÚNIOR, J. E.; SODRÉ, R. C.; SILVA, M. J.; SALES, M. F. *Manihot* (Euphorbiaceae ss) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 64, n. 4, p. 727-746, 2014.
- CARNEIRO, D. S.; FRANÇA, F.; CORDEIRO, I. A família Euphorbiaceae na flora de inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n. 1, p. 31-47, 2002.
- CARVALHO, R.; SOARES, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1-3, p. 276-282, 2005.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M.; CARVALHO, P. C. L. Occurrence of spontaneous triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. **Cytologia: international journal of cytology**, v. 64, n. 2, p. 137-140, 1999.
- CARVALHO, P. C. L.; FUKUDA, W. M. G. Estrutura da planta e morfologia. **EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical**. In: Aspectos Socioeconômicos e Agronômicos da Mandioca, 2006, Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, v. 6, p. 126-137.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, v. 136, n. 2, p. 159-168. 2002.
- CHEN, M.; SHAOLEI, L. V.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. **Development Growth & Differentiation**, v.52, n. 6, p. 555-556, 2010.

CHEN, Z. J.; PIKAARD, C. S. Epigenetic silencing of RNAr polymerase I transcription: a role for DNA methylation and histone modification in nucleolar dominance. **Gene & development**, v, 11, n. 16, p. 2124-2136, 1997.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; SILVA, M. J.; SODRÉ, R. C. *Manihot*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17591>>. Acesso em 5 set 2013.

FEITOZA, L.; GUERRA, M. Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. **Genetica**, v. 139, n. 3, p. 305-314. 2011.

FINNEGAN, E. J.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 2, p. 217-223, 2000.

FREITAS, F. O.; MARTINS, P. S. Archaeological material for the study of crop evolution. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 399-402, 2003.

FUCHS, J.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. Chromosomal histone modification patterns: from conservation to diversity. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 4, p. 199-208. 2006.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 63, n. 2, p. 378-383, 1969.

GRUNSTEIN, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, v.389, n. 6649, p. 349-352, 1997.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. **Monocots: Systematics and Evolution**. CSIRO, Melbourne, p. 127-136, 2000.

GUERRA, M. **FISH -Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 176, 2004.

HENDZEL, M. J.; WEI, Y.; MANCINI, M. A.; VAN HOOSER, A.; RANALLI, T.; BRINKLEY, B. R.; BAZETT-JONES, D. P.; ALLIS, C. D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. **Chromosoma**, v. 106, n. 6, p. 348-360, 1997.

HOUBEN, P. H.; DER VAN WEIJDEN, T.; SIJBRANDIJ, J.; GROU, R. P.; WINKENS, R. A. Reasons for ordering spinal x-ray investigations: how they influence general practitioners' management. **Canadian Family Physician**, v. 52, n. 10, p. 1266-1267, 2006.

HOUBEN, A.; DEMIDOV, D.; CARPERTA, A. D.; KARIMI, R.; AGUECI, F.; VLASENKO, L. Phosphorylation of histone H3 in plants a dynamics affair. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression**, v. 1769, n. 5, p. 308-315, 2007.
 JASENCAKOVA, Z.; MEISTER, A.; SCHUBERT, I. Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. **Chromosoma**, v. 110, n. 2, p. 83-92, 2001.

JENNINGS, D. L. Variation in pollen and ovule fertility in varieties of cassava and the effect of interspecific crossing on fertility. **Euphytica**, v. 12, n. 1, p. 69-76, 1963.

JIN, W.; LAMB, J. C.; ZHANG, W.; KOLANO, B.; BIRCHLER, J. A.; JIANG, J. Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. **Chromosome Research**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 1203-1214, 2008.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant Systematics: a phylogenetic approach. **Ecologia mediterranea**, Massachusetts, v. 25, n. 2, p. 215, 1999.

KIM, E. S.; PUNINA, E. O.; RODIONOV, A. V. Chromosome CPD (PI/DAPI) – and CMA/DAPI – banding patterns in *Allium cepa* L. **Russian Journal of Genetics**, v. 38, n. 4, p. 392-398, 2002.

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

LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. **In situ hybridization: a practical guide**. BIOS Scientific Publishers Ltd, 118p, 1994.

LEWIN, B. **Genes VIII**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 1027p, 2004.

LOMBELLO, R. A.; FORNI-MARTINS, E. R. Chromosomal studies and evolution in Sapindaceae. **Caryologia**, v. 51, n. 1, p. 81-93, 1998.

MAGOON, M. L.; KRISHNAN, R.; VIJAYABAI, K. Cytogenetics of the F1 hybrid between cassava and Ceara rubber and its back crosses. **Genetica**, v. 41, n. 1, p. 425-436, 1970.

MELO, C. A. F. **Estudo citogenético e molecular em nove espécies do gênero *Solanum* L. (SOLANACEAE JUSS.)**. 88f. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

NASSAR, N. M. A. Interspecific hybridization between cassava and some *Manihot* species. **Egyptian journal of genetics and cytology**, n. 8, p. 175-179, 1978.

NASSAR, N. M. A.; NASSAR, H. N. M.; CARVALHO, C. G.; VIEIRA, C. Induction of a productive aneuploid in cassava, *Manihot esculenta* Crantz. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 123-125, 1996.

NASSAR, N. M. A. Cytogenetics and Evolution of cassava (*M. esculenta* Crantz). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1003-1014, 2000.

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J. L.; FLEMING, T. H. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). **Journal of Heredity**, v. 93, n. 3, p. 193-200, 2002.

OLIVEIRA, M. M. **Diversidade genética em espécies silvestres e híbridos interespecíficos de *Manihot* (Euphorbiaceae – Magnoliophyta)**. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2011.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: Further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 1, p. 131-142, 2001.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. *Manihot* Manihotoides (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica**. New York: Hafner Press, p. 272, 1973.

SANTOS, G. R.; GALVÃO, V. M. L.; BENKO-ISEPPON, A. M.; ALVES, A. A. C.; CARVALHO, R. Análise citogenética básica em 17 acessos de *Manihot* Mill. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, XIX, 2012, Petrolina. Resumos. Petrolina: **ENGINE**, 2012. http://www.cpatsa.embrapa.br/destaques_imagem/xix-encontro-de-genetica-do-nordeste-engine/.

SCHWARZACHER, T.; AMBROS, P.; SCHWEIZER, D. (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. **Plant Systematics and Evolution**, v. 134, n. 3-4, p. 293-297, 1980.

SOARES, J. G. Cultivo da maniçoba para produção de forragem no semi-árido brasileiro. Comunicado Técnico, Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, (EMBRAPACPATSA), p. 59, 1995.

SOARES, J. G. G.; SALVIANO, L. M. C. Cultivo da maniçoba para produção de forragem no semiárido brasileiro. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA (Instrução técnica, nº. 33), 2000.

SUMNER, A. T. Chromosomes: Organization and Function. **Blackwell**, Publishing Limited, p. 304, 2003.

VALLE, L. T. Utilização de espécies selvagens no melhoramento de mandioca: passado, presente e futuro. **Mejoramento genético de la yuca en las Américas**. Cali: CIAT, p. 163-176, 1991.

WATERBORG, J. H. Plant histone acetylation: in the beginning. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1809, n. 8, p.353-359, 2011.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, n. 81: 3-32. 1994.

WEI, Y.; MIZZEN, C. A.; COOK, R. G.; GOROVSKY, M. A.; ALLIS, C. D. 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**, v. 95, n. 13, p. 7480-7484, 1998.

MANUSCRITO

**Análise citomolecular e estudo dos padrões de
modificações nas histonas H3 e H4 em cromossomos de
espécies de *Manihot* Miller**

A ser enviado para o periódico: **Genet Resour Crop Evol.**

Análise citomolecular e estudo dos padrões de modificações nas histonas H3 e H4 em cromossomos de espécies de *Manihot* Miller

¹Genialdo Ramos dos Santos, Alfredo Augusto Cunha Alves², Margareth Ferreira Sales³,
Lidiane de Lima Feitoza¹ e Reginaldo de Carvalho¹

¹Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia, Programa de pós-graduação em Botânica - UFRPE, Recife, Brasil;

²EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, Bahia, Brasil;

³Departamento de Biologia, Área de Botânica, Programa de pós-graduação em Botânica, UFRPE.

Autor para correspondência: reginaldo.ufrpe@gmail.com

Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Depto. de Biologia/Genética, Dois Irmãos 52171900 - Recife, PE – Brasil.

Resumo

O gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae) possui cerca de 100 espécies, originário do continente americano, distribuiu-se dos Estados Unidos à Argentina. Na região central do Brasil, está localizado o maior centro de diversidade do gênero. As espécies de *Manihot* são tetraplóides com $2n = 36$ e $x = 9$. Este trabalho objetivou analisar o cariótipo das espécies *Manihot esculenta* Crantz, *M. Dichotoma* Ule, *M. Maracasensis* Ule, *M. Elongata* P.Carvalho & M. Martins e *M. glaziovii* Muell, através da análise do padrão de distribuição das histonas modificadas nos resíduos H4K5ac, H3K27me3 e H3S10f, das técnicas de coloração convencional, bandeamento CMA/DAPI e hibridização in situ fluorescente com sondas de DNAr 5S e 45S a fim de identificar polimorfismos cariotípicos, diferentes tipos de cromatina e sua localização, além de parâmetros citogenéticos aplicáveis na citotaxonômia. Foram observados, núcleo interfásico semirreticulado e padrão de condensação profásica proximal, de seis a doze bandas CMA⁺, H4K5ac e H3K27me3 revelou marcação uniforme nos núcleos interfásicos e, nas regiões terminais dos cromossomos prometafásicos e metafásicos. H3S10f marcou na região pericentromérica de todos os cromossomos. A FISH revelou seis sítios de DNAr 45S, coincidindo com as bandas CMA⁺. Contudo, *M. dichotoma* apresentou sete sítios de DNAr 45S. Para o DNAr 5S observou-se dois sítios subterminais em todas as espécies. Analisando os resultados comparativamente, este trabalho trouxe como contribuição o entendimento dos cariótipos e dos processos celulares em relação aos tipos de cromatina, estabilidade cariotípica, polimorfismos cromossômicos, eventos carioevolutivos, permitindo fornecer informações adicionais para *Manihot* úteis do ponto de vista citotaxonômico.

Palavras-chaves: Bandeamento cromossômico, Epigenética, FISH, H4K5ac, H3K27me3 e H3S10f, *Manihot*.

Introdução

O gênero *Manihot* Miller (Euphorbiaceae, Crotonoideae) possui 98 espécies distribuídas em 19 seções, das quais 13 ocorrem no Brasil (Rogers e Appan 1973). Suas espécies variam quanto ao padrão de crescimento, ocorrendo como ervas, arbustos e árvores e tem como característica principal a presença de látex. Possuem uma grande plasticidade morfológica o que influencia as características fenotípicas modificando o hábito de crescimento dependendo do tipo de solo e da vegetação do entorno, dificultando a taxonomia do gênero (Soares 1995; Nassar 2000).

As espécies de *Manihot* têm sido pouco estudadas citogeneticamente, sendo que seus principais trabalhos se restringem à contagem cromossômica (Carvalho et al. 1999; Carvalho et al. 2009). Todos esses estudos revelaram estabilidade cariotípica com $2n = 36$ cromossomos pequenos e muito similares morfológicamente e padrão de condensação proximal. Trabalhos mais informativos como, por exemplo, Carvalho e Guerra (2002), revelaram seis a oito bandas CMA^+ , seis sítios de DNAr 45S e dois sítios de DNAr 5S. Embora nenhuma espécie com $2n = 18$ tenha sido encontrada, análises comparativas em outros gêneros da família Euphorbiaceae sugerem que o gênero *Manihot* seja poliplóide a partir de um número básico $x = 9$ (Adams e Wendel 2005; Udall e Wendel, 2006).

Em geral, os cromossomos de *Manihot* apresentam condensação profásica proximal, com presença de cromatina precocemente condensada próxima ao centrômero e cromatina tardiamente condensada na região terminal. Adicionalmente, nem todos os cromossomos apresentam sincronização no tempo de condensação da cromatina entre os braços, ou seja, enquanto um dos braços se apresentava completamente condensado, o outro ainda estava descondensado. A heterocromatina é caracterizada em geral pela presença de blocos corados positivamente com cromomicina A3 (bandas CMA^+), frequentemente localizados nas regiões terminais e co-localizados com os blocos de heterocromatina constitutiva como descrito por Carvalho e Guerra (2002) e fracamente proximal em algumas espécies, como no caso de *M. dichotoma* e *M. maracasensis*. Sabe-se que o fluorocromo CMA tem alta afinidade por regiões de DNA ricas em guanina e citosina, e conseqüentemente emite brilho a heterocromatina rica nessa composição de sequência de DNA. Em adição à heterocromatina localizada terminalmente, existem também pequenas bandas de CMA^+ proximais que são observadas em alguns cromossomos, mas coradas menos fortemente nesse tipo de cromatina.

Os diferentes níveis de organização da cromatina nos cromossomos são dependentes da dinâmica estrutural dos nucleossomos, que representam a unidade de repetição básica da cromatina. Um nucleossomo consiste de 146 pb de DNA girando duas voltas quase completas em torno de um octâmero de histonas. As histonas, por sua vez, são proteínas básicas que

apresentam um domínio globular e uma cauda N terminal sujeita a um conjunto de modificações pós-síntese incluindo acetilação, metilação e ubiquitinação das lisinas (K), fosforilação dos resíduos de serinas (S) e treoninas (T), dentre muitos outros, que alteram o estado de compactação da cromatina ou se associam a outros eventos celulares importantes (revisado por Jenuwein e Allis, 2001; Fuchs e Shubert, 2010).

Atualmente, sabe-se mais claramente que as modificações de histonas medeiam a regulação epigenética da expressão ou silenciamento gênico, crescimento e desenvolvimento em plantas e animais (Berger 2007; Li et al. 2007; Zhang 2008). Algumas modificações como a acetilação das histonas H3 e H4 e a trimetilação da lisina 4 da H3 (H3K4me3) são conhecidas como marcas eucromáticas e são associadas, em geral, com a ativação da transcrição, enquanto outras modificações como a metilação da H3K9 e H3K27 são conhecidas como marcas heterocromáticas e relacionadas a repressão gênica (Jenuwein e Allis 2001; Li et al. 2007). Embora a metilação da histona H3 nas lisinas 4 - 9 e 27 (trimetilada) sejam consideradas como marcas típicas para eu- e heterocromatina, respectivamente, seus padrões de distribuição cromossômica e nuclear não são conservados e variam entre espécies (Fuchs et al. 2006; Fuchs e Schubert 2008). Por outro lado, a acetilação da histona H4 na lisina 5 (H4K5ac) ocorrendo de maneira geral nos domínios de eucromatina parece mais conservada nos diferentes organismos e em plantas, seu padrão de distribuição cromossômica parece guardar uma relação com o tipo de organização do genoma.

No presente estudo foi analisada a distribuição de alguns anticorpos contra histonas modificadas, H3K27me2, H4K5ac e H3S10f em cromossomos mitóticos, visando caracterizar os diferentes tipos de cromatina (eucromatina condensada precocemente, eucromatina tardiamente condensada e heterocromatina) e a região pericentromérica de algumas espécies do gênero *Manihot*. A coloração convencional foi empregada para contagem cromossômica e visualização do padrão de condensação profásico. A coloração CMA/DAPI foi útil para localizar a heterocromatina e definir sua constituição. Hibridizações com sondas de DNAr 5S e 45S foram usadas para localizar os seus respectivos sítios e associar aos blocos de CMA⁺ assim como aos padrões de imunocoloração de histonas quando possível.

Material e Métodos

Foram analisadas as espécies *Manihot esculenta* (var. Cruvela e var. Mandiocaba), *M. dichotoma*, *M. maracasensis*, *M. elongata* e *M. glaziovii*, provenientes da EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical. As espécies foram cultivadas em vasos na casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Coloração convencional

Para a coloração convencional foram utilizadas raízes jovens pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína por 4 horas a temperatura ambiente, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por um período de 24 horas, e estocadas no freezer até posterior análise. Para coloração convencional, as lâminas foram preparadas pela técnica do esmagamento em uma gota de ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula e coradas com Giemsa 2% (Guerra e Souza 2002).

Coloração com fluorocromos CMA/DAPI

Para a coloração com fluorocromos foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros (1994). As raízes foram digeridas por 2 horas em uma solução de celulase (2%) e pectinase (20%) a 37°C e, posteriormente, esmagadas em ácido acético a 45%. As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com CMA a 0,5 mg/mL, por 60 minutos e novamente coradas com DAPI 2 g/ml por 30 minutos e, finalmente, montadas em tampão McIlvaine-glicerol 1:1 (v/v).

FISH

Para localizar os sítios de DNAr por FISH, o clone (D2) contendo um fragmento de 500 pb proveniente da região do DNAr 5S de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Fabaceae) (Pedrosa et al. 2002), e o clone (R2), um fragmento de 6,5 kb correspondente ao DNAr 18S-5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al.1997) foram marcados com Cy3-dUTP (Amersham) e utilizados como sondas. O protocolo de FISH foi realizado como descrito por Pedrosa et al. (2002).

Imunocoloração

A técnica de imunocoloração seguiu o protocolo descrito por Feitoza e Guerra (2011). Raízes fixadas em paraformaldeído foram lavadas em 1x PBS por 10 min cada e digeridas em solução enzimática contendo 2% celulase Onozuka R-10 (Serva) - 20% pectinase (Sigma) a 37°C por duas horas. As lâminas foram incubadas em BSA 3% (v/v), contendo 0,1% Triton X-100 em PBS por 10 min, e em seguida foram adicionados 15 µl de anticorpo primário. Os anticorpos anti-H4K5ac, anti-H3K27me3 e anti-H3S10f foram diluídos 1:300 (coelho policlonal IgG – Upstate Biotechnology, USA) em 1× PBS contendo BSA 3% e incubados *overnight* a 4°C. Para detecção do anticorpo primário foram adicionados 15 µl do anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG conjugado com FITC (Sigma), diluído 1:60 no bloqueador,

por 3 horas à temperatura ambiente. As preparações foram montadas em DAPI (2µg/mL): Vectashield (1:1, v/v).

Fotodocumentação

As melhores células foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica DM 2500 equipado com câmera digital DFC 345FX utilizando-se para processamento das imagens o software CW 4000. As imagens foram editadas no software Adobe Photoshop CS3 para brilho e contraste apenas.

Resultados

Todas as espécies analisadas apresentaram $2n = 36$ cromossomos pequenos e muitos similares morfológicamente, variando de metacêntricos a submetacêntricos (Fig. 1a e 3a). O tamanho cromossômico variou de 1,22 a 2,63µm correspondendo aos resultados publicados previamente para outras espécies do gênero (Carvalho e Guerra, 2002). Os núcleos interfásicos foram do tipo semi-reticulado. Na coloração convencional com Giemsa foi observado em prófase e prometáfase que os cromossomos apresentaram vários blocos de cromatina condensada proximal correspondendo, possivelmente, aos cromocentros visualizados nos núcleos interfásicos (Figura 1a).

A coloração com os fluorocromos CMA e DAPI revelou para a maioria das espécies seis blocos de CMA⁺ na região terminal dos cromossomos, correspondendo às mesmas regiões organizadoras do nucléolo (RONs) como observado para *Manihot esculenta*, *M. glaziovii* e *M. elongata* (Fig. 1 e 4). Por outro lado, em *M. maracasensis* e *M. dichotoma*, o bandejamento CMA/DAPI revelou doze bandas de CMA⁺ nas regiões terminais, além de algumas bandas menores que foram mais fracamente coradas na região proximal (Fig. 3b e 6a).

A hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNAr 5S e 45S mostrou em geral marcações similares. *Manihot esculenta* e *M. maracasensis* apresentaram um único sítio de DNAr 5S localizado na região terminal de um par cromossômico (Fig. 2b, 3c e 6b). Por outro lado, sondas de DNAr 45S mostraram seis sítios em todas as espécies analisadas, mas com exceção de *M. dichotoma*, que foram observados sete sítios de DNAr 45S (Fig. 3d). Os sítios foram localizados nas regiões subterminais nos cromossomos metacêntricos.

De uma forma geral, observou-se que os cromocentros não foram marcados com H4K5ac e H3K27me3, marcando apenas a cromatina difusa que corresponde à eucromatina terminal dos cromossomos (Fig. 1d, e). Em *Manihot esculenta* e na sua variedade “mandiocaba”, entretanto, sempre houve a presença de dois blocos próximos a região

nucleolar fortemente marcados com H3K27me3 (Fig. 1d, 2c). Nos cromossomos profásicos e metafásicos foi possível observar que a H4K5ac e a H3K27me3 marcaram fortemente nas regiões terminais de quase todos os cromossomos e em ambos os braços, sendo alguns cromossomos marcados na região terminal de apenas um dos braços (Fig. 1c, 2d, 3e, 6d). Entretanto, a marcação com H3K27me3 evidenciou um brilho levemente mais forte nas regiões terminais (Fig. 1d, 2e), além de que um ou dois cromossomos sempre apresentaram uma faixa mais intensamente marcada que as demais regiões dos cromossomos e que parece coincidir com pelo menos um dos sítios de DNAr 45S.

A fosforilação da H3S10, uma marca associada à condensação cromossômica na mitose ou coesão entre-cromátides na meiose de plantas, ocorreu fortemente na região pericentromérica de todos os cromossomos das espécies e variedades de *Manihot* em mitose (Fig. 2f, 3f, 6e). No geral, a marcação iniciou na prófase e intensificou-se na metáfase. Na anáfase e na telófase o brilho reduziu drasticamente e os núcleos interfásicos não foram marcados.

Discussão

Todas as espécies apresentaram $2n = 36$ cromossomos e cariótipos simétricos apresentando tamanho cromossômico pequeno. Esse mesmo número já havia sido relatado por outros autores para diversas espécies de *Manihot* (Abraham 1944; Da Cruz 1968; Magoon et al. 1969; Nassar 1978; Bai et al. 1992; Carvalho e Guerra 2002). Contudo, um estudo anterior revelou que a *Manihot esculenta*, ‘Manipeba’, apresentou $2n = 54$, sendo considerado um triploide espontâneo (Carvalho et al. 1999). Além desse relato, outros dois poliplóides naturais de mandioca também foram determinados com $2n = 54$ e triploidia espontânea (Sardos et al. 2009).

O padrão de condensação variável ou assincronico para alguns pares cromossômicos do cariótipo no qual um dos braços se condensa mais rapidamente, enquanto o outro permanece quase totalmente distendido, sugere que espécies e variedades de *Manihot* apresentam diferentes tipos de cromatina como cromatina de condensação tardia, de condensação precoce e heterocromatina, por exemplo. Padrões similares de condensação aos observados aqui foram registrados para outras espécies vegetais (Brasileiro-Vidal et al. 2009; Marques et al. 2010).

Dados da literatura mostram que a heterocromatina dos cariótipos de *Manihot*, CMA⁺, foi co-localizada com as bandas C e com os sítios de DNAr 45S, observados na região terminal de pelo menos três pares cromossômicos (ver por exemplo, Carvalho e Guerra, 2002). Nossa análise revelou uma correspondência da heterocromatina constitutiva com as bandas CMA⁺,

porém em número maior de regiões que registros anteriores (seis a doze bandas). Similarmente, todas as sondas de DNAr 45S marcaram nas mesmas regiões de CMA⁺. Contudo, as marcas de heterocromatina apresentaram variação entre as espécies sendo consideradas como bons parâmetros citotaxonômicos.

A variação interespecífica do número e posição de sítios de DNAr 45S geralmente é menor entre espécies mais próximas evolutivamente (Adams et al. 2000; Berjano et al. 2009; Ran et al. 2001). Entretanto, espécies com o mesmo número cromossômico, nível de ploidia e padrões de distribuição de sítios de DNAr 45S não são necessariamente mais próximas que espécies que não compartilham estas características (Guerra 2008; Lysak et al. 2006). Duputié et al. (2011) reconstruíram uma relação filogenética entre espécies do gênero *Manihot* usando sequências para dois genes nucleares e uma região do cloroplasto não-codificadora. Neste trabalho *M. dichotoma* e *M. glaziovii* ficaram agrupadas em um mesmo clado com altos valores de suporte estatísticos e que apresentaram sítios de DNAr 45S diferentes, sete e seis, respectivamente. Enquanto que *M. maracasensis* ficou em outro clado distinto e apresentou seis sítios de DNAr 45S.

No presente trabalho, a espécie *Manihot dichotoma* apresentou sete sítios de DNAr 45S diferente dos seis encontrados para as outras espécies e também reportados anteriormente por outros autores. Em *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris* (Fabaceae) estudos mostram que tanto plantas cultivadas como silvestres possuem graus similares de variação do DNA ribossomal (Pedrosa-Harand et al. 2006; Almeida e Pedrosa-Harand 2010).

É sabido que a heterocromatina apresenta replicação tardia na intérfase e compõe grande parte da cromatina que permanece condensada formando os cromocentros que auxiliam na determinação dos tipos de núcleos interfásicos. Em *Manihot*, uma grande parte da cromatina que permanece condensada na interfase é CMA⁺, além de ser composta também pela fração de eucromatina condensada proximal que condensa precocemente após a intérfase.

Com o intuito de entender melhor os processos de compactação cromossômica em relação a atividade ou bloqueio da expressão gênica e os tipos de cromatina no cariótipo de *Manihot* foi aplicado pela primeira vez, anticorpos contra histonas modificadas para marcas de eucromatina transcricionalmente ativa (H4K5ac, H3K27me3), além da H3S10f que permite visualizar o padrão de condensação cromossômica e/ou coesão entre cromátides-irmãs no ciclo mitótico. Histonas acetiladas desempenham um importante papel nos processos celulares, incluindo a replicação e o reparo do DNA, transcrição e recombinação, pelo fato de permitir uma estrutura de cromatina mais descompactada, permitindo fácil acesso aos fatores de transcrição. Por outro lado, alguns aminoácidos de histonas metiladas, incluindo H3K37me3, são em geral associadas à cromatina transcriptionalmente inerte em plantas,

animais e fungos (Schuettengruber et al. 2007; Jamieson et al. 2013). Nas espécies estudadas, as histonas H4K5ac e H3K27me3 foram observadas na eucromatina terminal mais descompactada e de condensação tardia, similar ao observado em algumas plantas como *Silene* (Caryophyllaceae), *Costus spiralis* (Costaceae), *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae) e *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) (Vyskot et al. 1999; Feitoza e Guerra 2011a; Fonsêca et al. 2014) para a marca H4K5ac e em *Plantago ovata* (Plantaginaceae), *Citrus* (Rutaceae), *Zea mays* (Poaceae) e *Arabidopsis* (Brassicaceae) (Fuchs et al. 2006; Shi e Dawe 2006; Dhar et al. 2009; Marques et al. 2011) para H3K27me3. Entretanto, uma marcação adicional das histonas H4K5ac e H3K27me3 na heterocromatina DAPI⁺ de plantas também têm sido relatadas em *Costus* e *Citrus*, respectivamente (Marques et al. 2011; Feitoza e Guerra 2011b).

A marcação cromossômica terminal revelada pela H4K5ac e H3K27me3 em *Manihot* revelou uma correlação positiva na metáfase entre os blocos intensamente marcados e a ausência de heterocromatina. Por outro lado, excetuando-se a heterocromatina funcional das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RON), todas as bandas CMA⁺ parecem apresentar correlação negativa sua presença e a marcação com os dois anticorpos. Em *Citrus*, a marcação da H3K27me3 foi mais dispersa, marcando inclusive blocos de heterocromatina DAPI⁺, mas ausente nos blocos de CMA⁺. Diferentemente, o anticorpo contra H3K27me1 foi fortemente marcado na heterocromatina CMA⁺, inclusive nas RONS (Marques et al. 2011).

As RONS em plantas parecem manter uma dinâmica de modificação de histonas bastante complexa. Algumas plantas parecem não apresentar suas RONS diferencialmente marcadas com alguns anticorpos contra H4K5ac e algumas isoformas anti-H3K27me (Jim et al. 2008; Dhar et al. 2009; Feitoza e Guerra 2011a), enquanto outras como *Vicia faba* (Houben et al. 1996; Belyaev et al. 1997; Jasencakova et al. 2000), cevada (Jasencakova et al. 2001; Wako et al. 2005.) e *Zephyranthes* parecem marcar pelo menos transitoriamente em algumas fases do ciclo celular. Os radicais de lisinas podem aceitar três grupos de metil e podem ser mono-, di- e trimetilados (me, me2 e me3) e evidências recentes sugerem que podem existir diferenças funcionais entre os estados de metilação (Dutnall 2003). Vários trabalhos indicam que as formas mono-, di- e trimetilada da histona H3K27 são em geral, enriquecidas na heterocromatina (Jackson et al. 2004; Lindroth et al. 2004; Mathieu et al. 2005), embora exista uma variação que talvez justifique essas diferenças encontradas a depender do tamanho do genoma e do resíduo modificado (revisado por Houben et al. 2003).

Alguns resíduos de histonas modificadas podem ser percebidos durante todo o ciclo celular, inclusive nos núcleos interfásicos, mostrando uma relação quase sempre direta com a estrutura e compactação da cromatina. Entretanto, algumas modificações de histonas, como a H3S10f e H3Thr11, associadas com condensação cromossômica no ciclo ou na coesão entre

cromátides, aparecem apenas de maneira transitória e quase sempre não são vistas nos núcleos interfásicos ou nas fases mais iniciais da mitose ou da meiose. Nas espécies de *Manihot* analisadas, a H3S10f marcou apenas na região pericentromérica, iniciando na prófase, intensificando-se na metáfase quando os cromossomos foram mais condensados e desaparecendo na telófase. Não foram observados sinais visíveis nos núcleos interfásicos. Os padrões de fosforilação da H3S10 observado em *Manihot* também foram observados em diversas outras espécies e parecem ser bastante conservados (revisado por Houben et al. 2007). A forte associação temporal entre o surgimento de H3S10f e a condensação cromossômica tem levado à suposição de que a fosforilação da histona H3 teria um papel importante na condensação cromossômica (Hendzel et al. 1997; Wei et al. 1998), embora hajam também evidências em contrário (Manzanero et al. 2002). Entretanto, alguns autores sustentam que em plantas, a fosforilação da H3 seria necessária mais para a coesão das cromátides irmãs durante a metáfase I, e para coesão dos pericentrômeros das cromátides irmãs durante a mitose e a metáfase II, do que para a condensação cromossômica (revisado por Houben et al. 2007).

O presente trabalho corroborou a questão da forte estabilidade cariotípica no gênero *Manihot*. Contudo, essa estabilidade cariotípica foi quebrada devido aos polimorfismos relacionados à diferenças na quantidade de heterocromatina revelada pela coloração com cromomicina e ao número de sítios de DNAr 45S que em *M. dichotoma* foi maior que nas demais espécies, resultados até então inéditos para o gênero. Esses polimorfismos devem ter sido causados por eventos de amplificação ou de pareamento desigual das regiões heterocromáticas. Sequências repetitivas em tandem evoluem rapidamente em relação às sequências moderadamente repetitivas e de cópia única, uma vez que estas não estão sujeitas a pressão seletiva ou de conservação evolutiva (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998). As sequências em tandem se localizam preferencialmente nas regiões subterminais e terminais dos cromossomos onde acontece o maior número de recombinações. Genes para resistência em plantas, por exemplo, evoluem rapidamente e se encontram nessas regiões de maior recombinação (Bennetzen 2007). Similarmente, as constricções secundárias, contendo as sequências de DNAr 45S também ocorrem preferencialmente nas regiões terminais (Lima-de-Faria 1976). As sequências de DNA ribossomais podem ainda sofrer alterações por eventos de translocação por pareamento desigual como observado para outras espécies.

Vários autores têm explicado as variações no número, distribuição e tamanho das regiões de DNAr dentro de uma espécie ou entre espécies próximas, porém, evidenciando um papel importante das translocações, dos elementos transponíveis e da recombinação na variação da posição e número de unidades de repetição do DNA ribossomal (Takahashi, 2003;

Raskina et al. 2004a; Raskina et al. 2004b; Eickbush e Eickbush 2007; Kobayashi 2006). Em relação as translocações, sequências próximas ao telômero possuem maior probabilidade de interagir com cromossomos não-homólogos que as sequências centroméricas ou intersticiais (Wendel 2000). Sequências repetitivas são responsáveis em grande parte pela variação no tamanho dos genomas de várias espécies (Meyers et al., 2001). É possível que essas diferenças façam parte de um processo de reestruturação genômica uma vez que as espécies de *Manihot* são consideradas tetraplóides.

Conclusões

O número cromossômico assim como a morfologia cariotípica não apresentaram características cariotípicas favoráveis a citotaxonomia, uma vez que as espécies apresentaram o mesmo número já relatado por outros autores para diversas espécies de *Manihot*.

Os cromossomos de *Manihot* apresentaram padrão de condensação profásico assincrônico entre os braços revelados pela análise combinada das técnicas de Imunocitogenética e Giemsa.

Os cariótipos de *Manihot* são estáveis, havendo poucos polimorfismos cariotípicos referentes à variação no número de regiões CMA⁺ e de sítios de DNAr 45S.

Os polimorfismos observados devem ter sido causados por eventos de amplificação ou de pareamento desigual das regiões heterocromáticas, que não estão sujeitas a pressão seletiva ou de conservação evolutiva, região onde acontece o maior número de recombinações.

Assim sendo, sugere-se que os cariótipos das espécies estudadas têm sofrido alterações estruturais lentas durante a evolução do gênero.

Referências Bibliográficas

- Abraham A (1944). Natural and artificial polyploids in tapioca (*Manihot esculenta* Crantz). Proc. Ind. Sci. Cong. 32: part III
- Adams KL, Wendel J (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. Current Opinion in Plant Biology, pp 135-141
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000) Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). American Journal of Botany, 87:1578-1583
- Almeida C, Pedrosa-Harand A (2010) Contrasting rDNA evolution in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and common bean (*P. vulgaris* L., Fabaceae). Cytogenetic and Genome Research, 132:212-217
- Bai KV, Asiedu R, Dixon AGO (1992) Cytogenetics of *Manihot* species and interspecific hybrids. Working Document (CIAT)
- Belyaev ND, Houben A, Baranczewski P, Schubert I (1997) Histone H4 acetylation in plant heterochromatin is altered during the cell cycle. Chromosoma, 106:193-197
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature, 7143:407-12
- Berjano R, Roa F, Talavera S, Guerra M (2009) Cytotaxonomy of diploid and polyploidy *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. Plant Systematics and evolution, 280:219-227
- Bennetzen JL (2007) Patterns in grass genome evolution. Current opinion in plant biology, 10:176-181
- Brasileiro-Vidal AC, Melo-Oliveira MB, Carvalheira GMG, Guerra M (2009) Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. Micron, 40:851-859
- Carvalho R, Guerra M (2002) Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. Hereditas, 136:159-168
- Carvalho R, Guerra M, Carvalho PCL (1999) Occurrence of Spontaneous Triploidy in *Manihot esculenta* Crantz. Cytologia, The Japan Mendel Society, 64:137-140
- Carvalho R, Silva KVP, Oliveira LF, Alves AAC (2009) Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de *Manihot*. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, Botucatu, SP. Centro de Raízes e Amidos Tropicais (CERAT/UNESP), pp 645-650

- Cruz ND (1968) Citologia no gênero *Manihot* Adans. I. Determinação do número de cromossomas em algumas espécies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 40:91-95
- Dhar MK, Fuchs J, Houben A (2009) Distribution of Eu- and Heterochromatin in *Plantago ovata*. *Cytogenetic and Genome Research*, 125:235-240
- Dupputié A, Salick J, McKey D (2011) Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography*, 38:1033-1043
- Dutnall RN (2003) Cracking the histone code: one, two, three methyls, you're out! *Molecular cell*, 12:3-4
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, 175:477-485
- Feitoza L, Guerra M (2011a) Different types of plant chromatin associated with modified histones H3 and H4 and methylated DNA. *Genetica*, 139:305-314
- Feitoza L, Guerra M (2011b) The centromeric heterochromatin of *Costus spiralis*: poorly methylated and transiently acetylated during meiosis. *Cytogenetic and Genome Research*, 135:160-166
- Fonseca A, Richard MMS, Geffroy V, Pedrosa-Harand A (2014) Epigenetic Analyses and the Distribution of Repetitive DNA and Resistance Genes Reveal the Complexity of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) Heterochromatin. *Cytogenet Genome Res*, pp 1-11
- Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I (2006) Chromosomal histone modification patterns— from conservation to diversity. *Trends in Plant Science*, 11:199-208
- Fuchs J, Jovtchev G, Schubert I (2008) The chromosomal distribution of histone methylation marks in gymnosperms differs from that of angiosperms. *Chromosome Research*, 16:891-898
- Fuchs J, Schubert I (2010) Genome structure and chromosome function. In *Chromosomal distribution and functional interpretation of epigenetic histone marks in plants*. Springer, 4:230-247
- Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, Funpec, pp 132
- Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications. *Cytogenet Genome Research*, 3-4:120
- Guerra M (2012) Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146:703-710

- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106:348-360
- Houben A, Demido VD, Gernand D, Meister A, Leach CR, Schubert I (2003) Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *The Plant Journal*, 33:967-973
- Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Agueci F, Vlasenko L (2007) Phosphorylation of histone H3 in plants a dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1769:308-315
- Jackson J, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, Burgos LP, Singh PB, Cheng X, Schubert I, Jenuwein T, Jacobsen SE (2004) Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, 12:308-315
- Jamieson AM, Paskan L, Yu S, Gamradt P, Homer R, Decker T (2013) Role of Tissue Protection in Lethal Respiratory Viral-Bacterial Coinfection. *Science*, 340:1230-1234
- Jasencakova Z, Meister A, Schubert I (2001) Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma*, 110:83-92
- Jasencakova Z, Meister A, Walter J, Turner BM, Schubert I (2000) Histone H4 Acetylation of Euchromatin and Heterochromatin Is Cell Cycle Dependent and Correlated with Replication Rather Than with Transcription. *The Plant Cell Online*, 12:2087-2100
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science*, 293:1074-1080
- Jin W, Lamb JC, Zhang W, Kolano B, Birchler JA, Jiang J (2008) Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. *Chromosome Research*, 16:1203-1214
- Kobayashi T (2006) Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats: Collaboration of recombination, cohesion, and condensation. *Genes & Genetic Systems*, 81:155-161
- Li H, He Z, Lu G, Lee SC, Alonso J, Ecker JR, Luan S (2007) A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 19:2403-2416
- Lima-de-Faria A (1976) The chromosome field. I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas*, 83:1-22

- Lindroth A, Shultis D, Jasencakova Z, Fuchs J, Johnson L, Schubert D, Patnaik D, Pradhan S, Goodrich J, Schubert I, Jenuwein T, Khorasanizadeh S, Jacoben SE (2004) Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with *CHROMOMETHYLASE 3*, *The EMBO journal*, 23:4286-4296
- Lysak MA, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I (2006) Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103:5224-5229
- Magoon ML, Krishnan R, Bai KV (1969) Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia*, 34:612-626
- Manzanero S, Rutten T, Kotseruba V, Houben A (2002) Alterations in the distribution of histone H3 phosphorylation in mitotic plant chromosomes in response to cold treatment and the protein phosphatase inhibitor cantharidin. *Chromosome Research*, 10:467-476
- Marques A, Roa F, Guerra M (2010) Karyotype differentiation in three species of *Tripogandra* Raf. (Commelinaceae) with different ploidy levels. *Genetics and Molecular Biology*, 33:731-738
- Marques A, Fuchs J, Ma L, Heckmann S, Guerra M, Houben A (2011) Characterization of Eu- and heterochromatin of citrus with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. *Cytogenetic and Genome Research*, 134:72-82
- Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J (2005) Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 CpG methylation in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 24:2782-2791
- Meyers BC, Tingey SV, Morgante M (2001) Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. *Genome Research*, 11:1660-1676
- Nassar NMA (1978) Interspecific hybridization between cassava and some *Manihot* species. *Egyptian journal of genetics and cytology*, 8:175-179
- Nassar NMA (2000) Cytogenetics and evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Genetics and Molecular Biology*, 23:1003-1014
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Genetics*, 161:1661-1672
- Pedrosa-Harand A, De Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:924-933
- Ran Y, Hammett KRW, Murray BG (2001) Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of Botany*, 87:823-830

- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004a) Quantum speciation in *Aegilops*: Molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101:14818-14823
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E (2004b) Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. Chromosome Research, 12:153-161
- Rogers DJ, Appan SG (1973) *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). Flora Neotropica, monograph, Hafner Press, 13:272
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998). Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. Trends in Plant Science, 3:195-199
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax Proteins. Cell 128:735-745
- Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding: stain combinations for specific regions. In: GOSDEN, J. R. (Ed.). Methods in molecular biology: Chromosome analysis protocols, 29:97-112
- Shi J, Dawe RK (2006) Partitioning of the maize epigenome by the number of methyl groups on histone H3 lysines 9 and 27. Genetics, 173:1571-1583
- Soares JG (1995) Cultivo de maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*) para a produção de forragem no semi-árido brasileiro. PE: EMBRAPA-CPATISA, (EMBRAPA-CPATISA), 59:4
- Stebbins, GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison- Wesley, pp 216
- Takahashi C (2003) Physical mapping of rDNA sequences in four karyotypes of *Ranunculus silerifolius* (Ranunculaceae). Journal of plant research, 116:331-336
- Udall JA, Wendel JF (2006) Polyploidy and crop improvement. The Plant Genome, a Supplement to Crop. Science, 46:3-14
- Vyskot B, Siroky J, Hladilova R, Belyaev DN, Turner BM (1999) Euchromatic Domains in Plant Chromosomes as Revealed by H4 Histone Acetylation and Early DNA Replication. Genome, 42:343-350
- Wako T, Youko M, Fukui K (2005) Comprehensive analysis of dynamics of histone H4 acetylation in mitotic barley cells. Genes & Genetic Systems, 80:269-276
- Wanzenböck EM, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA trans-formation associate with the nucleolus and do not require

up-stream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 11:1007-1016

Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD (1998) 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*, 95:7480-7484

Wendel JF (2000) *Genome evolution in polyploids*. *Plant Molecular Evolution*, Springer, 42:225-249

Zhang W, Lee HR, Koo DH, Jiang J (2008) Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize. *The Plant Cell Online*, 20:25-34

Apêncices: Figuras

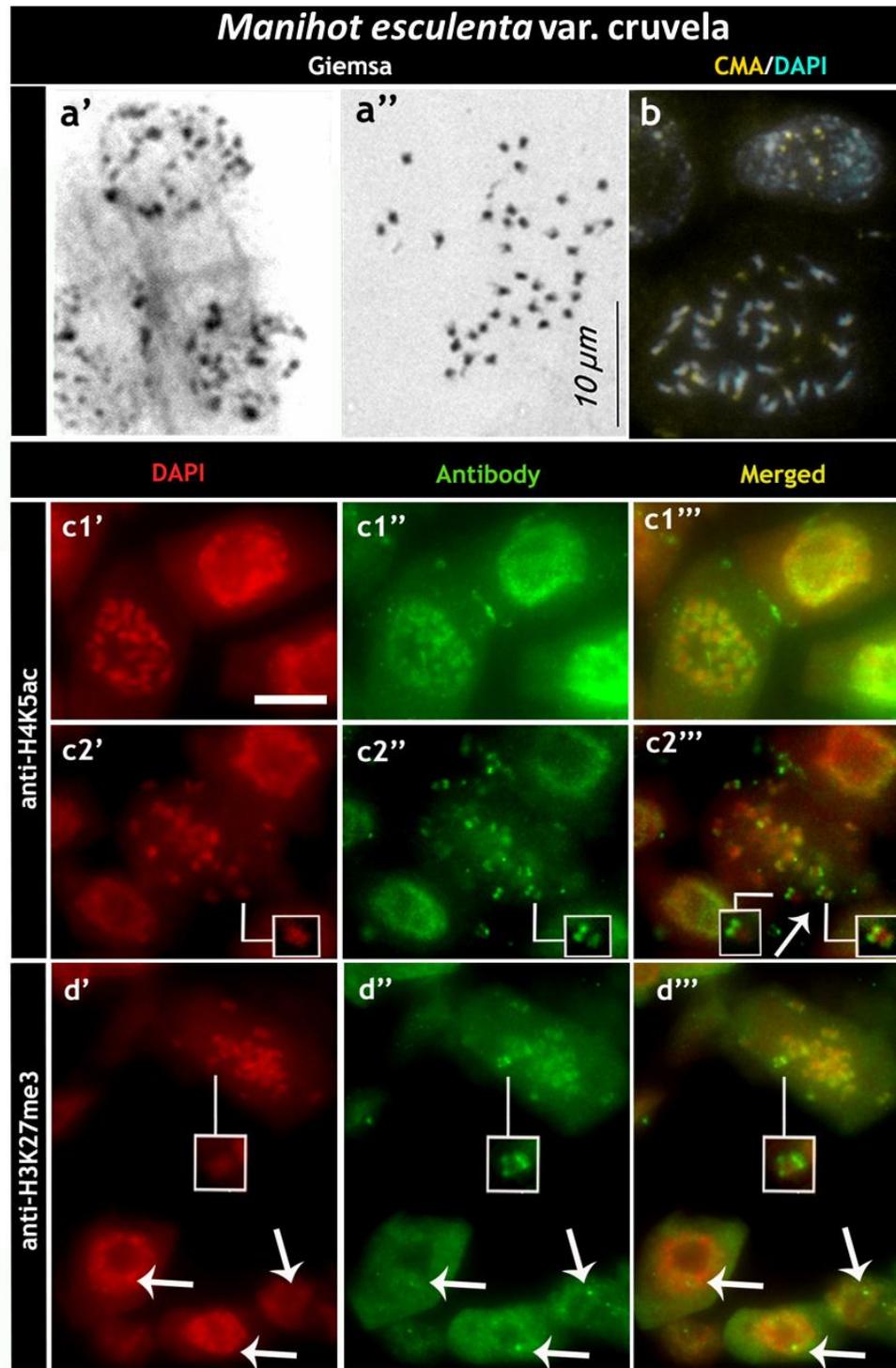


Figura 1 – Células mitóticas de *Manihot esculenta* Crantz var. *cruvela*. a- Padrão de condensação profásico revelado por Giemsa. b- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC. c-d – Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3K27me3 mostrando suas marcações terminais e na cromatina interfásica descondensada. Setas em d evidenciam blocos fortemente marcados com H3K27me3 na periferia do nucléolo. Barra = 10 μ m.

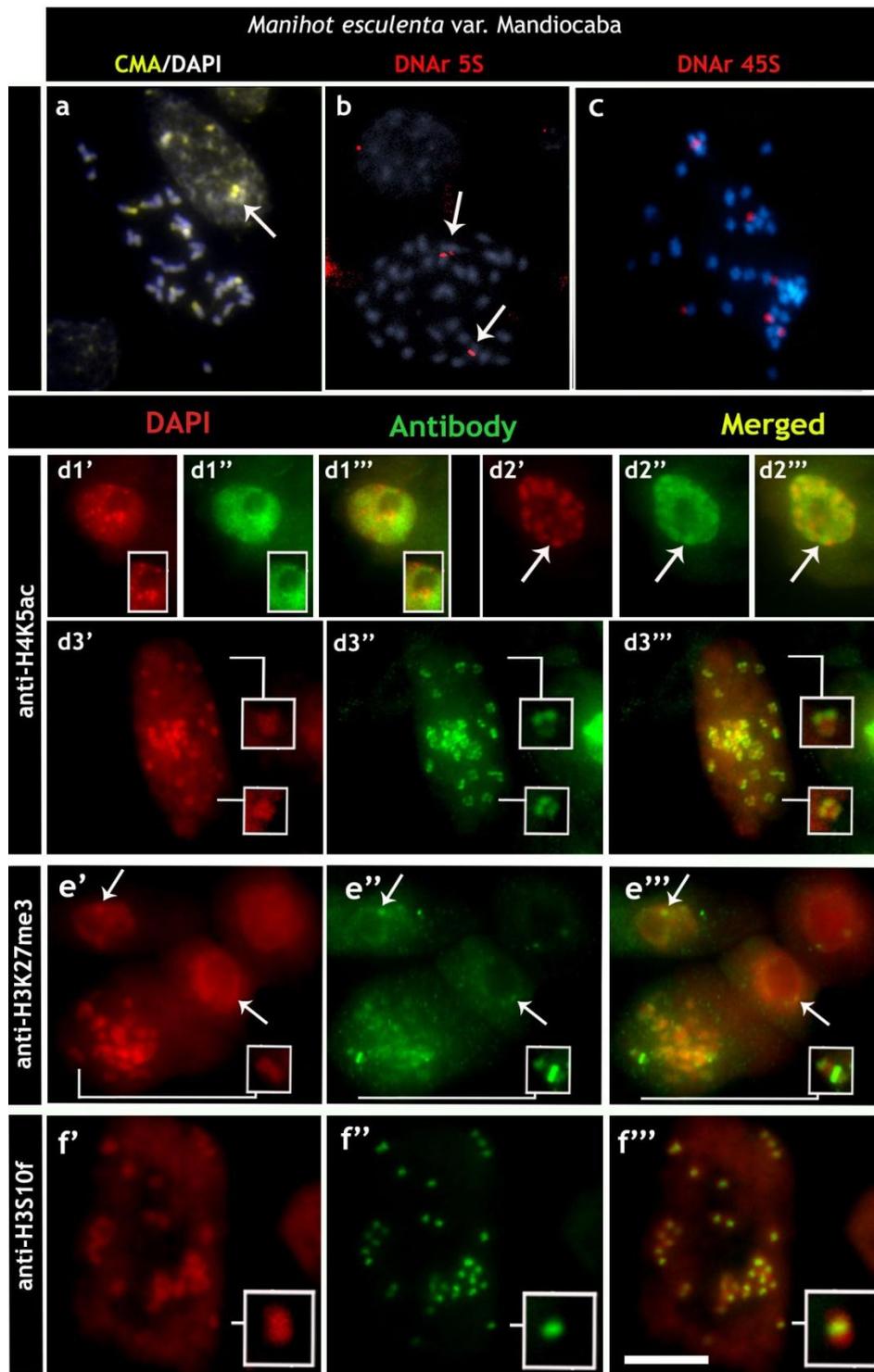


Figura 2 – Células mitóticas de *Manihot esculenta* var. mandiocaba. a- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC. b-c FISH com sondas de DNAr 5S e 45S evidenciando dois e seis blocos, respectivamente. d-e – Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3K27me3 mostrando suas marcações terminais e na cromatina interfásica descensada (d1). f - Imunocoloração com a histona anti-H3S10f mostrando marcação na região pericentromérica em metáfase. Setas em d2 mostram cromatina difusa acetilada na prófase e em “e” evidenciam blocos fortemente marcados com H3K27me3 na periferia do nucléolo. Barra = 10 μm.

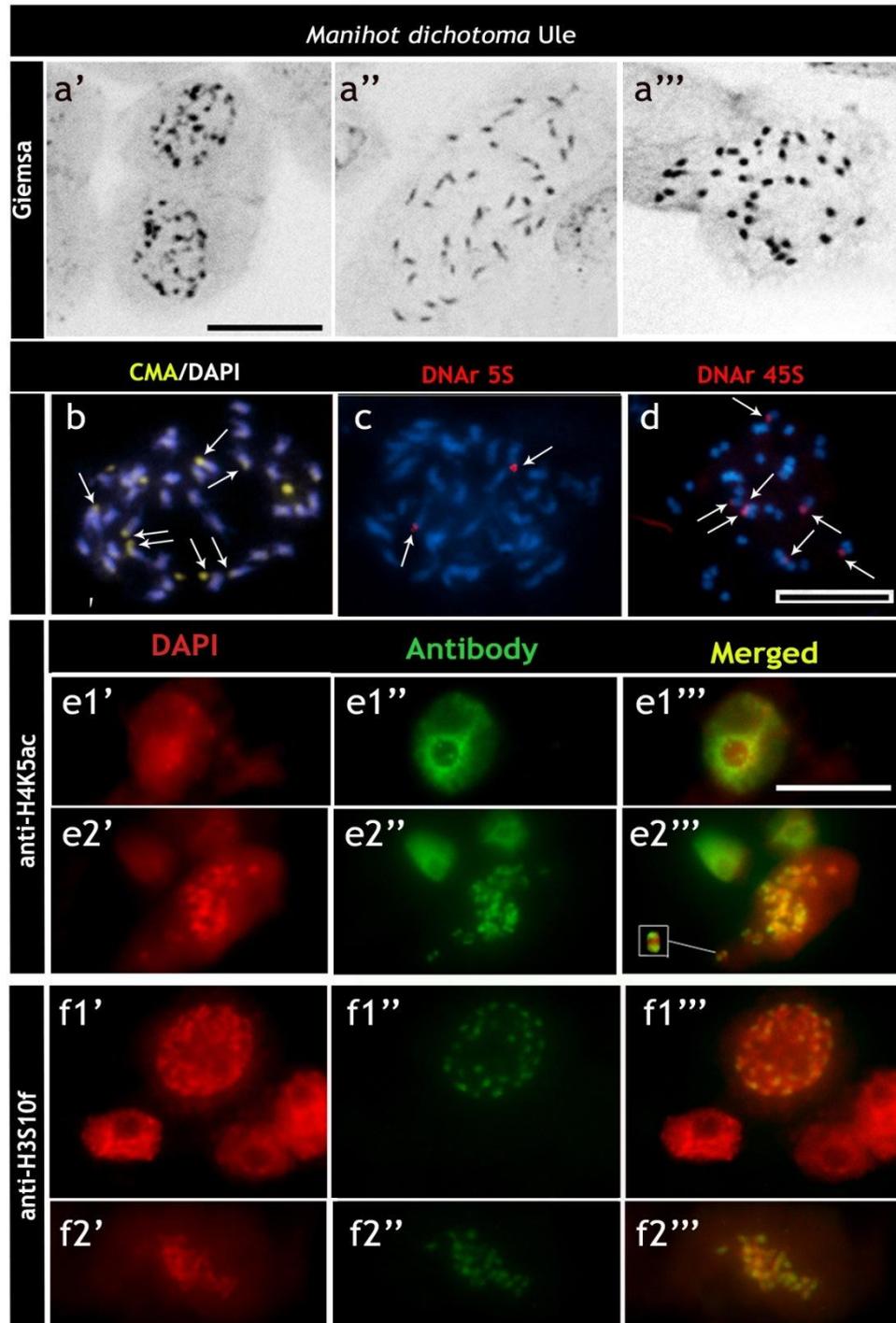


Figura 3 – Células mitóticas de *Manihot dichotoma* Ule. a- Padrão de condensação profásico proximal revelado por Giemsa. b- Coloração com CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC. c-d – FISH com sondas de DNAr 5S e 45S evidenciando dois e seis blocos, respectivamente. e-f - Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3S10f mostrando suas marcações terminais e pericentromérica, respectivamente. Barra = 10 μ m.

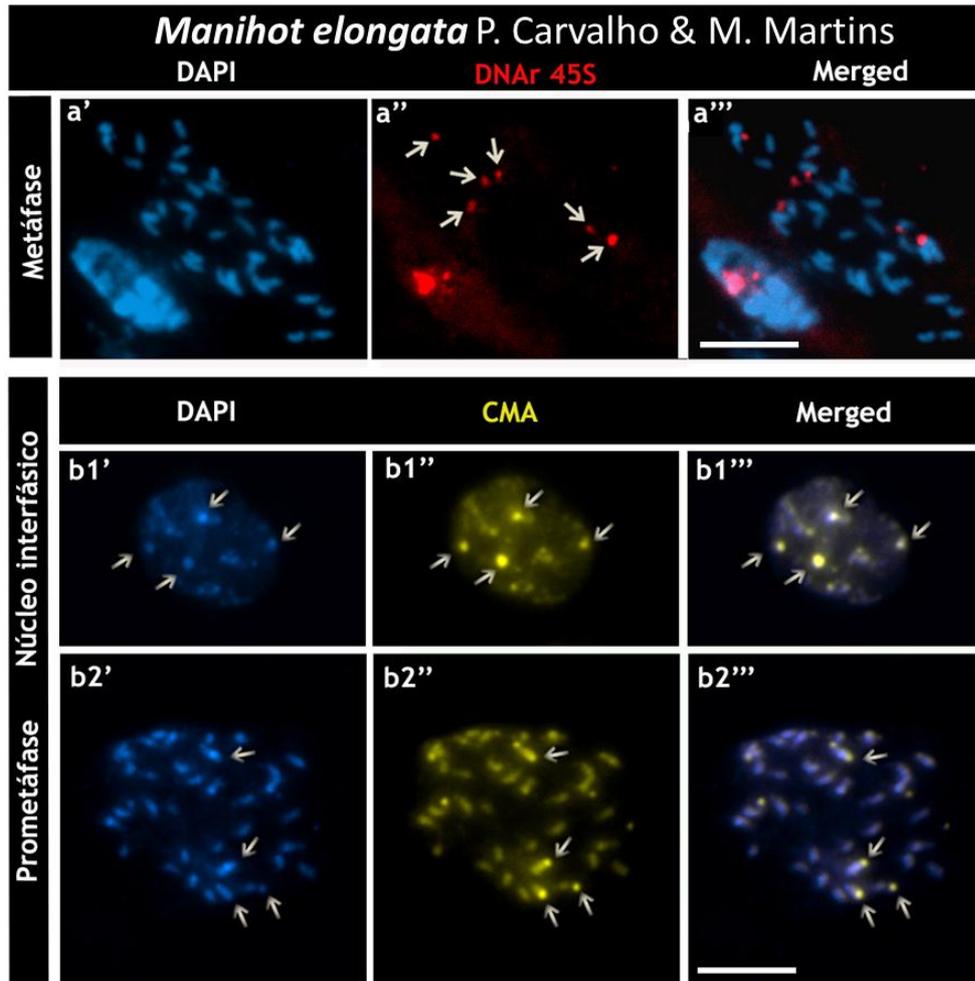


Figura 4– Células mitóticas de *Manihot elongata* P. Carvalho & M. Martins. a- FISH com sondas de DNAr 45S evidenciando seis blocos nas regiões terminais de cromossomos pro- metafásicos. b Coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelando as bandas ricas em GC nos núcleos interfásicos e em prometáfase. Barra = 10 μ m.

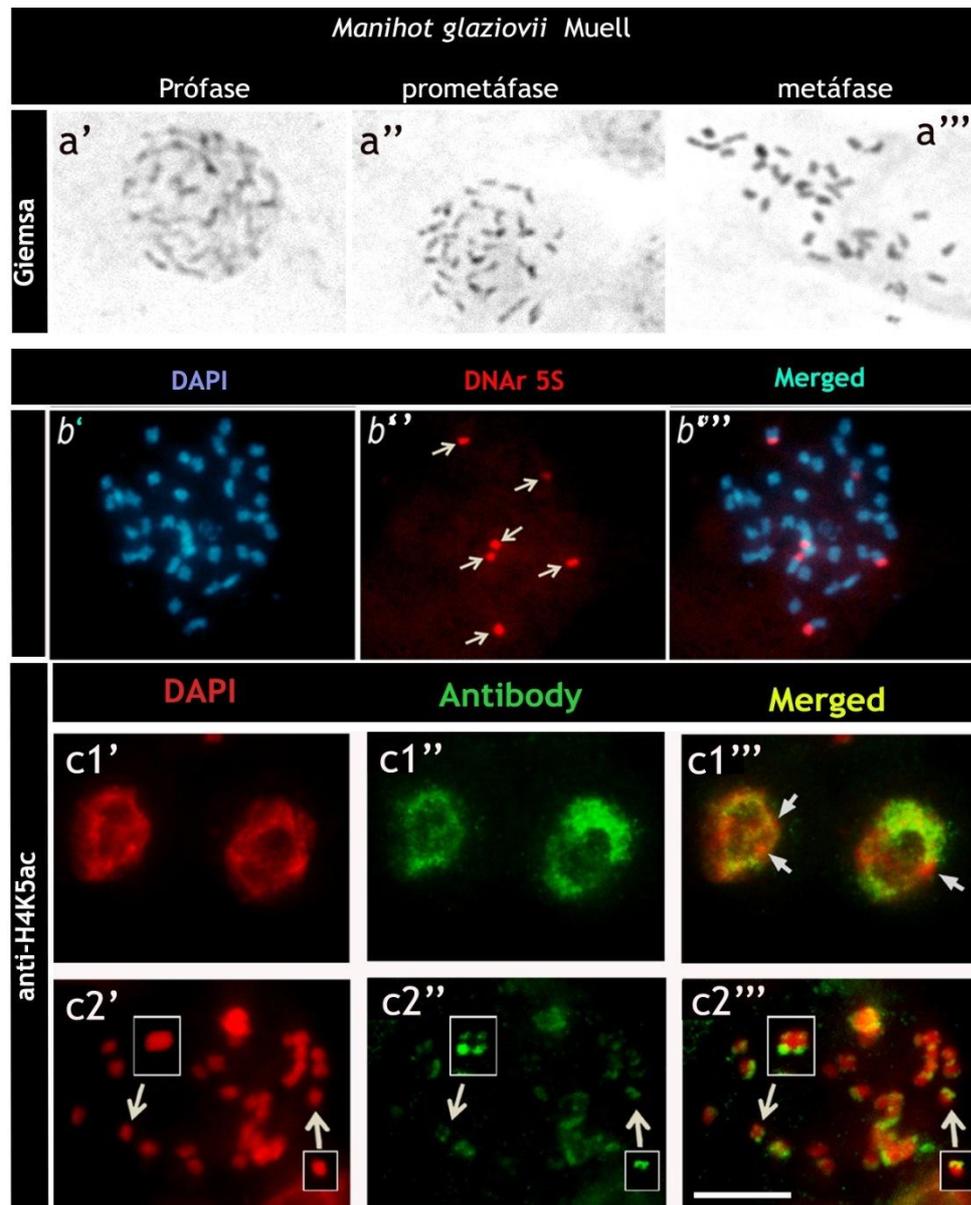


Figura 5 – Células mitóticas de *Manihot glaziovii* Muell. a- Padrão de condensação profásico proximal revelado por Giemsa. b- FISH com sondas de DNAr 45S evidenciando seis blocos terminais (setas). c - Imunocoloração com a histona anti-H4K5ac revelando marcação terminal em ambos os braços ou em apenas um braço (insertos e setas em c2). Em c1''' seta indica cromocentro na periferia do nucléolo hipoacetilado. Observe também a cromatina difusa fortemente hiperacetilada. Barra = 10 μ m.

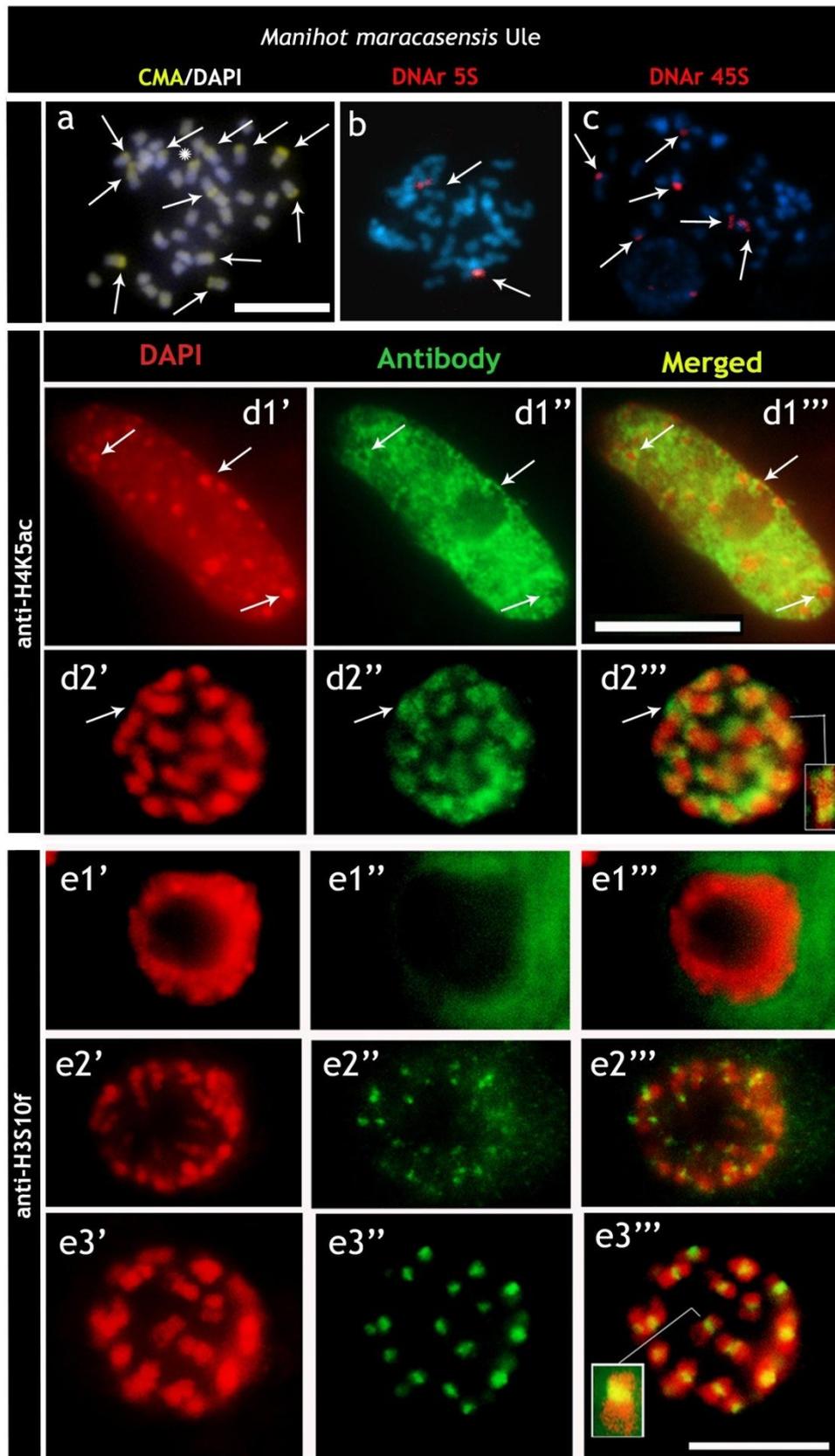


Figura 6 – Células mitóticas de *Manihot maracasensis* Ule. a- Coloração com os fluorocromos CMA/DAPI revelando doze bandas ricas em GC em metáfase. b-c – FISH com sondas de DNAr 5S e 45S evidenciando dois e seis blocos, respectivamente (setas). d-e - Imunocoloração com as histonas anti-H4K5ac e anti-H3S10f mostrando suas marcações terminais e pericentromérica, respectivamente. Em d1''' setas indica cromocentros hipoacetilados, inclusive na periferia do nucléolo que também encontra-se hipoacetilado. Observe também a cromatina difusa fortemente hiperacetilada em d2. Em e3''' inserto mostra marcação apenas pericentromérica. Barra = 10 μ m.

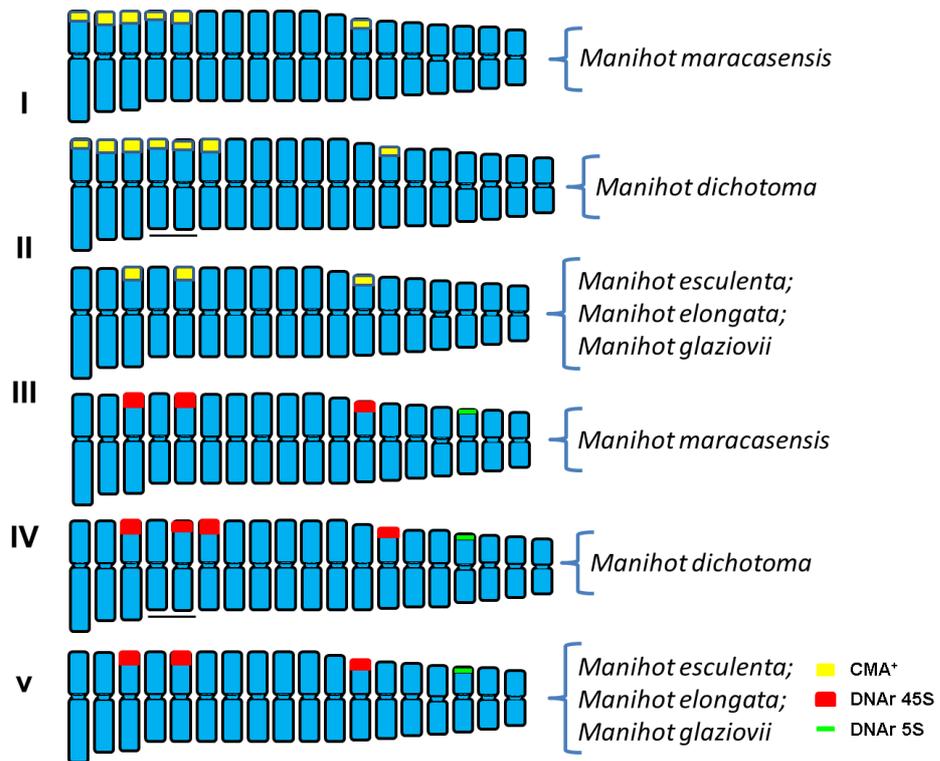


Figura 7 – Ideograma mostrando o número e posição das bandas CMA⁺ (amarelo), DNAr 45S (vermelho), DNAr 5S (verde claro), para cinco espécies do gênero *Manihot*.

Anexos

Normas da revista Genet Resour Crop Evol (Primeira pagina)

Instructions for Authors

Close

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.