

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E DA DINÂMICA EVOLUTIVA DOS CROMOSSOMOS B DE
CENTEIO (*Secale cereale* L.)**

ANDRÉ SECO MARQUES DA SILVA

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E DA DINÂMICA EVOLUTIVA DOS CROMOSSOMOS B DE
CENTEIO (*Secale cereale* L.)**

Dissertação de Mestrado apresentado
por André Seco Marques da Silva ao
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal
da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
como um dos requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração
Florística e Sistemática.

Orientador: Prof.Dr. Marcelo Guerra
Co-orientador: Dr. Andreas Houben
Florística e Sistemática
Citotaxonomia e Citogenética Vegetal

RECIFE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**ANÁLISE ESTRUTURAL E DA DINÂMICA EVOLUTIVA DOS CROMOSSOMOS B DE
CENTEIO (*Secale cereale* L.)**

Data de Aprovação: ____/____/____

Nota: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. MARCELO GUERRA (Orientador)
Departamento de Botânica – UFPE

Prof. Dr. CICERO CARLOS DE SOUZA ALMEIDA
(1º Titular) Campus Arapiraca – UFAL

Prof. Dr. REGINALDO DE CARVALHO (2º Titular)
Departamento de Biologia – UFRPE

Profa. Dra. ANA EMÍLIA BARROS E SILVA (Suplente)
Departamento de Fitotecnia – UFPB

Profa. Dra. ANDREA PEDROSA-HARAND
(Suplente) Departamento de Botânica – UFPE

RECIFE

2012

Dedico este trabalho ao Mestre Gabriel pela Luz na minha Consciência!

Luz, Paz e Amor!

Agradecimentos

Eu agradeço a todos aqueles que me auxiliaram direta e indiretamente na execução deste trabalho, em especial:

Ao Professor Dr. Marcelo Guerra, pela orientação e discussões que enriqueceram grandemente a qualidade técnica do trabalho. Também lhe agradeço por ter me concedido a oportunidade de executar esse trabalho em parceria com Dr. Andreas Houben, o que foi de grande importância para minha formação acadêmica. Finalmente quero expressar meus sentimentos de gratidão por todo esse período de orientação desde os tempos de iniciação científica em 2007 até o presente. Creio que essa orientação foi muito importante para minha formação acadêmica e evolução das minhas qualidades como um aprendiz da Citogenética. Muito grato!

Ao Dr. Andreas Houben pela co-orientação, disponibilização de recursos e espaço para a execução do trabalho. Também lhe agradeço por ser sempre prestativo e confiar em mim para a execução do projeto que veio a resultar neste trabalho.

Aos colaboradores Sonja Klemme e Ali Bonaei pelo auxílio no desenho e execução dos experimentos.

Ao Professor Dr. Katsumasa Niwa por ter gentilmente nos cedido as sementes para a nossa análise.

Ao Dr. Lu Ma por ter gentilmente cedido a sonda telomérica do tipo *Arabidopsis*.

Às técnicas de laboratório Katrin Kumke, Oda Weiß e Karla Meier pelo auxílio na execução de alguns experimentos e na manutenção e reprodução das plantas.

À FACEPE pelo auxílio financeiro a mim concedido durante meu estágio sanduíche no exterior.

Ao IPK-Gatersleben pelo auxílio suplementar a mim concedido durante minha estadia na Alemanha.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

1. APRESENTAÇÃO.....	01
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
2.1. Características gerais dos cromossomos B.....	03
2.2. Distribuição dos cromossomos B em plantas e animais.....	03
2.3. Variações de tamanho.....	04
2.4. Composição de sequências de DNA.....	05
2.5. Análise da estrutura da cromatina baseada em bandamento C.....	05
2.6. A organização da cromatina e modificações pós-traducionais de histonas.....	06
2.7. Modificações pós-traducionais de histonas em cromossomos B.....	07
2.8. Replicação do DNA.....	08
2.9. Mecanismos de herança.....	08
2.9.1. Comportamento mitótico.....	08
2.9.2. Comportamento meiótico.....	09
2.10. Mecanismos de acumulação.....	10
2.11. Origem e evolução.....	12
2.11.1. Origem a partir de cromossomos A.....	12
2.11.2. Origem após hibridação interespecífica entre espécies relacionadas.....	12
2.11.3. Derivados de cromossomos sexuais.....	13
2.12. Polimorfismo estrutural.....	14
2.13. Investigação de atividade transcricional.....	16
2.14. Origem do gênero <i>Secale</i>	18
2.15. Cromossomos B de centeio.....	18
3. OBJETIVO.....	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
5. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO 'Molecular Cytogenetics'.....	30

6. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO 'Chromosome Research'	35
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Materiais e métodos.....	39
Resultados.....	40
Discussão.....	44
Conclusões.....	47
Agradecimentos.....	48
Referências.....	48
Legendas das figuras.....	50
Figuras.....	53
7. RESUMO.....	62
8. ABSTRACT.....	63
9. CONCLUSÕES.....	64

1. APRESENTAÇÃO

Cromossomos B (Bs) são elementos dispensáveis do cariótipo de muitas espécies de plantas, fungos e animais (Jones, 1995). Embora Bs tenham sido intensamente investigados citologicamente desde a sua descoberta há um século (Wilson, 1907b, a), pouco se sabe sobre sua origem, modo de evolução e composição molecular. Segundo a maioria dos autores, Bs são elementos “egoístas” que têm surgido a partir de cromossomos A (As) e mantêm-se através das gerações por mecanismos de acumulação (Jones et al., 2008; Jones, 2012).

Devido à sua situação essencialmente neutra no genoma hospedeiro, espera-se observar polimorfismos estruturais e numéricos dos Bs entre as populações. A origem de variantes estruturais de Bs é geralmente tida como monofilética, em que um único tipo de cromossomo B ancestral acumularia polimorfismos através das gerações dando origem a diferentes tipos (Houben et al., 1999; Muñoz-Pajares et al., 2011). De fato, existem vários casos de polimorfismos numérico ou estrutural de Bs (Bakkali e Camacho, 2004; Lia et al., 2007). Dentre eles, centeio é um excelente material para estudos de polimorfismos do B, por causa de sua ampla distribuição em toda a Europa, Oriente Médio e Ásia (Zohary e Hopf, 2000). O B padrão de centeio é acrocêntrico e menor do que os cromossomos A. Rearranjos estruturais do B de centeio ocorrem em cerca de 2% por geração em cruzamentos experimentais (Jimenez et al., 1995) dando origem principalmente a isocromossomos e Bs deficientes (Jones e Puertas, 1993). Em geral, essas variantes do B de centeio ocorrem como produtos efêmeros e não são mantidos em populações naturais.

O conhecimento da composição molecular do B de centeio se restringia principalmente a duas famílias de sequências altamente repetitivas específicas do B de centeio (D3900 e E1100) mapeadas na região terminal do braço longo (Sandery et al., 1990; Blunden et al., 1993). Afora isso, alguns trabalhos relataram um nível elevado de semelhança geral existente entre os cromossomos A e B de centeio (Wilkes et al., 1995; Houben et al., 1996). No entanto, recentemente Martis et al. (2012a) sequenciaram o cromossomo B de centeio e identificaram uma série de novas sequências particulares do B. Eles observaram que a composição do centrômero dos As é diferente da dos Bs. Além de numerosas sequências comuns a As e Bs, uma grande quantidade de DNA mitocondrial e outras sequências repetitivas de várias cópias são integradas na região proximal e centromérica dos Bs. Além disso, uma grande quantidade de diferentes

sequências de DNA repetitivo foi encontrada mais frequentemente no cromossomo B de centeio. Com base nas sequências marcadoras do B recentemente identificadas por Klemme et al. (em prep.) foi desenvolvido uma série de sondas para FISH permitindo a realização de um extenso mapa citogenético de sequências localizadas no B de centeio. Dessa forma, foi aberto um novo campo para estudos evolutivos, estruturais e funcionais no cromossomo B de centeio.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Características gerais dos cromossomos B

Cromossomos B são cromossomos supernumerários, isto é, que excede o número normal de cromossomos da espécie (cromossomos As) e que apresentam algumas diferenças dos demais cromossomos do cariótipo. As principais características que distinguem cromossomos B dos cromossomos A são: (i) eles são dispensáveis e podem ser presentes ou ausentes em indivíduos de uma mesma população; (ii) eles não pareiam ou recombinaem com nenhum dos membros do conjunto de cromossomos A durante a meiose; (iii) sua herança não segue o modo de segregação Mendeliano (Jones, 2012).

2.2. Distribuição dos cromossomos B em plantas e animais

Investigações mais recentes em 23.652 espécies de angiospermas (que consiste em aproximadamente 9% de um total de 260.000 espécies estimadas para o grupo) revelou que 979 espécies possuíam cromossomos B: sendo 8% monocotiledôneas e 3% dicotiledôneas (Levin et al., 2005). As famílias mais bem caracterizadas quanto à presença ou ausência de Bs são as Asteraceae (270 espécies), as Poaceae (266 espécies) e as Liliaceae (189 espécies). No reino animal, Bs são caracterizados em no mínimo 263 espécies, predominantemente em insetos (Jones e Rees, 1982). O grupo melhor caracterizado são os artrópodes da classe Insecta e ordens Orthoptera (92 espécies), Diptera (42 espécies) e Coleoptera (40 espécies). Em mamíferos, 55 de um total de 4.629 espécies analisadas possuem cromossomos B, sendo a maioria roedores (Vujosevic e Blagojevic, 2004).

O número de cromossomos B dentro da espécie pode variar também entre diferentes populações. Em algumas espécies eles podem variar mesmo entre órgãos diferentes, por exemplo, em *Sorghum stipoides* eles estão ausentes nos ramos e folhas, mas estão presentes em número variável em microsporócitos e células do tapete (Wu, 1992). Ausência de Bs em células de raízes foi determinada em *Erianthus munja* e *E. ravennae* (Sreenivasan, 1981) e *Aegilops speltoides* (Mendelson e Zohary, 1972). Em *Poa alpina* os Bs estão presentes em raízes primárias e ausente nas raízes adventícias (Müntzing e Nygren, 1955). Devido à sua propriedade de ocorrer apenas em alguns indivíduos de uma população, é possível que em algumas espécies os Bs ainda não tenham sido detectados. A distribuição dos Bs entre sexos também difere de espécie para espécie. Normalmente Bs ocorrem em ambos os sexos, no entanto, em algumas espécies

a ocorrência desses cromossomos é mais elevada em um dos sexos. Por exemplo, em *Astyanax scabripinnis* e em *Gastrotheca espeletia* Bs são mais frequentes em fêmeas do que nos machos (Vicente et al., 1996; Schmid et al., 2002). Em algumas espécies os Bs estão presentes apenas em machos, por exemplo, *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Portela-Castro et al., 2000) ou apenas em fêmeas, por exemplo, *Astyanax scabripinnis paranae* (Maistro et al., 1992; Mizoguchi e Martins-Santos, 1997).

Vários fatores parecem estar associados com a distribuição de Bs entre espécies, destacando-se o nível de ploidia, tamanho do genoma, sistema de reprodução e, em alguns mamíferos, a morfologia dos cromossomos A (Palestis et al., 2004a; Palestis et al., 2004b; Trivers et al., 2004; Levin et al., 2005). Esses e outros fatores parecem contribuir independentemente para a ocorrência de Bs. O aumento do tamanho do genoma foi correlacionado positivamente com a ocorrência de Bs em espécies de fanerógamas britânicas (Palestis et al., 2004b; Trivers et al., 2004). Em uma amostra de 226 espécies de plantas os Bs foram predominantemente presentes em espécies auto-incompatíveis do que em espécies auto-compatíveis (Burt e Trivers, 1998). Em mamíferos, observou-se que Bs ocorrem predominantemente em espécies com cromossomos A acrocêntricos (Palestis et al., 2004a). Cultivares de milho silvestres que crescem em grandes altitudes apresentam um maior número de Bs do que aqueles cultivados em altitudes menores (Rosato et al., 1998; Lia et al., 2007). No peixe *Astyanax scabripinnis*, localizados em diferentes altitudes ao longo de um mesmo rio, cromossomos B foram encontrados em populações de maior altitude e estavam ausentes em populações de baixa altitude (Neo et al., 2000).

2.3. Variações de tamanho

O tamanho dos cromossomos B difere de espécie para espécie. Geralmente são menores do que os cromossomos A, exceto em algumas poucas espécies, como por exemplo, nos peixes *Alburnus alburnus* (Ziegler et al., 2003) e *Astyanax scabripinnis paranae* (Maistro et al., 1992). Em algumas espécies existem tipos diferentes de cromossomos B, por exemplo, em *Brachycome dichromosomatica* foram observados cromossomos B grandes e pequenos (Carter e Smith-White, 1972). A rã *Gastrotheca espeletia* possui três tipos de cromossomos B, que diferem entre si em tamanho e morfologia (Schmid et al., 2002). Variações no tamanho de Bs foram encontradas também no gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* (Lopez-Leon et al., 1994).

2.4. Composição de sequências de DNA

As primeiras investigações sobre a composição do DNA dos Bs foram baseadas em gradiente de centrifugação por densidade e cinética de renaturação do DNA. Em centeio, esses experimentos mostraram que a proporção e heterogeneidade de DNA repetitivo dos cromossomos B não diferem das dos As. No entanto, um pequeno aumento no teor de guanina e citosina foi observado no DNA repetitivo de plantas com cromossomos B (Rimpau e Flavell, 1975; Timmis et al., 1975). Posteriormente, Amos e Dover (1981) introduziram a digestão de sítios de restrição de DNA satélite genômico com endonuclease buscando encontrar padrões particulares que caracterizassem cromossomos B. Para localizar fisicamente a distribuição dessas sequências repetitivas em As e Bs foi introduzida a técnica de hibridização *in situ*. Esses estudos mostraram que em muitas espécies os cromossomos B contêm sequências que são originadas de um ou mais cromossomos A (Page et al., 2001; Cheng e Lin, 2003; Bugrov et al., 2007). A maioria sendo sequências repetitivas não-codificantes ou elementos transponíveis como em *Crepis capillaris* (Jamilena et al., 1994; Jamilena et al., 1995), *Prochilodus lineatus* (de Jesus et al., 2003), *Nectria haematococca* (Enkerli et al., 1997), e *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al., 1995). Em milho, a análise revelou muitas sequências altamente repetitivas, incluindo sequências transponíveis, presentes em ambos os cromossomos A e B, mas enriquecidas nos Bs (Alfenito e Birchler, 1993; Stark et al., 1996; Theuri et al., 2005; Lamb et al., 2007a). Apenas algumas poucas sequências são consideradas específicas do B, embora possam também estar presentes em baixa quantidade nos As. Por exemplo: as sequências repetidas em tandem Bd49 do cromossomo B de *Brachycome dichromosomatica* (Franks et al., 1996; Houben et al., 1999), E3900 e D1100 do B de *S. cereale* (Sandery et al., 1990; Blunden et al., 1993; Houben et al., 1996; Langdon et al., 2000), ou o retroelemento específico do B em *Alburnus alburnus* (Schmid et al., 2006).

2.5. Análise da estrutura da cromatina baseada em bandeamento C

Baseado no padrão de bandas C, cerca de 50% dos cromossomos B de espécies vegetais são heterocromáticos (Jones, 1975), enquanto em animais, os Bs são predominantemente heterocromáticos (Jones e Rees, 1982). No entanto, a heterocromatina não parece uma característica imprescindível para os Bs, já que a maioria é composta de ambas eu- e heterocromatina. Em algumas espécies como *Apodemus flavicollis* (Tanic et al., 2005), *Helix pomatia* (Evans, 1960) e *Scilla vvedensky*

(Greilhuber e Speta, 1976) os Bs são predominantemente eucromáticos. Em interfase, Bs de algumas espécies apresentam cromocentros heterocromáticos após bandeamento C ou coloração Feulgen, por exemplo, *Scilla autumnalis* (Ruizrejon et al., 1980), *Picea glauca* (Teoh e Rees, 1977), *Rosa rugosa* (Price et al., 1981), *Tainia laxiflora*, *Puschkinia libanotica* (Barlow e Vosa, 1969).

2.6. A organização da cromatina e modificações pós-traducionais de histonas

A organização do DNA dentro da cromatina regula a expressão e a manutenção (replicação, reparo, recombinação, segregação etc.) da informação genética de uma maneira dinâmica. As histonas são as principais proteínas componentes da cromatina, com cauda N-terminal sujeita a uma variedade de modificações pós-traducionais incluindo metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, ribosilação de ADP e sumoilação (Jenuwein e Allis, 2001) (Figura 1). Tem sido assumido que a combinação entre metilação do DNA e modificações de histonas determina a estrutura da cromatina e sua competência transcricional (Jenuwein e Allis, 2001). Embora as histonas e suas modificações sejam conservadas, vários estudos mostram que a distribuição cromossômica de modificações individuais (acetilação, metilação e fosforilação) pode diferir ao longo do ciclo celular bem como entre grupo de eucariotos (Fuchs et al., 2006; Houben et al., 2007).

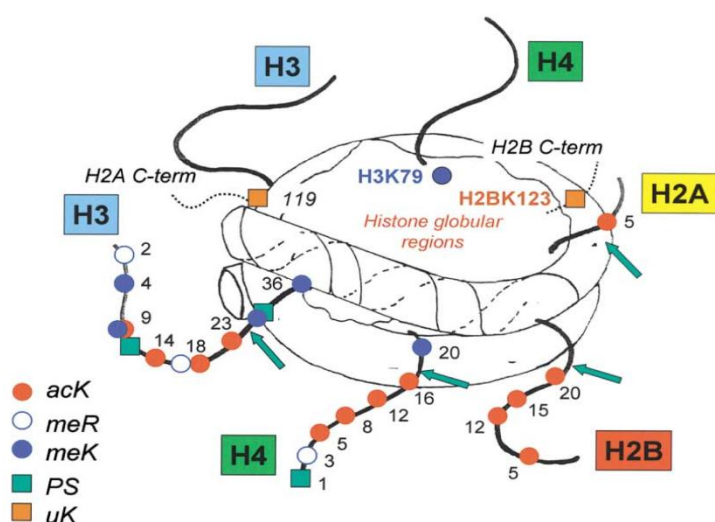


Figura 1. Modificações de histonas na partícula do core nucleossômico. Nucleossomo mostrando seis dos oito domínios de caudas N-terminal e duas caudas C-terminal de histonas. Sítios de modificações pós-traducionais são indicados pelos círculos e

quadrados coloridos que estão definidos na chave (embaixo à esquerda); *acK*, lisina acetilada; *meR*, arginina metilada; *meK*, lisina metilada; *PS*, serina fosforilada; e *uK*, lisina ubiquitinada. Números dos resíduos são mostrados para cada modificação. Note que H3 lisina 9 pode ser tanto acetilada como metilada. Reproduzido de Turner (2002).

A modificação de histonas melhor caracterizada é a metilação. Essa modificação ocorre apenas em alguns resíduos de lisinas (K) e argininas (R) das histonas (Martin e Zhang, 2005). Cada arginina pode ser mono- ou dimetilada e cada lisina pode ser mono-, di- ou trimetilada (Zhang e Reinberg, 2001). Existem seis sítios de metilação de lisinas (K4, K9, K27, K36 e K79) de histona H3. Histona H4 sofre metilação na lisina na posição 20 (K20)(Martin e Zhang, 2005). Metilação de lisinas pode sinalizar tanto ativação ou repressão, dependendo da posição da lisina e do número de grupos metil adicionados. Geralmente é considerado que metilação de H3K4, H3K36 e H3K79 implicam em ativação da transcrição e que metilação de H3K9, H3K27 e H4K20 em repressão da transcrição (Bannister e Kouzarides, 2005). Em plantas, metilação de H3K4me1,2,3 e H3K36me1,2,3 é relacionada com eucromatina. As modificações específicas de heterocromatina H3K9, H3K27 e H4K20 são variáveis entre espécies vegetais. Em contraste, metilação de H3K4 e H3K36 é mais conservada (Fuchs et al., 2006; Marques et al., 2011).

2.7. Modificações pós-traducionais de histonas em cromossomos B

Existem apenas poucas espécies nas quais a modificação pós-traducional de histonas foi caracterizada em cromossomos B. Por exemplo, acetilação de histona (modificação específica para eucromatina em plantas) foi investigada apenas em cromossomos B de *Brachycome dichromosomatica* (Houben et al., 1997). Nesse trabalho, imunocoloração comparativa de cromossomos A e B foi realizada com anticorpos contra H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac e H4K16ac. Cromossomos A foram fortemente marcados, enquanto Bs foram fracamente marcados com H4K5Ac e H4K8Ac. A distribuição de modificações H4K12Ac e H4K16Ac não revelou uma grade diferença entre As e Bs. Histonas fracamente acetiladas indicam baixa atividade transcricional dos Bs em *Brachycome dichromosomatica*. Metilação de histonas foi estudada em algumas espécies com cromossomos B. H3K4me2 mostra distribuição similar em cromossomos A e B de *Crepis capillaris*, *Brachycome dichromosomatica* (exceto para os micro Bs que são menos marcados por essa modificação) e *S. cereale* (Houben et al., 2003). Análises mais

detalhadas em *Brachycome dichromosomatica* revelou um nível muito reduzido de H3K4me2,3, H3K9me3 e H3K27me3 nos cromossomos B grandes e ainda mais nos cromossomos B pequenos em comparação com os As que foram fortemente marcados. A distribuição de modificações específicas de heterocromatina H3K9me1,2 e H3K27me1 revelou padrão similar em ambos cromossomos A e B (Marschner et al., 2007a).

Interessantemente, a região terminal responsável pela não-disjunção do cromossomo B de centeio, caracterizada como banda C positiva, mostrou um enriquecimento simultâneo de H3K4me3/H3K27me2,3, uma combinação atípica de modificações de cromatina aparentemente contrastantes (Carchilan et al., 2007).

2.8. Replicação do DNA

Normalmente a replicação do DNA de cromossomos B é tardia comparado à replicação dos As devido a natureza heterocromática frequente de regiões específicas do B de muitas espécies, como reportado no rato preto *Rattus rattus* (Raman e Sharma, 1974) e na raposa *Vulpes fulvus* (Switonski et al., 1987), no peixe *Astyanax scabripinnis* (Maistro et al., 1992) e no anfíbio *Gastrotheca espeletia* (Schmid et al., 2002), embora isso não seja uma regra geral. Em plantas, é observado um padrão diferente. Em milho, as regiões eucromáticas dos As e do B replicam o DNA simultaneamente, enquanto as regiões heterocromáticas dos As e do B replicam mais tardiamente, com a heterocromatina knob de ambos As e B apresentando a replicação mais tardia (Pryor et al., 1980). Em *Brachycome dichromosomatica* a replicação dos Bs grandes ocorre na fase S tardia (Houben et al., 1997), enquanto que a replicação dos micro Bs, que são heterocromáticos, ocorre durante toda a fase S (Marschner et al., 2007a).

2.9. Mecanismos de herança

2.9.1. Comportamento mitótico

Em plantas, apenas um terço das espécies investigadas apresentam cromossomos B com estabilidade mitótica (Jones e Rees, 1982). Estabilidade nesse contexto significa constância do número de Bs entre células de raízes e de partes aéreas de uma mesma planta. Ausência de Bs em raízes e presença em partes aéreas foi determinada em *Erianthus munjae*, *E. ravennae* (Sreenivasan, 1981) e *Aegilops speltoides* (Mendelson e Zohary, 1972). Em *Poa alpina*, os Bs são presentes em raízes primárias e ausentes em raízes adventícias (Müntzing e Nygren, 1955).

Em algumas espécies a instabilidade dos Bs é parcial e estritamente definida. Por exemplo, em *Sorghum stipoideum*, mosaico de cromossomos B é encontrado em microsporócitos e células do tapete, enquanto estes são totalmente eliminados em folhas e pecíolos (Wu, 1992). Em alguns animais a presença de cromossomos B também exhibe irregularidades. Por exemplo, em gafanhotos, *Locusta migratoria* apresenta inter- e intrafolicular variação numérica (Kayano, 1971) enquanto em *Acris crepitans* o número de Bs difere entre células do testículo (Nur e Nevo, 1969). Em gramíneas Bs são geralmente estáveis. Em *Allium* o B padrão é normalmente estável embora as suas variantes sejam na maioria instáveis (Bougourd e Parker, 1979). Em *Brachycome dichromosomatica* o B grande é mitoticamente estável, enquanto o B pequeno é numericamente variável de célula para célula (Carter e Smith-White, 1972).

2.9.2. Comportamento meiótico

Uma das principais características dos Bs é que eles não pareiam ou recombinaem com nenhum dos membros do conjunto diploide (ou poliploide) dos cromossomos As em meiose, exceto em poucos casos descritos em translocações A/B em centeio (Pohler e Schlegel, 1990) e em milho (Carlson e Roseman, 1992; Auger e Birchler, 2002). Geralmente eles podem parear entre eles mesmos, embora em algumas espécies eles se comportem como univalentes mesmo se mais de um cromossomo B está presente numa mesma célula em divisão. Existem no mínimo 22 espécies descritas nas quais os Bs não pareiam em metáfase I (MI), porém essa irregularidade não acarreta sua eliminação (Jones, 1995). Gillies (1983) caracterizou o pareamento dos Bs usando análise de micrográfica eletrônica de cromossomos meióticos profásicos. Seus resultados confirmaram observações anteriores obtidas por microscopia ótica. Posteriormente, o pareamento de Bs em outras espécies foi caracterizado por microscopia eletrônica, por exemplo, em *Crepis capillaris* (Jones, 1991) e *S. cereale* (Jones e Puertas, 1993). Durante a meiose, em muitas espécies, os Bs apresentam um mecanismo de acumulação como em *Lillium callosum*, onde ocorre uma distorção da segregação na meiose feminina quando há apenas um B, levando à acumulação de Bs na progênie até 80% (Kimura e Kayano, 1961). Dessa forma, a transmissão dos Bs não obedece a segregação Mendeliana.

2.10. Mecanismos de acumulação

Os cromossomos B normalmente são elementos inertes no genoma hospedeiro e tendem a desaparecer desde sua origem, assim para manterem-se durante as gerações estes desenvolvem mecanismos de acumulação que garantem a sua existência devido ao aumento em número. A acumulação de Bs foi investigada em cerca de 70 espécies de plantas, das quais apenas 60% apresentaram um mecanismo de acumulação. Os outros 40% ou não apresentaram acumulação ou os Bs foram perdidos durante as gerações (Jones, 1995). Como exemplo de plantas que não apresentam acumulação de Bs pode ser mencionado *Poa alpina* (Müntzing e Nygren, 1955) e *Allium schoenoprasum* (Bougourd e Parker, 1979). Em animais, nenhum mecanismo de acumulação foi detectado no opilião, *Metagagrella tenuipes* (Gorlov e Tsurusaki, 2000).

A acumulação de Bs acarreta numa herança não-Mendeliana e resulta numa frequência maior na prole do que a esperada. Existem vários mecanismos de acumulação de Bs, que podem ocorrer durante várias etapas do ciclo mitótico (pré- ou pós-meiose) ou meiótico (Jones e Flavell, 1982; Jones, 1991). A acumulação de cromossomos B pode ser classificada como pré-meiótica, meiótica ou pós-meiótica. A acumulação pré-meiótica ocorre quando o acúmulo de Bs é resultado de uma não-disjunção mitótica. Esse mecanismo foi observado em gafanhotos *Calliptamus palaestinensis* (Nur, 1963), *Camnula pelúcida* (Nur e Nevo, 1969) e *Locusta migratoria* (Kayano, 1971). Em plantas esse mecanismo é encontrado em *Crepis capillaris* (Parker et al., 1989) e *Brachycome dichromosomatica* (Carter e Smith-White, 1972).

Acumulação meiótica foi encontrada pela primeira vez em *Lilium callosum* (Kimura e Kayano, 1961). Nessa espécie, foi observado que o número de cromossomos na progênie depende de qual parental possui Bs. Assim, em cruzamentos $0B_{\text{♀}} \times 1B_{\text{♂}}$ a proporção de plantas $0B:1B$ foi 45:54. No cruzamento recíproco $1B_{\text{♀}} \times 0B_{\text{♂}}$ a proporção foi de 16:83. Nesse caso, a acumulação de Bs ocorre na progênie pelo lado feminino. Assim, o mecanismo de acumulação se dá através da passagem de um cromossomo B univalente para uma célula que venha a se tornar um megásporo (Kimura e Kayano, 1961). Em animais, um mecanismo semelhante foi observado no gafanhoto *Myrmeleotetix maculatus* (Hewitt, 1976). O fuso meiótico é assimétrico e os Bs tendem a se localizar principalmente no lado do núcleo que resultará no óvulo e não no do corpo polar. O grau de assimetria se correlaciona com o grau de acumulação do B em fêmeas. Outro exemplo é o caso do inseto *Pseudococcus affinis*, em que o cromossomo B é heterocromático

durante o ciclo celular, exceto em prófase I tardia, quando se torna totalmente eucromático. Os Bs se juntam ao conjunto haplóide maternal e, desta forma, são transmitidos para a progênie de maneira não reduzida (Nur, 1962). Não-disjunção não está envolvida nos mecanismos de acumulação meiótica.

Acumulação pós-meiotica de Bs é a forma mais comum em espécies vegetais (Jones e Flavell, 1982; Jones, 1991). Ela ocorre predominantemente na primeira mitose do grão de pólen através de um processo de não-disjunção e migração preferencial das cromátides-irmãs do B para o núcleo generativo. Em centeio, a não-separação das cromátides-irmãs ocorre em ambas mitoses do grão de pólen e do megásporo. Milho é a única espécie em que a não-disjunção do B ocorre durante a segunda divisão mitótica do grão de pólen. Nesta espécie a acumulação é caracterizada por: a) não-disjunção de cromátides do B, b) fertilização preferencial (70% dos casos), do megásporo pelo núcleo generativo possuindo o B, enquanto o núcleo generativo sem B fertiliza os núcleos polares, e c) a supressão da perda meiótica de Bs univalentes (Carlson e Roseman, 1992; Gonzalez-Sanchez et al., 2003).

Um modo incomum de acumulação foi observado em vespas *Nasoniavi tripennis* e *Trichogramma kaykai* (Werren e Stouthamer, 2003). O cromossomo B paternal de razão sexual (PSR) nestas espécies é transmitido através do esperma, mas após fecundar o óvulo ocorre uma condensação e perda dos cromossomos paternos. Dessa forma, o cromossomo PSR transforma um zigoto diploide (fêmea) em um macho haploide carregando um cromossomo B.

Elementos controladores da acumulação foram identificados apenas em algumas espécies por observações indiretas. Em centeio foi descrito que o bloco heterocromático na extremidade do braço longo do cromossomo B inclui um elemento *trans-acting* que controla a não-disjunção das cromátides-irmãs durante a primeira mitose do grão de pólen e do megásporo. Assim, cromátides-irmãs de um cromossomo B que não possua essa região separam normalmente na primeira mitose do pólen (Müntzing, 1946). No entanto, cromossomos B introduzidos por hibridação e retrocruzamento em trigo exibem as mesmas propriedades de não-disjunção, confirmando que o elemento controlador não é dependente do genótipo (Müntzing, 1970; Endo et al., 2008). Em milho tal elemento foi descrito como o knob heterocromático na extremidade distal do braço longo dos Bs (Carlson, 1978).

2.11. Origem e evolução

Não há explicação definitiva sobre a origem dos cromossomos B, existindo diversas hipóteses (Jones, 1995; Camacho et al., 2000; Berdnikov et al., 2003; Jones e Houben, 2003; Muñoz-Pajares et al., 2011; Martis et al., 2012a). É possível que em diferentes organismos os Bs tenham se originado diferentemente.

2.11.1. Origem a partir de cromossomos A

Em muitas espécies as sequências repetitivas isoladas de cromossomos B mostram uma alta similaridade com sequências presentes nos As, por exemplo, em: *Crepis capilaris* (Jamilena et al., 1994; Jamilena et al., 1995), *Zea mays* (Alfenito e Birchler, 1993; Cheng e Lin, 2003), *Brachycome dichromosomatica* (Leach et al., 1995; Houben et al., 1999; Houben et al., 2001), *S. cereale* (Sandery et al., 1990; Blunden et al., 1993; Houben et al., 1996; Martis et al., 2012a), *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al., 1995). Em *S. cereale* verificou-se por GISH que o cromossomo B inteiro, exceto a região subtelomérica do braço longo hibridizou com o DNA genômico de plantas sem Bs, evidenciando que os Bs de centeio são originados dos cromossomos A (Tsujimoto e Niwa, 1992; Wilkes et al., 1995). Em algumas espécies, uma amplificação rápida de DNA ribossomal (DNAr) desempenha um papel na formação e evolução de Bs, como mostrado em *Rattus rattus* (Stitou et al., 2000), *Trichogramma kaykai* (van Vugt et al., 2005), *Eyprepocnemis plorans* (Lopez-Leon et al., 1994; Muñoz-Pajares et al., 2011). O exemplo mais convincente foi descrito na planta *Plantago lagopus* em que a análise de várias gerações e hibridização *in situ* com sondas de DNAr demonstrou que o B originou-se de uma amplificação massiva de DNAr 5S (Dhar et al., 2002).

2.11.2. Origem após hibridação interespecífica entre espécies relacionadas

Este modo de origem foi proposto pela primeira vez por Battaglia (1964) e posteriormente confirmado por outros autores (McVean, 1995; Camacho et al., 2000). Em híbridos gerados após cruzamentos interespecíficos entre *Coix aquaticus* ($2n = 10$) e *Coix gigantea* ($2n = 20$, aneuploides: $2n = 18$ - nulissômicos, $2n = 24$ – hexassômicos) foram obtidos indivíduos com a seguinte composição de cromossomos de *C. aquaticus* (A) e *C. gigantea* (G): $2n = 14$ (5A + 9G), $2n = 15$ (5A + 10G), $2n = 16$ (5A + 11G). As plantas híbridas foram cultivadas em conjunto com os parentais e resultaram, após polinização aberta, em plantas com $2n = 10$ a $2n = 21$, com um número variável de cromossomos provenientes de *C. gigantea* e *C. aquaticus*. As plantas com $2n = 11$ foram analisadas e

verificou-se uma composição distinta de cromossomos, $2n = 11$ (10A + 1G) ou $2n = 11$ (9A + 2G). Os cromossomos de *C. gigantea* integrados no genoma de *C. aquaticus* mostraram um comportamento semelhante ao de cromossomos B durante a meiose (Sapre e Deshpande, 1987).

No peixe ginogenético *Poecilia formosa*, o início da embriogênese requer esperma dos machos das espécies bissexuais relacionadas *P. mexicana* ou *P. latipinna*. O genoma paterno é posteriormente eliminado no início do desenvolvimento. A progênie resulta em um fenótipo de pigmentação manchada. Análise citológica revelou a ocorrência de microcromossomos supernumerários na progênie de *P. formosa* que apareceram como resultado de uma eliminação incompleta do genoma paterno. Eles são herdados e diferentes números de supernumerários (cromossomos B) resultam em pigmentações variáveis, consequência da atividade do gene paterno localizado nestes cromossomos B (Schartl et al., 1995).

Outro exemplo é o cromossomo B-PSR da vespa *N. vitripennis*. A análise filogenética de sequências de DNA de um retroelemento NATE mostrou alta similaridade com sequências de uma espécie do gênero *Trichomalopsis* (McAllister e Werren, 1997). Cromossomos B também foram detectados em híbridos entre duas linhagens cultivadas de alguns genótipos de *Pennisetum glaucum* (Le Thi et al., 1994).

2.11.3. Derivados de cromossomos sexuais

A similaridade no comportamento meiótico, morfologia, e heteropicnose entre Bs e cromossomos sexuais em algumas espécies sugeriu a origem de Bs a partir de cromossomos sexuais (Amos e Dover, 1981; Jones e Rees, 1982; Green, 1990). A similaridade na composição e localização de duas sondas de DNA (a sequência repetida em tandem de 180 bp e o DNA ribossomal) dos B_2 e do cromossomo X, que são principalmente compostos por essas duas sequências, sugere que o B_2 do gafanhoto *Eyprepocnemis plorans* provavelmente originou-se do cromossomo X (Lopez-Leon et al., 1994; Ruiz-Estevez et al., 2012). Outro exemplo são os cromossomos B da rã *Leiopelma hochstetteri* que ao nível do DNA apresentam similaridade com os cromossomos sexuais W (Sharbel et al., 1998). Similaridades morfológicas também foram observadas entre os Bs univalentes e o cromossomo W (Green et al., 1993). Em espécies de *Glossina* foi reportada uma homologia entre Bs e cromossomos sexuais, sugerindo que o B originou-

se via uma duplicação do cromossomo Y e posterior evolução pela acumulação de DNA repetitivo (Amos e Dover, 1981).

2.12. Polimorfismo estrutural

É esperado que cromossomos B por serem dispensáveis não possuam as mesmas restrições em sua estrutura e organização encontradas nos cromossomos A, e que diferentes formas originadas de mutações cromossômicas ocorram em populações naturais. Jones (1995) reportou que há pelo menos 65 espécies de plantas, nas quais duas ou mais formas de Bs são conhecidas. Em muitos destes casos, pode haver apenas dois tipos, como as formas metacêntricas e telocêntricas em *Aegilops mutica* (Mochizuki, 1960), ou os Bs grandes e pequenos em *Brachycome dichromosomatica* (Smith-White e Carter, 1970). Outras espécies possuem três formas de Bs que podem ser distinguidas pelo tamanho, razão de braços ou bandas C, como em *Allium flavum* (Loidl, 1982).

A origem destes diferentes tipos polimórficos pode muitas vezes ser explicada devido a erros de divisão centromérica, que podem acontecer quando um único B univalente está presente na meiose, originando dois telocêntricos de tamanhos diferentes e, em seguida, suas formas isocromossômicas. Formas adicionais derivadas por deleção de partes dos braços também podem ser formadas. A situação em centeio é um exemplo disso, e foi descrita detalhadamente por Jones e Puertas (1993). Neste caso, como em muitos outros, existe uma forma reconhecível denominada de B padrão, que ocorre predominantemente, e as várias formas derivadas só existem em populações experimentais como produtos efêmeros de eventos mutacionais que as geram (Jimenez et al., 1995). Dessa forma, é surpreendente que centeio, com uma ampla distribuição geográfica (Jones e Puertas, 1993; Zohary e Hopf, 2000), possua uma mesma forma padrão do B em todas as populações. Esta constância ultrapassa até mesmo a fronteira de diferentes subespécies de *Secale cereale*: o mesmo tipo de B é encontrado em centeio cultivado (*S. cereale* subsp. *cereale*) e no centeio silvestre (*S. cereale* subsp. *segetale*) (Akita e Sakamoto, 1982; Niwa e Sakamoto, 1995). Então por que o B de centeio é tão bem conservado ao nível citológico? A análise detalhada de cromossomos B em paquíteno revelou algumas pequenas variações nos padrões de cromômeros em diferentes materiais de centeio (Lima-De-Faria, 1963), mas mesmo assim o nível de conservação é notável. Uma explicação possível é que o B de centeio tem uma organização genética particular necessária para garantir as suas próprias propriedades de transmissão e que pode ser este aspecto, mais do que qualquer função adaptativa em

seu hospedeiro, que restringe a sua variação. No entanto, é curioso o fato de que Bs em algumas espécies são fixados em sua estrutura enquanto que em outras eles são variáveis.

Allium schoenoprasum (cebolinha) é uma espécie que apresenta um elevado grau de polimorfismo para o seu cromossomo B. Bougourd e Parker (1979) descreveram sete formas diferentes do B ocorrendo em diferentes populações. A forma predominante é um B telocêntrico (B^{t-1}). Combinações de vários outros tamanhos de Bs telo- e metacêntricos fizeram um total de 29 cariótipos diferentes de Bs. Os mais elevados níveis de polimorfismos foram encontrados em populações com as maiores frequências de B. Holmes e Bougourd (1989) analisando uma população experimental do mesmo material descreveram, posteriormente, 13 diferentes tipos de B entre os sobreviventes de um experimento de competição densidade-estresse, e relataram que o nível de humidade teve um efeito significativo no aumento da proporção de variantes do B que não correspondiam ao B padrão. Esta observação representa uma importante informação sobre a origem de polimorfismos estruturais dos Bs.

Os Bs no gênero *Aster* possuem o polimorfismo estrutural mais difundido conhecido até o momento. Duas espécies possuem Bs, *Aster ageratoides* e *A. scaba*. *Aster ageratoides* possui Bs em quatro de suas subespécies (ssp. *sugimotoi*, *leiophyllus*, *amplexifolius* e *angustifolius*) e em seis variedades da ssp. *Leiophyllus* (Jones, 1995). Os Bs em espécies de *Aster* são muito grandes e mitoticamente estáveis em cada indivíduo, mas variam muito em comprimento, posição do centrômero e conteúdo de heterocromatina entre os indivíduos. Centenas de populações foram examinadas, incluindo indivíduos de vários níveis de ploidia, todos eles possuindo Bs em altas frequências e com diferentes tipos morfológicos (29 formas polimórficas foram identificadas). Híbridos entre os várias taxa de *A. ageratoides* mostraram que todos os Bs são geneticamente homólogos, e que todas as diferentes variantes surgiram a partir de um mesmo tipo padrão como derivados primários e secundários (Jones, 1995). Uma característica marcante sobre o polimorfismo de Bs nesse grupo é que a forma padrão não é necessariamente a mais frequente e que as diferentes variantes não são efêmeras, como em centeio, mas são estáveis dentro das populações e distribuídos de forma particular em determinadas áreas.

2.13. Investigação de atividade transcricional

Por serem dispensáveis para o desenvolvimento normal dos indivíduos, cromossomos B foram considerados ausentes de função e genes essenciais e, por isso, por muitas décadas eles foram caracterizados como transcricionalmente inativos. Todavia, a atividade transcricional de Bs é de interesse desde que eles foram descobertos (Wilson, 1907b, a).

Fox et al. (1974) foram quem primeiro estudaram o comportamento de transcrição de Bs em espécies de gafanhotos *Myrmeleotettix maculatus* e *Chorthippus parallelus* pelo monitoramento de formação de transcritos de RNA durante diplóteno usando como método de detecção a determinação autorradiográfica de incorporação de uridina [H]. A intensidade de marcação de Bs foi muito baixa indicando pouca ou nenhuma transcrição.

Evidência indireta de transcrição de Bs foi baseada na observação de Bs durante a meiose formando cromossomos plumosos na rã *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988) e na mosca *Simulium juxtacrenobium* (Brockhouse et al., 1989). Cromossomos plumosos são um tipo especial de estrutura cromossômica característica do estágio diplóteno da meiose em oócitos de algumas espécies de animais e que está normalmente associado com atividade transcricional (Chaumeil et al., 2006).

Outras indicações de atividade transcricional de cromossomos B resultam de análises bioquímicas pela comparação da atividade da isoenzima esterase de plantas com e sem Bs em *Scilla autumnalis* (Ruizrejon et al., 1980) e centeio (Bang e Choi, 1990). Em plantas com Bs, uma banda adicional foi determinada por eletroforese de proteínas. Todavia, em ambos os casos é incerto se a banda adicional foi causada por um gene de isoenzima que está localizado nos Bs ou se os Bs influenciam o comportamento de transcrição dos genes localizados nos As.

Foi encontrado no cromossomo B do fungo patogênico *Nectria haematococca* uma família de genes do citocromo P-450 responsável pela desintoxicação da fitoalexina pisatina, um composto antimicrobiano produzido pela ervilha de jardim (*Pisum sativum* L.) (Miao et al., 1991; Han et al., 2001). Este é o melhor exemplo onde uma ligação pode ser feita entre transcrição de genes localizados no B e uma função definida. Elementos localizados no B controlando a patogenicidade do hospedeiro também foram encontrados em outros fungos, e.g. *Alternaria alternata* (Hatta et al., 2002).

Em muitas espécies, cromossomos B contêm regiões organizadoras de nucléolos (RONs) que contêm genes RNA ribossomais (RNAr) (Green, 1990; Jones, 1995). Hibridização *in situ* tem sido usado universalmente para demonstrar a presença ou ausência de sequências de DNAr localizadas em Bs (Maluszynska e Schweizer, 1989; Donald et al., 1995). Todavia, nem todos os loci de RNAr são ativos. Por exemplo, baseado em experimentos de RT-PCR, os genes de RNAr 45S dos cromossomos B grandes de *Brachycome dichromosomatica* foram caracterizados como inativos em tecido foliar (Donald et al., 1995). Evidência indireta de atividade de DNAr pôde ser sugerida pela associação com o nucléolo durante interfase. Micro Bs em *Brachycome dichromosomatica* revelou 70% de não associação com os nucléolos, sugerindo inatividade dos DNAr 45S localizado nos micro Bs (Marschner et al., 2007b). A primeira evidência molecular de atividade gênica ribossomal em cromossomos B de plantas foi encontrada em *Crepis capillaris* em que genes RNAr específicos do B apresentaram baixa transcrição (Leach et al., 2005). Em animais, atividade de DNAr foi demonstrada nos cromossomos B-PSR da vespa parasita *Trichogramma kaykai* (van Vugt et al., 2005). Recentemente, Ruiz-Estevez et al. (2012) demonstraram a presença de transcritos de RNAr específicos do B de *Eyprepocnemis plorans* e marcação do DNAr do B com coloração por prata.

Na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e duas subespécies de guaxinim (*Nyctereutes procyonoides*) um proto-oncogene C-KIT foi identificado e localizado em Bs por hibridização *in situ* (Graphodatsky et al., 2005). Todavia, sua atividade transcricional ainda não foi demonstrada.

Cromossomos B de muitas espécies são compostos por principalmente elementos móveis degenerados, sequências repetidas em tandem e outros DNA não funcionais que são considerados como transcricionalmente silenciados (Alfenito e Birchler, 1993). Todavia, recentemente em milho foi mostrado que partes do Stark B, um elemento transponível específico do B, são transcritas (Lamb et al., 2007b). Os transcritos provenientes de elementos transponíveis estão envolvidos em processos regulatórios como na compactação da cromatina, eles podem ativar genes ou desativar ou serem inseridos no gene durante a transposição.

2.14. Origem do gênero *Secale*

O gênero *Secale* L. (Poaceae) está estreitamente relacionado com o trigo e a cevada pertencente à tribo Triticeae, um dos mais importantes grupos de plantas cultivadas. O centro de origem do gênero é atribuído a região da Turquia, correspondendo ao centro de origem três dos oito centros descritos por Vavilov (Ladizinsky, 1998), e seguindo algumas classificações é composto por três espécies *S. cereale*, *S. striticum* e *S. silvestre* (Frederiksen e Peterson, 1998; Chikmawati et al., 2005), enquanto que por outros autores *S. montanum* e *S. vavilovii* também são reconhecidos como taxa distintos (Khush, 1962). Recentemente, utilizando uma abordagem de relógio molecular pôde se estimar a idade do gênero *Secale* em 1,7 milhões de anos e 0,8 milhões de anos para o clado *S. striticum/S. cereale*, com base em uma filogenia de DNAr datada de Triticeae (Martis et al., 2012a). *Secale cereale* é normalmente dividido em três subespécies *S. cereale* subsp. *cereale* (centeio cultivado), *S. cereale* subsp. *segetale* e *S. cereale* subsp. *ancestrale*, os dois últimos sendo centeio silvestres e de distribuição restrita ao Oriente Médio e oeste asiático. Em contraste, o centeio cultivado possui uma ampla distribuição geográfica devido aos múltiplos eventos de domesticação (Khush, 1962; Zohary e Hopf, 2000). É sugerido que o centeio cultivado tenha sido originado por introgressão de espécies silvestres em *S. vavilovii* (Khush, 1962) e que difere de todas as espécies selvagens por duas translocações recíprocas (Schiemann e Nürnberg-Krüger, 1952; Khush e Stebbins, 1961).

2.15. Cromossomos B de centeio

A presença de cromossomos B em centeio ($2n = 2x = 14$) foi primeiramente reportada por (Gotoh, 1924). O número de Bs por planta variou de zero a oito. O tamanho do B de centeio corresponde aproximadamente à metade de cromossomo A. A presença de Bs no gênero *Secale* está restrita às duas subespécies *S. cereale cereale* e *S. cereale segetale* (Niwa e Sakamoto, 1995, 1996), sendo mais frequente no centeio cultivado (Jones e Puertas, 1993). Cruzamentos entre plantas de *S. cereale* 2B e plantas de *S. segetale* 2B mostraram que os Bs de ambas as subespécies formam bivalentes durante a meiose. Isso demonstra que em ambas as subespécies os Bs são homólogos, e provavelmente têm uma origem única (Niwa e Sakamoto, 1995).

Os Bs de centeio possuem uma ampla distribuição geográfica sendo reportados em várias populações. Foi encontrado pela primeira vez em populações do Japão e,

posteriormente, em quase todas as populações selvagens e semisselvagens da Ásia, Europa e América do Norte. A frequência de plantas com B varia de população para população: as mais elevadas são encontradas em populações do Extremo Oriente na Coreia e no Japão (Jones e Puertas, 1993). Cromossomos B não são encontrados em cultivares melhoradas já que estes influenciam negativamente na fertilidade e, por essa razão, durante a seleção são normalmente eliminados.

Cromossomos B de centeio são mitoticamente estáveis, com um número constante em todas as células somáticas. O comportamento meiótico dos Bs em centeio é marcado pelo fato de que durante a metáfase I eles não pareiam com As, exceto em translocações A/B (Pohler e Schlegel, 1990). Se uma célula possuir somente um B este se comporta como univalente na meiose: muitas vezes se perde durante a divisão. Quando dois Bs estão presentes numa mesma célula, eles normalmente formam um bivalente na metáfase I. Quando mais do que dois Bs estão presentes estes podem formar multivalentes. A frequência de tal emparelhamento é variável, dependendo da linhagem. Por exemplo, nas variedades suecas, Ostgöta e Wasa, bivalentes são predominantes em relação aos multivalentes (Hakansson, 1957), enquanto que na linhagem japonesa JNK a formação de multivalentes é mais frequente (Kishikawa, 1968). A frequência de pareamento entre Bs é muitas vezes determinada pelo genótipo *versus* ambiente, gerando linhagens que possui alta taxa de transmissão (que tendem a acumular o Bs) ou baixa taxa (que tendem a perder o Bs) (Jones e Puertas, 1993).

Como em muitas outras espécies os Bs de centeio têm herança não-Mendeliana. Cruzamentos entre plantas $0B_{\text{f}} \times 1B_{\text{m}}$ resultou em 80% de plantas 0B e 20% de plantas 2B, com apenas poucos indivíduos possuindo 1B (Puertas e Lacadena, 1974). Nenhum dos cruzamentos $0B \times 2B$ resultou em uma progênie 1B, a maioria das plantas apresentavam dois Bs. Cruzamentos entre plantas $0B_{\text{f}} \times 2B_{\text{m}}$, $2B_{\text{f}} \times 0B_{\text{m}}$ e $2B_{\text{f}} \times 2B_{\text{m}}$ mostram grande variação numérica de Bs entre variedades diferentes e em uma mesma variedade (Jones e Puertas, 1993). Normalmente, cruzamentos $0B_{\text{f}} \times 2B_{\text{m}}$ mais descendentes 0B são obtidos enquanto em cruzamentos $2B_{\text{f}} \times 0B_{\text{m}}$ indivíduos com 2B ou mais são predominantes. A taxa de transmissão de cromossomos B também é influenciada pelo efeito materno (Puertas et al., 1990). As plantas 2B cujo parental materno tinha 2B apresentaram alta taxa de transmissão de Bs. Plantas 0B provenientes de um parental materno 2B mostraram aumento da taxa de aceitação do pólen de plantas possuindo Bs. Da forma contrária, a progênie de machos 2B e fêmeas 0B provinda de um

parental materno 0B exibiu uma menor frequência de transmissão de B. Em cruzamentos $2B_{\text{♀}} \times 0B_{\text{♂}}$, as variações observadas não foram correlacionadas com a influência do parental materno. Em cruzamentos $2B_{\text{♀}} \times 2B_{\text{♂}}$, o pólen vindo de um parental materno 2B fertilizando uma planta-mãe 2B resultou em aumento da frequência de cromossomos B na progênie (Puertas et al., 1990).

O acúmulo de cromossomos B ocorre em centeio devido à não-disjunção de cromátides-irmãs durante a primeira divisão mitótica do grão de pólen, bem como durante a primeira mitose do megásporo (Müntzing, 1946). O elemento que controla a não-separação de cromátides-irmãs está localizado na extremidade distal do braço longo dos Bs (Jones e Puertas, 1993). As cromátides de isocromossomos B, que não possuem a região terminal do braço longo, separam normalmente durante a primeira mitose após a meiose (Müntzing, 1946). No entanto, sabe-se que se um B padrão adicional ou sua extremidade distal do braço longo está presente na célula do pólen, um B deficiente da região terminal também sofre não-disjunção (Endo et al., 2008). Baseado em uma série de rearranjos envolvendo o B de centeio e cromossomos de trigo, tanto a presença de um B padrão adicional ou da região terminal do braço longo do B translocada em um cromossomo de trigo faz com que as cromátides do B deficiente não se separem na primeira mitose do grão de pólen. Em trigo a não-separação também ocorre como em centeio, o que significa que o controle da não-disjunção não depende do genótipo. Assim, apenas a região pericentromérica e o elemento *trans-acting*, localizado na extremidade distal do braço longo do B, são responsáveis pela não-disjunção em centeio (Figura 2) (Endo et al., 2008).

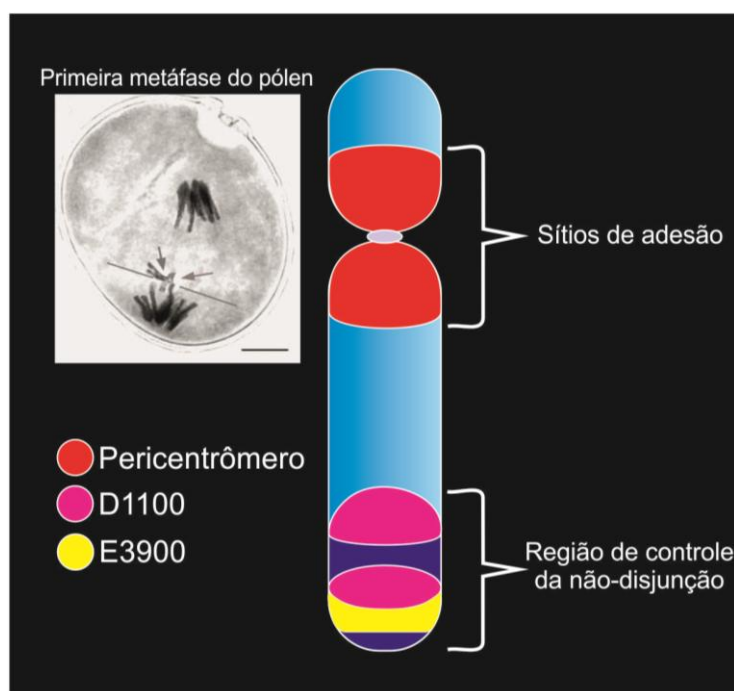


Figura 2. Regiões do cromossomo B de centeio envolvidas no mecanismo de não-disjunção durante a primeira metáfase do pólen (baseado em Jones, 2012).

O B de centeio é composto principalmente de sequências de DNA em comum com os cromossomos A (Rimpau e Flavell, 1975; Timmis et al., 1975) exceto pela região terminal do braço longo (Tsujimoto e Niwa, 1992; Wilkes et al., 1995; Houben et al., 1996). Duas famílias de DNA repetitivo específicas do B, D1100 (Sandery et al., 1990) e E3900 (Blunden et al., 1993) foram isoladas e mapeadas neste domínio terminal. Ambas as famílias são organizadas de forma complexa e não representam uma matriz monótona de repetições em tandem (Langdon et al., 2000). Hibridização *in situ* revelou que em metáfase o elemento D1100 exibe dois *clusters* adjacentes com um pequeno intervalo entre eles, com o elemento mais homogêneo E3900 posicionado proximamente ao telômero (Wilkes et al., 1995; Langdon et al., 2000). Este domínio específico do B é caracterizado como um bloco heterocromático do B, que apresenta replicação tardia na fase S e também corresponde à banda C mais proeminente e conservada discriminada em metáfase (Jones e Puertas, 1993; Houben et al., 1996; Langdon et al., 2000). Os Bs de centeio não possuem DNA ribossomal (Tsujimoto e Niwa, 1992; Cuadrado e Jouve, 1994).

Análises mais recentes da atividade transcricional em plantas de centeio com e sem Bs revelaram que plantas possuindo Bs apresentam uma atividade transcricional alterada em relação a plantas que não possuem Bs (Carchilan et al., 2007; Carchilan et al., 2009). Esses estudos concluíram que os cromossomos B de centeio são transcionalmente ativos. Carchilan et al. (2007) observaram que os dois elementos

específicos do B de centeio, D1100 e E3900, apresentam alta atividade transcricional, principalmente a sequência E3900. Isso explica o fato dessa região ter sido marcada positivamente com H3K4me3. Foi reportado por Carchilan et al. (2009) que os cromossomos B de centeio influenciam *in trans* a transcrição de sequências dos cromossomos A.

Recentemente, Martis et al. (2012a) através do sequenciamento de cromossomos A e B isolados, mostraram que os Bs de centeio são ricos em sequências derivadas de genes, permitindo traçar a sua origem de fragmentos de cromossomos A, com as partes maiores correspondendo aos cromossomos 3R e 7R (Figura 3). Comparado com cromossomos A, Bs apresentam acumulação de grandes quantidades de sequências repetitivas específicas e inserções de DNA de organelas. A origem estimada do cromossomo B de centeio ocorreu há 1,1-1,3 milhões de anos, sobrepondo em tempo com a origem do gênero *Secale* (1,7 milhões de anos). Dessa forma, foi sugerido que o B de centeio se originou de recombinações entre os cromossomos A, seguido por capturas de sequências derivadas dos As e de organelas e posterior amplificação de sequências repetitivas específicas do B.

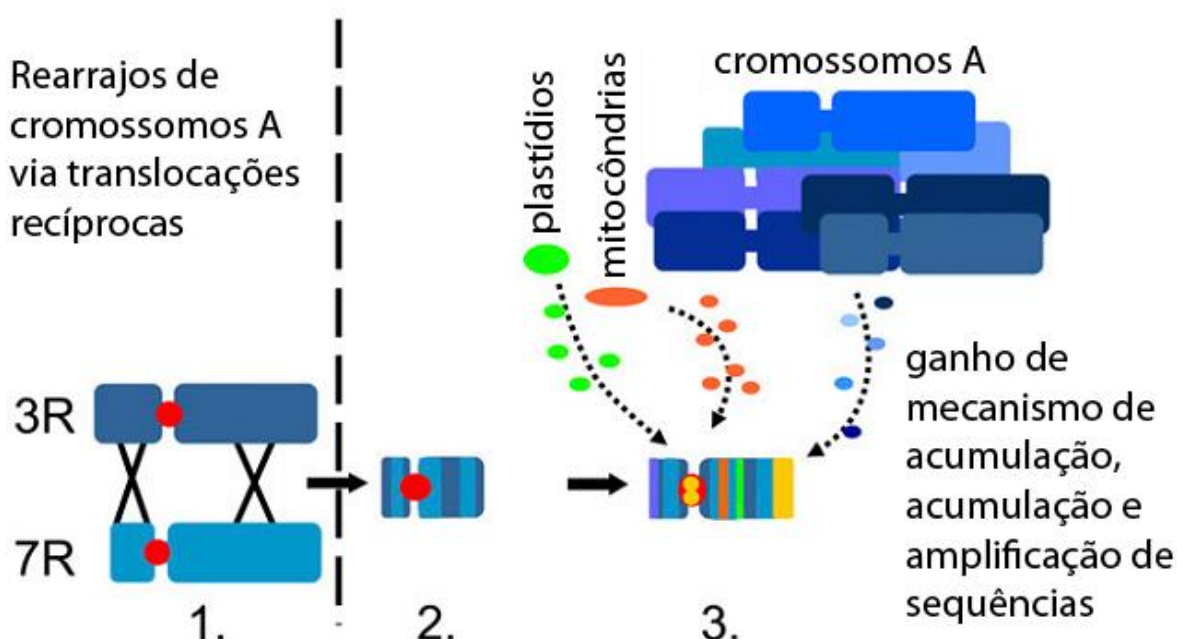


Figura 3. Modelo da evolução gradual do cromossomo B de centeio após duplicação segmentar do genoma (modificado de Martis et al. 2012). (1) translocação recíproca de fragmentos duplicados dos cromossomos 3R e 7R e segregação desbalanceada de um cromossomo pequeno translocado; (2) redução do pareamento meiótico A-B e a formação

de um proto-B; (3) acumulação de fragmentos de DNA derivados de organelas e dos cromossomos A, amplificação de sequências B-específicas, erosão e inativação de genes derivados dos As e ganho de mecanismo de acumulação cromossômico resultou na formação do cromossomo B.

3. OBJETIVO

O principal objetivo desse trabalho foi estudar as principais características funcionais e estruturais envolvidas na evolução do cromossomo B de centeio.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akita T, Sakamoto S: Cytogenetical studies of B-chromosomes in *Secale afghanicum*, a weed species closely related to cultivated *S. cereale*. Report of Plant Germ-plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan 5: 53-64 (1982).
- Alfenito MR, Birchler JA: Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* 135: 589-597 (1993).
- Amos A, Dover G: The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* 81: 673-690 (1981).
- Auger DL, Birchler JA: Maize tertiary trisomic stocks derived from B-A translocations. *Journal of Heredity* 93: 42-47 (2002).
- Bakkali M, Camacho JPM: The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: III. Mutation rate of B chromosomes. *Heredity* 92: 428-433 (2004).
- Bang JW, Choi HW: Genetic analysis of esterase isozymes in rye (*Secale cereale* L.). *Korean Journal of Genetics* 12: 87-94 (1990).
- Bannister AJ, Kouzarides T: Reversing histone methylation. *Nature* 436: 1103-1106 (2005).
- Barlow PW, Vosa CG: Chromosomes of *Puschkinia libanotica* during mitosis. *Chromosoma* 27: 436-446 (1969).
- Battaglia E: Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia* 17: 245-299 (1964).
- Berdnikov VA, Gorel FL, Kosterin OE, Bogdanova VS: Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. *Heredity* 91: 577-583 (2003).
- Blunden R, Wilkes TJ, Forster JW, Jimenez MM, Sandery MJ *et al.*: Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome* 36: 706-711 (1993).
- Bougourd SM, Parker JS: B-chromosome system of *Allium schoenoprasum*. II. Stability, inheritance and phenotypic effects. *Chromosoma* 75: 369-383 (1979).
- Brockhouse C, Bass JAB, Feraday RM, Straus NA: Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium venum* group (Diptera, Simuliidae). *Genome* 32: 516-521 (1989).
- Bugrov AG, Karamysheva TV, Perepelov EA, Elisaphenko EA, Rubtsov DN *et al.*: DNA content of the B chromosomes in grasshopper *Podisma kanoi* Storozh. (Orthoptera, Acrididae). *Chromosome Research* 15: 315-325 (2007).
- Burt A, Trivers R: Selfish DNA and breeding system in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265: 141-146 (1998).
- Camacho JP, Sharbel TF, Beukeboom LW: B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science* 355: 163-178 (2000).
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, Costa-Nunes P, Caperta A *et al.*: Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *Plant Cell* 19: 1738-1749 (2007).

- Carchilan M, Kumke K, Mikolajewski S, Houben A: Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma* 118: 607-616 (2009).
- Carlson WR: The B chromosome of corn. *Annual Review of Genetics* 12: 5-23 (1978).
- Carlson WR, Roseman RR: A new property of the maize B chromosome. *Genetics* 131: 211-223 (1992).
- Carter CR, Smith-White S: Cytology of *Brachycome lineariloba*. III. Accessory chromosomes *Chromosoma* 39: 361-379 (1972).
- Chaumeil J, Le Baccon P, Wutz A, Heard E: A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes & Development* 20: 2223-2237 (2006).
- Cheng YM, Lin BY: Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics* 164: 299-310 (2003).
- Chikmawati T, Skovmand B, Gustafson JP: Phylogenetic relationships among *Secale* species revealed by amplified fragment length polymorphisms. *Genome* 48: 792-801 (2005).
- Cuadrado A, Jouve N: Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in situ hybridization. *Genome* 37: 709-712 (1994).
- de Jesus CM, Pedro MG, Jr., Valentini SR, Moreira-Filho O: Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetica* 118: 25-32 (2003).
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK, Gill BS: Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* 111: 332-340 (2002).
- Donald TM, Leach CR, Clough A, Timmis JN: Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. *Heredity* 74: 556-561 (1995).
- Endo TR, Nasuda S, Jones N, Dou Q, Akahori A *et al.*: Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background. *Genes and Genetic Systems* 83: 23-30 (2008).
- Enkerli J, Bhatt G, Covert SF: Nht1, a transposable element cloned from a dispensable chromosome in *Nectria haematococca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 742-749 (1997).
- Evans GM: Supernumerary chromosomes in wild populations of the snail *Helix pomatia* L. *Heredity* 15: 129-138 (1960).
- Fox DP, Hewitt GM, Hall DJ: DNA replication and RNA transcription of euchromatic and heterochromatic chromosome regions during grasshopper meiosis. *Chromosoma* 45: 43-62 (1974).
- Franks TK, Houben A, Leach CR, Timmis JN: The molecular organisation of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 105: 223-230 (1996).
- Frederiksen S, Peterson G: A taxonomy revision of *Secale* (Triticeae, Poaceae). *Nordic Journal of Botany* 18: 399-420 (1998).
- Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I: Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends in Plant Science* 11: 199-208 (2006).
- Gillies CB: Ultrastructural studies of the association of homologous and non homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. *Maydica* 28: 265-287 (1983).
- Gonzalez-Sanchez M, Gonzalez-Gonzalez E, Molina F, Chiavarino AM, Rosato M *et al.*: One gene determines maize B chromosome accumulation by preferential fertilisation; another gene(s) determines their meiotic loss. *Heredity* 90: 122-129 (2003).
- Gorlov IP, Tsurusaki N: Morphology and meiotic/mitotic behavior of B chromosomes in a Japanese harvestman, *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones): No evidence for B accumulation mechanisms. *Zoological Science* 17: 349-355 (2000).
- Gotoh K: Über die Chromosomenzahl von *Secale cereale* L. *Botanical Magazine Tokyo* 38: 135-152 (1924).
- Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, Trifonov VA, Vorobieva NV *et al.*: The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Research* 13: 113-122 (2005).
- Green DM: Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri* - extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex chromosome system. *Chromosoma* 97: 55-70 (1988).

- Green DM: Muller Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome Research* 33: 818-824 (1990).
- Green DM, Zeyl CW, Sharbel TF: The evolution of hypervariable sex and supernumerary (B) chromosomes in the relict New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*. *Journal of Evolutionary Biology* 6: 417-441 (1993).
- Greilhuber J, Speta F: C-Banded Karyotypes in *Scilla hohenackeri* Group, *Scilla persica*, and *Puschkinia* (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 126: 149-188 (1976).
- Gutknecht J, Sperlich D, Bachmann L: A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma* 103: 539-544 (1995).
- Hakansson A: Meiosis and pollen mitosis in rye plants with many accessory chromosomes. *Hereditas* 43: 603-620 (1957).
- Han YN, Liu XG, Benny U, Kistler HC, VanEtten HD: Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a supernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. *Plant Journal* 25: 305-314 (2001).
- Hatta R, Ito K, Hosaki Y, Tanaka T, Tanaka A *et al.*: A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* 161: 59-70 (2002).
- Hewitt GM: Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma* 56: 381-391 (1976).
- Holmes DS, Bougourd SM: B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. V. Natural populations. *Heredity* 63: 83-87 (1989).
- Houben A, Kynast RG, Heim U, Hermann H, Jones RN *et al.*: Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 105: 97-103 (1996).
- Houben A, Belyaev ND, Leach CR, Timmis JN: Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosome Research* 5: 233-237 (1997).
- Houben A, Thompson N, Ahne R, Leach CR, Verlin D *et al.*: A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 219: 127-135 (1999).
- Houben A, Verlin D, Leach CR, Timmis JN: The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 110: 451-459 (2001).
- Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR *et al.*: Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant Journal* 33: 967-973 (2003).
- Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Agueci F *et al.*: Phosphorylation of histone H3 in plants - a dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769: 308-315 (2007).
- Jamilena M, Ruiz Rejon C, Ruiz Rejon M: A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *Journal of Cell Science* 107: 703-708 (1994).
- Jamilena M, Garrido-Ramos M, Ruiz Rejon M, Ruiz Rejon C, Parker JS: Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 104: 113-120 (1995).
- Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080 (2001).
- Jimenez MM, Romera F, Gallego A, Puertas MJ: Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. II. 0Bx2B crosses. *Heredity* 74: 518-523 (1995).
- Jones JDG, Flavell RB: The structure, amount and chromosomal localization of defined repeated DNA-sequences in species of the genus *Secale*. *Chromosoma* 86: 613-641 (1982).
- Jones RN: B-chromosome systems in flowering plants and animal species. *International Review of Cytology* 40: 1-100 (1975).
- Jones RN, Rees H: B chromosomes. London: Academic Press (1982).
- Jones RN: B-chromosome drive. *American Naturalist* 137: 430-442 (1991).
- Jones RN, Puertas MJ (1993) The B-chromosomes of rye (*Secale cereale* L.), pp. 81-112 in *Frontiers in Plant Science Research*, edited by K. K. DHIR and T. S. SAREEN. Bhagwati Enterprises, Delhi, India.
- Jones RN: Tansley review n° 85 - B chromosomes in plants. *New Phytologist* 131: 411-434 (1995).

- Jones RN, Houben A: B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science* 8: 417-423 (2003).
- Jones RN, Viegas W, Houben A: A century of B chromosomes in plants: so what? *Annals of Botany* 101: 767-775 (2008).
- Jones RN: B chromosomes in plants. *Plant Biosystems* 146: 727-737 (2012).
- Kayano H: Accumulation of B chromosomes in germ line of *Locusta migratoria*. *Heredity* 27: 119-123 (1971).
- Khush GS, Stebbins GL: Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*. I. Some new data on the ancestry of *S. cereale*. *American Journal of Botany* 48: 723-730 (1961).
- Khush GS: Cytogenetic and evolutionary studies in *Secale*. II. Interrelationships of the wild species. *Evolution* 16: 484-496 (1962).
- Kimura M, Kayano H: The maintenance of supernumerary chromosomes in wild populations of *Lilium callosum* by preferential segregation. *Genetics* 46: 1699-1712 (1961).
- Kishikawa H: Cytological studies on rye plants with 7 and 8 accessory chromosomes. *Japanese Journal of Genetics* 43: 33-& (1968).
- Ladizinsky G (1998) *Plant Evolution under Domestication*. Springer.
- Lamb JC, Meyer JM, Corcoran B, Kato A, Han F *et al.*: Distinct chromosomal distributions of highly repetitive sequences in maize. *Chromosome Research* 15: 33-49 (2007a).
- Lamb JC, Riddle NC, Cheng YM, Theuri J, Birchler JA: Localization and transcription of a retrotransposon-derived element on the maize B chromosome. *Chromosome Research* 15: 383-398 (2007b).
- Langdon T, Jenkins G, Seago C, Jones RN, Ougham H *et al.*: De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics* 154: 869-884 (2000).
- Le Thi K, Lespinasse R, Siljakovic S, Robert T, Khalfallah N *et al.*: Karyotypic modifications in androgenetic plantlets of Pearl millet, *Pennisetum glaucum* (L) R-Brunken - occurrence of B chromosomes. *Caryologia* 47: 1-10 (1994).
- Leach CR, Donald TM, Franks TK, Spiniello SS, Hanrahan CF *et al.*: Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* 103: 708-714 (1995).
- Leach CR, Houben A, Field B, Pistrick K, Demidov D *et al.*: Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics* 171: 269-278 (2005).
- Levin DA, Palestis BG, Jones RN, Trivers R: Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution* 59: 962-969 (2005).
- Lia VV, Confalonieri VA, Poggio L: B chromosome polymorphism in maize landraces: Adaptive vs. demographic hypothesis of clinal variation. *Genetics* 177: 895-904 (2007).
- Lima-De-Faria A: The evolution of the structural pattern in a rye B-chromosome. *Evolution* 17: 289-295 (1963).
- Loidl J: B-chromosomes in *Allium flavum* (Liliaceae) and some related species. *Plant Systematics and Evolution* 139: 197-207 (1982).
- Lopez-Leon MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM *et al.*: Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research* 2: 87-92 (1994).
- Maistro EL, Foresti F, Oliveira C, Toledo LFD: Occurrence of macro B chromosomes in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). *Genetica* 87: 101-106 (1992).
- Maluszynska J, Schweizer D: Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity* 62: 59-65 (1989).
- Marques A, Fuchs J, Ma L, Heckmann S, Guerra M *et al.*: 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 (2011).
- Marschner S, Kumke K, Houben A: B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* show a reduced level of euchromatic histone H3 methylation marks. *Chromosome Research* 15: 215-222 (2007a).
- Marschner S, Meister A, Blattner FR, Houben A: Evolution and function of B chromosome 45S rDNA sequences in *Brachycome dichromosomatica*. *Genome* 50: 638-644 (2007b).

- Martin C, Zhang Y: The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 838-849 (2005).
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J *et al.*: Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012).
- McAllister BF, Werren JH: Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106: 243-253 (1997).
- McVean GT: Fractious chromosomes: hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *Bioessays* 17: 579-582 (1995).
- Mendelson D, Zohary D: Behavior and transmission of supernumerary chromosomes in *Aegilops speltoides*. *Heredity* 29: 329-339 (1972).
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD: A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254: 1773-1776 (1991).
- Mizoguchi SMHN, Martins-Santos IC: Macro- and microchromosomes B in females of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Hereditas* 127: 249-253 (1997).
- Mochizuki A: A note on the B-chromosomes in natural populations of *Aegilops mutica* Boiss. in central Turkey. *Wheat Information Service* 11: 31-31 (1960).
- Muñoz-Pajares A, Martinez-Rodriguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM *et al.*: A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics* 187: 853-863 (2011).
- Müntzing A: Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye III. The mechanism of non-disjunction at the pollen mitosis. *Hereditas* 32: 97-119 (1946).
- Müntzing A, Nygren A: A new diploid variety of *Poa alpina* with two accessory chromosomes at meiosis. *Hereditas* 41: 405-422 (1955).
- Müntzing A: Chromosomal variation in the Lindström strain of wheat carrying accessory chromosomes in rye. *Hereditas* 66: 279-286 (1970).
- Neo DM, Filho OM, Camacho JP: Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85: 136-141 (2000).
- Niwa K, Sakamoto S: Origin of B chromosomes in cultivated rye. *Genome* 38: 307-312 (1995).
- Niwa K, Sakamoto S: Detection of B chromosomes in rye collected from Pakistan and China. *Hereditas* 124: 211-215 (1996).
- Nur U: A supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in lecanoid genetic system. *Chromosoma* 13: 249-271 (1962).
- Nur U: A mitotically unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma* 14: 407-422 (1963).
- Nur U, Nevo E: Supernumerary chromosomes in cricket frog *Acris crepitans*. *Caryologia* 22: 97-102 (1969).
- Page BT, Wanous MK, Birchler JA: Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. *Genetics* 159: 291-302 (2001).
- Palestis BG, Burt A, Jones RN, Trivers R: B chromosomes are more frequent in mammals with acrocentric karyotypes: support for the theory of centromeric drive. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271 Suppl 3: S22-S24 (2004a).
- Palestis BG, Trivers R, Burt A, Jones RN: The distribution of B chromosomes across species. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 151-158 (2004b).
- Parker JS, Jones GH, Edgar L, Whitehouse C: The population cytogenetics of *Crepis capillaris*. II. The stability and inheritance of B chromosomes. *Heredity* 63: 19-27 (1989).
- Pohler W, Schlegel R: A rye plant with frequent A-B chromosome pairing. *Hereditas* 112: 217-220 (1990).
- Portela-Castro ALD, Juilo HF, Nishiyama PB: New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Parana River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. *Genetica* 110: 277-283 (2000).
- Price L, Short KC, Roberts AV: Poor resolution of C bands and the presence of B chromosomes in *Rosa rugosa scabrosa*. *Caryologia* 34: 69-72 (1981).

- Pryor A, Faulkner K, Rhoades MM, Peacock WJ: Asynchronous replication of heterochromatin in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 77: 6705-6709 (1980).
- Puertas MJ, Lacadena JR: Transmission of rye B chromosomes in natural pollination. Theoretical and Applied Genetics 45: 197-204 (1974).
- Puertas MJ, Jimenez MM, Romera F, Vega JM, Diez M: Maternal imprinting effect on B-chromosome transmission in rye. Heredity 64: 197-204 (1990).
- Raman R, Sharma T: DNA replication, G- and C-bands and meiotic behaviour of supernumerary chromosomes of *Rattus rattus* L. Chromosoma 45: 111-119 (1974).
- Rimpau J, Flavell RB: Characterization of rye B chromosome DNA by DNA-DNA hybridization. Chromosoma 52: 207-217 (1975).
- Rosato M, Chiavarino AM, Naranjo CA, Hernandez JC, Poggio L: Genome size and numerical polymorphism for the B chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). American Journal of Botany 85: 168-174 (1998).
- Ruiz-Estevez M, Lopez-Leon MD, Cabrero J, Camacho JP: B-chromosome ribosomal DNA is functional in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. PLoS One 7: e36600 (2012).
- Ruizrejon M, Posse F, Oliver JL: The B chromosome system of *Scilla autumnalis* (Liliaceae) - effects at the isoenzyme level. Chromosoma 79: 341-348 (1980).
- Sandery MJ, Forster JW, Blunden R, Jones RN: Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. Genome 33: 908-913 (1990).
- Sapre AB, Deshpande DS: Origin of B chromosomes in *Coix* L. through spontaneous interspecific hybridization. Journal of Heredity 78: 191-196 (1987).
- Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT *et al.*: Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish (Vol 373, Pg 68, 1995). Nature 374: 196-196 (1995).
- Schiemann E, Nürnberg-Krüger U: Neue Untersuchungen an *Secale africanum* Stapf. Naturwissenschaften 39: 136-137 (1952).
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I, Haaf T: Chromosome banding in Amphibia. XXIV. The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae). Cytogenetic and Genome Research 97: 205-218 (2002).
- Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I, Schartl M: Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. Chromosome Research 14: 231-242 (2006).
- Sharbel TF, Green DM, Houben A: B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome evolution. Genome Res 41: 14-22 (1998).
- Smith-White S, Carter CR: The cytology of *Brachycome lineariloba*. II. The chromosome species and their relationships. Chromosoma 30: 129-153 (1970).
- Sreenivasan TV: Cytogenetical studies in *Erianthus*: Meiosis and behavior of B chromosomes in $2n = 20$ forms. Genetica 55: 129-132 (1981).
- Stark EA, Connerton I, Bennett ST, Barnes SR, Parker JS *et al.*: Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. Chromosome Research 4: 15-23 (1996).
- Stitou S, Diaz de La Guardia R, Jimenez R, Burgos M: Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. Chromosome Research 8: 305-311 (2000).
- Switonski M, Gustavsson I, Hojer K, Ploen L: Synaptonemal complex analysis of the B chromosomes in spermatocytes of the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm). Cytogenetics and Cell Genetics 45: 84-92 (1987).
- Tanic N, Vujosevic M, Dedovic-Tanic N, Dimitrijevic B: Differential gene expression in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) with and without B chromosomes. Chromosoma 113: 418-427 (2005).
- Teoh SB, Rees H: B-chromosomes in white spruce. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 198: 325-344 (1977).
- Theuri J, Phelps-Durr T, Mathews S, Birchler J: A comparative study of retrotransposons in the centromeric regions of A and B chromosomes of maize. Cytogenetic and Genome Research 110: 203-208 (2005).

- Timmis JN, Ingle J, Sinclair J, Jones RN: The genomic quality of rye B chromosomes. *Journal of Experimental Botany* 26: 367-378 (1975).
- Trivers R, Burt A, Palestis BG: B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome* 47: 1-8 (2004).
- Tsujimoto H, Niwa K: DNA structure of the B chromosomes of rye revealed by *in situ* hybridization using repetitive sequences. *Japanese Journal of Genetics* 67: 233-241 (1992).
- van Vugt JJ, de Nooijer S, Stouthamer R, de Jong H: NOR activity and repeat sequences of the paternal sex ratio chromosome of the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. *Chromosoma* 114: 410-419 (2005).
- Vicente VE, Moreira-Filho O, Camacho JP: Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenetic and Cell Genetics* 74: 70-75 (1996).
- Vujosevic M, Blagojevic J: B chromosomes in populations of mammals. *Cytogenetic and Genome Research* 106: 247-256 (2004).
- Werren JH, Stouthamer R: PSR (paternal sex ratio) chromosomes: the ultimate selfish genetic elements. *Genetica* 117: 85-101 (2003).
- Wilkes TM, Francki MG, Langridge P, Karp A, Jones RN *et al.*: Analysis of rye B chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research* 3: 466-472 (1995).
- Wilson EB: Note on the chromosome groups of *Metapodius* and *Banasa*. *Biological Bulletin* XII: 303-313 (1907a).
- Wilson EB: The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science* 26: 870-871 (1907b).
- Wu TP: B-chromosomes in *Sorghum stipoides*. *Heredity* 68: 457 (1992).
- Zhang Y, Reinberg D: Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* 15: 2343-2360 (2001).
- Ziegler CG, Lamatsch DK, Steinlein C, Engel W, Scharl M *et al.*: The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research* 11: 23-35 (2003).
- Zohary D, Hopf M (2000) Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Oxford University Press Inc., New York, United States.

5. ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO 'Molecular Cytogenetics'

Título: Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants

André Marques, Sonja Klemme, Marcelo Guerra and Andreas Houben

Molecular Cytogenetics 2012, **5:34** **doi:10.1186/1755-8166-5-34**

SHORT REPORT

Open Access

Cytomolecular characterization of *de novo* formed rye B chromosome variants

André Marques^{1,2}, Sonja Klemme¹, Marcelo Guerra² and Andreas Houben^{1*}

Abstract

Background: B chromosomes (Bs) are dispensable elements which occur in many species including rye (*Secale cereale*). We determined the organization of B variants to obtain insights into the origin of B polymorphisms in rye.

Results: The observed B variants were classified according to their morphology and *in situ* hybridization patterns with the B-specific repeats D1100 and CL11 into (I) long arm iso B, (II) D1100-deficient B and (III) small metacentric B variants. Long arm iso Bs are likely products of a meiotic centromere misdivision and subsequent duplication of the long arm, whereas small B variants are probably generated by chromosome breakage. Some deficient Bs experienced extensive amplification of CL11 repeats.

Conclusions: Both the pericentromere and the nondisjunction control region seem to be involved in the generation of rye B chromosome variants. However, due to the loss of the B-specific nondisjunction control region most of the variants generated are not capable to accumulate in a population.

Keywords: Supernumerary chromosome, Rye, B chromosome polymorphisms

Background

B chromosomes (Bs) are dispensable elements and occur in many species of plants, fungi and animals over a wide geographical distribution [1]. Although Bs have intensely been cytologically investigated since their discovery a century ago [2], little is known about their origin, mode of evolution and molecular composition. According to most views, Bs are selfish elements which have arisen from normal A chromosomes (As) and maintain themselves through generations by accumulation mechanisms [3].

Due to their mainly neutral situation in host genomes it is expected to observe B chromosome polymorphisms among populations. The origin of B structural variants is mostly attributed to be of monophyletic origin from a unique type of ancestral B chromosome which afterwards diverged in different types through generations [4, 5]. Indeed, there are several cases of B polymorphisms whether numerical or structural [6, 7]. For the B chromosome of the grasshopper *E. plorans* a large variety of structural variants has been demonstrated among

many populations [6]. In many plants, B polymorphisms have been only attributed to numerical polymorphisms [7, 8]. Although, in a few cases B structural variants in natural populations have been identified e.g. *Brachycome dichromosomatica* [4] and *Scilla autumnalis* [9].

Rye is an excellent system for B polymorphism studies, because of its wide distribution across Europe, Middle East and Asia [10]. The standard B is acrocentric and smaller than A chromosomes of rye. Apart of the terminal region of the long B arm, a high level of overall similarity exists between As and Bs of rye [11, 12]. Two rye B-specific high copy repeats (D3900 and E1100) are clustered on its terminal region of the long arm [13, 14]. More recently, a B-pericentromeric repeat CL11 has been identified (Martis et al., unpublished).

Naturally occurring B variants may be produced from the standard type by misdivision of the centromere or by deletions of segments from the long arm of the B [15, 16] generating mainly isochromosomes, both of the short arm and of the long arm B, as well as deficient Bs [17]. Often due to the loss of the terminal end of the long B arm directed nondisjunction is impaired and therefore these B variants are not able to accumulate [16, 18]. Hence, structural variants are rare in natural populations, indicating that the standard form is the

* Correspondence: houben@ipk-gatersleben.de

¹Leibniz-Institute of Plant Genetics & Crop Plant Research (IPK), 06466, Gatersleben, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

only one maintained in the long term [19]. We have found with high frequency in the progeny of one plant of the rye line 7415 [20] structural rearrangements of the Bs. In order to obtain insights into the origin of the rye B polymorphisms we characterized the various B variants in relation to the two rye B-specific high copy repeats (CL11 and D1100).

Results and discussion

The analysis of 16 offsprings derived from one selfed +2B plant revealed eight seedlings carrying B chromosomes. Three out of these eight plants presented 1 up to 4 standard Bs whereas the other five plants exhibited extra-chromosomes differing in size and morphology from the standard Bs. Three plants showed a mosaic of different types of extra-chromosomes. Cross-hybridization with the B-specific probes CL11 and D1100 revealed the B-origin of the extra chromosomes, which were classified according to their morphology and hybridization patterns into (I) long arm iso B, (II) D1100-deficient B and (III) small metacentric B variants (Figure 1a). Table 1 shows the intraindividual variation of B structural rearrangements found in five individuals of rye.

We found the standard Bs to be mitotically unstable in two plants of the progeny of one plant from the line 7415, undergoing different levels of chromosome deficiency. The morphology and number varied even between cells of the same plant. As a result we found fragmented B chromosomes with and without additional standard Bs per cell (Table 1, individuals #5 and #6). This is unusual as the standard B chromosome of rye is generally mitotically stable. However, the isochromosomes of the long arm were mitotically stable, since no additional fragmented B chromosomes have been found in those plants (Table 1, individuals #1 and #11).

The high frequency (approx. 63%) of B structural rearrangements in this progeny is unusual. However, structural rearrangements of rye Bs have been reported after experimental crosses [21]. Two out of five individuals carried a long arm iso B with both terminal regions labeled with D1100 signal (Figure 1b, type I). The origin of the observed long arm iso Bs is most likely related to meiotic centromere misdivision due to formation of univalent Bs. Half of the small B variants appeared to be short arm telosomes or chromosomes with a partial loss of the long arm (Figure 1f, g; type II). The other B variants revealed a metacentric morphology (Figure 1d, h; type III). In order to confirm the isochromosomal nature of the small metacentric B variants, the B-short arm marker (CAA)₁₀ was used for FISH. Microsatellite-specific signals were found on the A chromosomes, mainly located on their proximal regions and on the short arm of the standard B. Surprisingly, only one arm

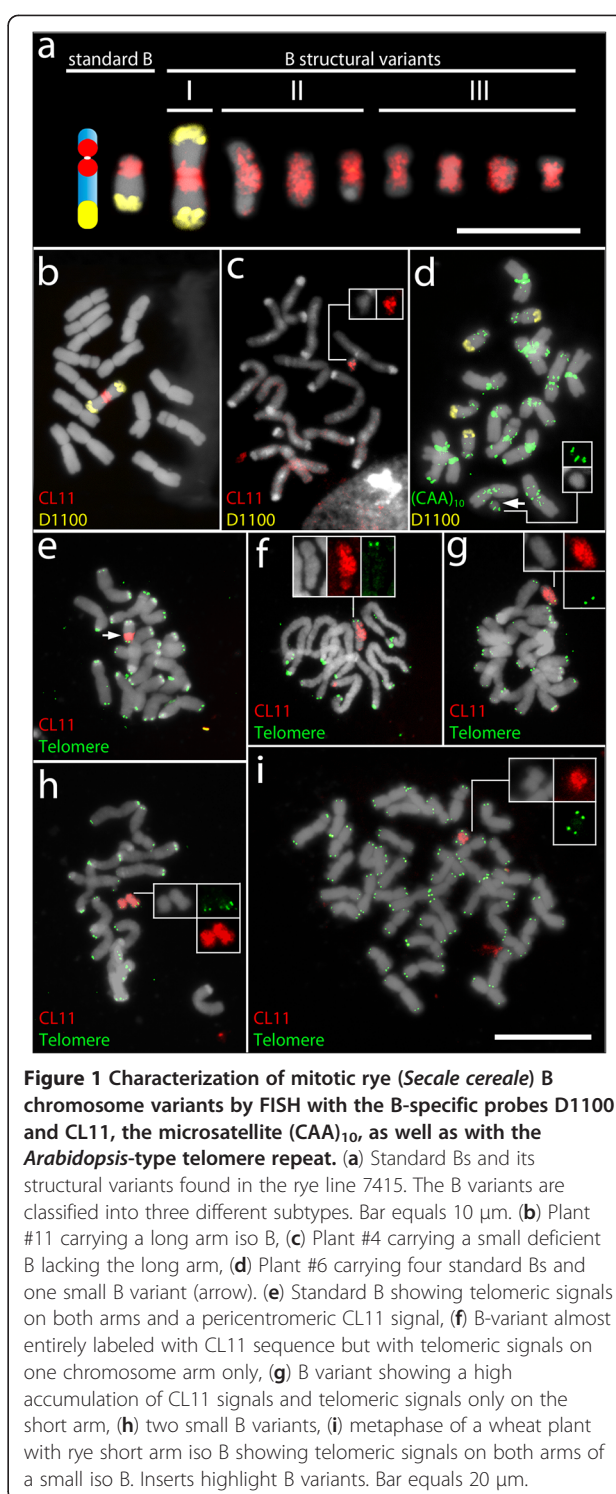


Figure 1 Characterization of mitotic rye (*Secale cereale*) B chromosome variants by FISH with the B-specific probes D1100 and CL11, the microsatellite (CAA)₁₀, as well as with the *Arabidopsis*-type telomere repeat. (a) Standard Bs and its structural variants found in the rye line 7415. The B variants are classified into three different subtypes. Bar equals 10 μm. (b) Plant #11 carrying a long arm iso B, (c) Plant #4 carrying a small deficient B lacking the long arm, (d) Plant #6 carrying four standard Bs and one small B variant (arrow). (e) Standard B showing telomeric signals on both arms and a pericentromeric CL11 signal, (f) B-variant almost entirely labeled with CL11 sequence but with telomeric signals on one chromosome arm only, (g) B variant showing a high accumulation of CL11 signals and telomeric signals only on the short arm, (h) two small B variants, (i) metaphase of a wheat plant with rye short arm iso B showing telomeric signals on both arms of a small iso B. Inserts highlight B variants. Bar equals 20 μm.

of the small metacentric B variants showed (CAA)₁₀ signals (Figure 1d), suggesting that these chromosomes are not short arm iso Bs, but rather chromosomes with a partial loss of the long arm. In rare cases, deficient Bs were almost entirely labeled with CL11-specific signals, but were found lacking the nondisjunction control

Table 1 Number and types of structural B variants found in five individuals of the rye line 7415

Individuals	N° of Bs per cell	Identified B variants				Number of cells analyzed
		Standard B	Small metacentric B	Large iso B	Deficient B	
7415/1	1	0	0	23	0	23
7415/4	1	0	11	0	10	21
7415/5	1–2	2	10	0	12	24
7415/6	3–4	20	8	0	0	28
7415/11	1	0	0	27	0	27

region, (Figure 1f, type II). The extended CL11 signal suggests an extensive amplification of this sequence beyond the pericentromere. Generally DNA amplification occurs during periods of genomic instability and several amplification mechanisms have been suggested [22].

Next, we tested whether the truncated B arms are stabilized by *Arabidopsis*-type telomere repeats. As positive control we employed the wheat-rye addition line B^{s-2} containing short arm B isochromosomes (Figure 1i). Standard Bs and the iso-short arm B of line B^{s-2} are characterized by *Arabidopsis*-type telomeric signals on the termini of both arms (Figure 1e). All small, newly formed B variants displayed telomeric signals only in one arm (Figure 1f–h), confirming that the small Bs are results of chromosome breakage events and that no telomere repeats or only few are sealing the broken arm.

Both the pericentromere and the nondisjunction control region seem to be involved in the generation of B variants. However, most of the variants generated are not capable to accumulate in a population. The only B variant which maintains its nondisjunction capacity is the long arm iso B type [23]. However, the maintenance of large iso Bs has not been found in natural populations, perhaps because isochromosomes frequently show centromere dysfunction and/or meiotic irregularities with iso-ring formation at metaphase I [6, 24]. Hence, most B variants of rye will undergo elimination within the population despite the mainly neutral effect of Bs on the host genome.

Material and methods

Plant material

The self-fertile *Secale cereale* inbred line 7415 carrying B chromosomes of the Japanese JNK strain were analyzed [20]. The *T. aestivum* L. ('Chinese Spring') addition line B^{s-2} containing short arm B isochromosomes was used as control [23]. Seeds were germinated on humid filter paper.

Probe preparation and fluorescence in situ hybridization (FISH)

The B-specific high copy repeats D1100 [14] and CL11 (Martis et al., unpublished), located on the terminal

nondisjunction control region and on the pericentromeric region, respectively, were amplified by PCR and the products were cleaned using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). The telomeric probe was obtained from a plasmid containing an *Arabidopsis*-like telomere TTTAGGG sequence. All probes were labeled with Texas red-dUTP (Perkin Elmer) or Alexa-488-dUTP (Invitrogen) directly by nick translation. Additionally, a (CAA)₁₀ oligonucleotide directed labeled with Cy3 (MWG, Eurofins) was also used as FISH probe. Slide preparation and *in situ* hybridization were performed as described [25]. Microscopic images were recorded using an epifluorescence Leica DMLB microscope equipped with a Cohu CCD camera or alternatively an Olympus BX61 microscope equipped with an ORCA-ER CCD camera. Images were analyzed using the QFISH software (Leica) or SIS software (Olympus), respectively. The monochromatic images were pseudocolored and merged using Adobe Photoshop CS5.

Abbreviations

FISH: Fluorescence *in situ* Hybridization; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AM carried out studies. SK participated in the design of the study. MG and AH conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank T. Endo for providing the wheat-rye B addition line. We are grateful to K. Kumke for her excellent technical assistance. This work was supported by the DFG (HO 1779/14-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Author details

¹Leibniz-Institute of Plant Genetics & Crop Plant Research (IPK), 06466, Gatersleben, Germany. ²Laboratory of Plant Cytogenetics and Molecular Biology, Department of Botany, UFPE, Recife, Brazil.

Received: 27 June 2012 Accepted: 28 June 2012

Published: 16 July 2012

References

1. Jones RN: Tansley review no 85—B chromosomes in plants. *New Phytol* 1995, **131**:411–434.
2. Wilson EB: The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science* 1907, **26**:870–871.

3. Jones RN, Viegas W, Houben A: **A century of B chromosomes in plants: so what?** *Ann Bot* 2008, **101**:767–775.
4. Houben A, Thompson N, Ahne R, Leach CR, Verlin D, Timmis JN: **A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae).** *Plant Syst Evol* 1999, **219**:127–135.
5. Muñoz-Pajares A, Martínez-Rodríguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM, Perfectti F: **A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*.** *Genetics* 2011, **187**:853–863.
6. Bakkali M, Camacho JPM: **The B chromosome polymorphism of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in North Africa: III. Mutation rate of B chromosomes.** *Heredity* 2004, **92**:428–433.
7. Lia VV, Confalonieri VA, Poggio L: **B chromosome polymorphism in maize landraces: adaptive vs. demographic hypothesis of clinal variation.** *Genetics* 2007, **177**:895–904.
8. Sieber VK, Murray BG: **Structural and numerical chromosomal polymorphism in natural populations of *Alopecurus* (Poaceae).** *Plant Syst Evol* 1981, **139**:121–136.
9. Parker JS, Lozano R, Taylor S, Rejon MR: **Chromosomal structure of populations of *Scilla autumnalis* in the Iberian Peninsula.** *Heredity* 1991, **67**:287–297.
10. Zohary D, Hopf M: *Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*. 3rd edition. New York: Oxford University Press Inc.; 2000.
11. Houben A, Kynast RG, Heim U, Hermann H, Jones RN, Forster JW: **Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*).** *Chromosoma* 1996, **105**:97–103.
12. Wilkes TM, Francki MG, Langridge P, Karp A, Jones RN, Forster JW: **Analysis of rye B chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH).** *Chromosome Res* 1995, **3**:466–472.
13. Blunden R, Wilkes TJ, Forster JW, Jimenez MM, Sandery MJ, Karp A, Jones RN: **Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences.** *Genome/Natl Res Counc Can = Genome/Conseil national de recherches Canada* 1993, **36**:706–711.
14. Sandery MJ, Forster JW, Blunden R, Jones RN: **Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome.** *Genome/Natl Res Counc Can = Genome/Conseil national de recherches Canada* 1990, **33**:908–913.
15. Müntzing A: **Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye I. Iso-fragments produced by misdivision.** *Hereditas* 1944, **30**:231–248.
16. Müntzing A: **Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. V. A new fragment type arisen by deletion.** *Hereditas* 1948, **34**:435–442.
17. Jones RN, Puertas MJ: **The B chromosomes of rye (*Secale cereale* L.).** In *Frontiers in Plant Science Research*. Edited by Dhir KK, Sareen TS. Delhi: Bhagwati Enterprises; 1993:81–112.
18. Jones RN: **B-chromosome drive.** *Am Nat* 1991, **137**:430–442.
19. Puertas MJ: **Nature and evolution of B chromosomes in plants: a non-coding but information-rich part of plant genomes.** *Cytogenet Genome Res* 2002, **96**:198–205.
20. Jimenez MM, Romera F, Puertas MJ, Jones RN: **B-chromosomes in inbred lines of rye (*Secale cereale* L.). I. Vigor and fertility.** *Genetica* 1994, **92**:149–154.
21. Jimenez MM, Romera F, Gallego A, Puertas MJ: **Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. II. 0Bx2B crosses.** *Heredity* 1995, **74**:518–523.
22. Wintersberger E: **DNA amplification: new insights into its mechanism.** *Chromosoma* 1994, **103**:73–81.
23. Endo TR, Nasuda S, Jones N, Dou Q, Akahori A, Wakimoto M, Tanaka H, Niwa K, Tsujimoto H: **Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background.** *Genes Genet Syst* 2008, **83**:23–30.
24. Santos JL, Jimenez MM, Diez M: **Synaptic patterns of rye B chromosomes. IV. The B isochromosomes.** *Heredity* 1995, **74**:100–107.
25. Ma L, Vu GTH, Schubert V, Watanabe K, Stein N, Houben A, Schubert I: **Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH.** *Chromosome Res* 2010, **18**:841–850.

doi:10.1186/1755-8166-5-34

Cite this article as: Marques et al.: Cytomolecular characterization of *de novo* formed rye B chromosome variants. *Molecular Cytogenetics* 2012 **5**:34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO 'Chromosome Research'

Título: Dinâmica evolutiva do cromossomo B de centeio: polimorfismos estruturais e variação na expressão de sequências B-específicas

A. Marques^{1,2}, A. M. Banaei-Moghaddam¹, S. Klemme¹, F. R. Blattner¹, K. Niwa³, M. Guerra² & A. Houben¹

¹Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany

²Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Botânica, UFPE, Brasil

³Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Japan

Resumo

Cromossomos B (Bs) são elementos dispensáveis do genoma, ocorrendo em diversos organismos em número variável em diferentes indivíduos, sendo por isso, chamados de cromossomos supernumerários. Em centeio (*Secale cereale*) cromossomos B são encontrados em populações de diferentes origens por uma ampla distribuição geográfica. Devido ao seu efeito neutro no genoma hospedeiro, cromossomos B de muitas espécies apresentam frequentemente polimorfismos estruturais, mas pouco se sabe sobre a variabilidade cito-molecular desses cromossomos. No presente trabalho foi realizada uma extensa análise cito-molecular do cromossomo B de centeio visando entender a variação na composição e distribuição das suas principais sequências repetitivas. O “*timing*” de replicação de seu DNA e a expressão de sequências B-específicas. Ao contrário do esperado, observou-se que o B é conservado estruturalmente em diferentes populações de centeio cultivado e silvestre, exceto por pequenas alterações na expressão de ambos os elementos D1100 e E3900 e uma variação estrutural encontrada no Afeganistão, Paquistão e Turquia, que diferem do tipo mais comum por uma inversão pericêntrica. A análise do *timing* de replicação do DNA confirmou a replicação mais tardia da sequência Sc26c82 na região terminal do B. A identificação de uma região de controle da não-disjunção semelhante em todos os Bs estudados sugere que a conservação estrutural da

cromatina, a composição de sequências do seu DNA e a sua atividade transcricional tenham papel importante no mecanismo de acumulação desse cromossomo. No geral, a composição de sequências do B é altamente conservada em todos os genótipos de centeio analisados, e as duas variantes estruturais do B diferem entre si basicamente por uma inversão pericêntrica. Assim, o B de centeio parece ter estabelecido sua forma atual antes da domesticação de centeio e da formação das duas subespécies (*S. cereale cereale* e *S. cereale segetale*), acumulando relativamente poucas alterações estruturais e moleculares durante sua evolução.

Palavras-chave: controle da não-disjunção, evolução cromossômica, centeio, cromossomo B, polimorfismos cromossômicos

Introdução

Cromossomos B (Bs) são cromossomos supernumerários que ocorrem em muitas espécies vegetais e animais (Jones, 1995). Embora Bs tenham sido descobertos há mais de um século ainda restam dúvidas sobre sua origem, modo de evolução e composição molecular. Estes cromossomos têm sido referidos como elementos “egoístas” por desenvolverem mecanismos que garantem sua acumulação nas gerações e aparente ausência de genes ativos. Normalmente, originam-se a partir dos cromossomos A (As) e mantêm-se através das gerações por diferentes mecanismos de acumulação (Houben e Carchilan, 2012; Jones, 2012).

Além do polimorfismo numérico típico dos Bs, existem vários casos de polimorfismos estruturais de Bs (Jones, 1995; Jones e Houben, 2003). Uma vez que os Bs não são necessários para o desenvolvimento normal ou para a propagação do hospedeiro, esperar-se-ia um elevado número de polimorfismos estruturais nos Bs entre indivíduos. A origem dessas variantes em geral se dá a partir de um único B ancestral, que por acúmulo de mutações gera diferentes tipos através das gerações (Niwa e Sakamoto, 1995; Houben et al., 1999; Muñoz-Pajares et al., 2011).

O centeio oferece um dos melhores sistemas para estudos de polimorfismo do B, por causa de sua ampla distribuição geográfica, que se estende pela Europa, Oriente Médio e Ásia (Zohary e Hopf, 2000). Recentemente, análises filogenéticas de sequências dos cromossomos A e B e de regiões sintênicas entre *Brachypodium* e cevada, foi

possível inferir a idade de origem do cromossomo B centeio em 1,1-1,3 milhões de anos (M.a.) (Martis et al., 2012b). Essa estimativa pode estar superestimada devido à pressão seletiva reduzida sobre as sequências localizadas no B. Provavelmente, a origem do B ocorreu num período intermediário entre a formação do gênero *Secale* (1,7 M.a) e o surgimento do clado *S. strictum*/*S. vavilovii*/*S. cereale* (0,8 M.a.), de acordo com a datação do DNAr de Triticeae (Martis et al., 2012b).

Cromossomos B são encontrados tanto no centeio cultivado (*Secale cereale cereale*) quanto no centeio invasor ou silvestre (*Secale cereale segetale*) (Niwa e Sakamoto, 1995). São representados predominantemente por uma forma padrão que ocorre em uma ampla distribuição geográfica. Estudos de pareamento meiótico dos Bs em híbridos F1 entre diferentes linhagens de centeio cultivado e silvestre sugerem uma origem única para o B (Niwa e Sakamoto, 1995). Rearranjos estruturais do B ocorrem em cerca de 2% por geração em cruzamentos experimentais (Jimenez et al., 1995) dando origem principalmente a isocromossomos e cromossomos deficientes (Jones e Puertas, 1993), embora tais variantes não sejam mantidas em populações naturais. Recentemente, foi reportada em uma linhagem híbrida de centeio uma alta frequência de alterações estruturais do B (Marques et al., 2012).

O B de centeio é composto principalmente por sequências de DNA comuns aos As, com exceção da parte terminal do braço longo do B (Tsujimoto e Niwa, 1992; Wilkes et al., 1995; Houben et al., 1996). Duas famílias de sequências repetitivas de várias cópias específicas do B, D1100 e E3900, foram isoladas (Sandery et al., 1990) e mapeadas neste domínio terminal (Blunden et al., 1993; Wilkes et al., 1995). O sequenciamento completo do cromossomo B de centeio (Martis et al., 2012b) revelou, inesperadamente, diversas sequências do B com uma alta homologia com sequências gênicas de outras espécies. A composição do centrômero dos Bs revelou-se diferente da dos As, principalmente por uma grande quantidade de DNA mitocondrial e outras sequências repetitivas, além de numerosas sequências comuns (por exemplo, o retroelemento Bilby). Um grande bloco de DNA plastidial foi encontrado na região paracentromérica do braço longo, distalmente ao sítio contendo DNA mitocondrial. Com base nas sequências exclusivas do B foram desenvolvidas diversas sondas para mapeamento citogenético por FISH (Klemme et al., em prep.). Os cromossomos de centeio mostram uma acumulação diferencial de dois retroelementos, Revolver e Sabrina, que apresentam padrões contrastantes de distribuição. O retroelemento Revolver é acumulado nos Bs enquanto o

retroelemento Sabrina é acumulado ao longo dos cromossomos A (Carchilan et al., 2009). Curiosamente o B da linhagem de centeio de referência 7415 é deficiente para este retroelemento (Klemme et al., em prep.).

O cromossomo B de centeio possui um modo de herança não-Mendeliana, e a sua acumulação ao longo das gerações ocorre devido à não-disjunção das cromátides-irmãs durante a primeira mitose do grão de pólen e primeira mitose do megásporo (Hasegawa, 1934; Hakansson, 1948). O mecanismo de acumulação do B requer um fator localizado na extremidade do seu braço longo. Cromossomos que não possuem essa região terminal apresentam disjunção normal (Müntzing, 1948; Endo et al., 2008). Denominada de região de controle da não-disjunção, essa região é caracterizada por uma combinação incomum de marcas de histona (Carchilan et al., 2007). Ao contrário das regiões de heterocromatina dos As a heterocromatina do cromossomo B é simultaneamente marcada com anticorpos contra as histonas H3K4me3 e H3K27me2,3. Curiosamente, este domínio forma uma banda C em mitose, mas sofre descondensação durante a interfase (Moraes-Cecílio et al., 1996; Langdon et al., 2000; Carchilan et al., 2007). Isso pode se dever ao fato de que, ambas as famílias de sequências repetitivas específicas do B, D1100 e E3900, localizadas neste domínio, apresentam alta atividade transcricional em diferentes tecidos, principalmente em anteras (Carchilan et al., 2007). Estas características sugerem que a conformação única da cromatina e a atividade transcricional da região terminal do B estão envolvidas no seu mecanismo de não-disjunção.

O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de polimorfismos no cromossomo B de centeio em diferentes populações. Para isso, foram analisados os padrões de distribuição cromossômica de diferentes sequências repetitivas e o comportamento de transcrição de sequências B-específicas em Bs derivados do centeio cultivado, provenientes da Turquia, Irã, Coréia, Japão e China, e do centeio silvestre coletados no Paquistão e no Afeganistão (Niwa e Sakamoto, 1995, 1996). Atenção especial foi dada à região de controle da não-disjunção do B em diferentes populações. Foi realizada também uma análise comparativa da atividade transcricional de sequências B-específicas e do *timing* de replicação do DNA. A região de controle da não-disjunção do B apresenta a sequência de DNA mais tardiamente replicada do genoma (Lima-de-Faria e Jaworska, 1972). Visto que as regiões que apresentam replicação tardia são *hotspots* para rearranjos cromossômicos (Herrick, 2011), essa região pode estar envolvida na formação

de polimorfismos estruturais e, por essa razão, foi feita uma análise do *timing* de replicação do B.

Materiais e métodos

Material vegetal

Amostras de centeio cultivado, provenientes da Turquia, Irã, Coréia, Japão (Niwa e Sakamoto, 1995) e China (nº 37, em Niwa e Sakamoto, 1996) e de centeio silvestre, provenientes do Afeganistão (Niwa e Sakamoto, 1995) e Paquistão (nº 34, em Niwa e Sakamoto, 1996) foram genotipados para a presença de Bs e mantidos em crescimento em uma estufa para a coleta de tecidos e propagação das plantas.

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e imunocoloração

Preparações cromossômicas mitóticas e hibridização *in situ* foram realizadas como descrito por Ma et al. (2010). Foram utilizadas como sondas para o mapeamento comparativo por FISH, as sequências repetidas em tandem D1100 (Sandery et al., 1990), E3900 (Blunden et al., 1993), Sc11, Sc26c82, Sc36c82, Sc55c1, Sc63c34 e Sc9c130, dois retroelementos Revolver e Sabrina, BACs contendo DNA plastidial (clone ChHB 100G01) e mitocondrial (clone MnHB 0205G01) (Martis et al., 2012; Klemme et al., em prep.), microssatélite (CAA)₁₀ (Marques et al., 2012) e sonda telomérica do tipo *Arabidopsis* (Ma et al., 2010).

Preparações cromossômicas para imunocoloração e localização de anti-histona H3K4me3 (Upstate, Cat No. 07-473, diluído 1: 200) e FISH sequencial foram feitas de acordo com Marques et al. (2011). As imagens das melhores metáfases foram adquiridas em um microscópio Olympus BX61 equipado com uma câmera CCD ORCA-ER e sistema de desconvolução. As imagens foram analisadas usando o software SIS (Olympus) e posteriormente editadas em Photoshop CS5.

Padrão de replicação do DNA cromossômico

Raízes de plântulas foram tratadas com 15 mM EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), durante 2 horas, lavadas brevemente e mantidas em água destilada por 2,5 h, para passarem da fase S à metáfase. As raízes foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1) e as lâminas foram preparadas de acordo com Ma et al. (2010). Para detecção do EdU,

foram seguidas as instruções do fabricante do “kit” Click-it EdU Alexa Flour 594 (Invitrogen). As lâminas foram incubadas em uma mistura composta pelo tampão de reação Click-it (86%), CuSO₄ (4%), Alexa Fluor Azida 594 e tampão de reação aditiva (10%) por 30 min à temperatura ambiente no escuro, sob uma lamínula de plástico. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS por 5 min, seguido por FISH, como descrito anteriormente (Ma et al., 2010), e montadas em DAPI/Antifade.

Extração de RNA, síntese de DNAc e RT-PCR

O RNA total foi isolado a partir de anteras, selecionadas em um estágio entre a meiose e o desenvolvimento do pólen maduro, utilizando o método de Trizol (Chomczynski e Mackey, 1995). Para eliminar a contaminação de DNA genômico, foi realizada a digestão com Ambion TURBO DNase (www.invitrogen.com). A DNase foi posteriormente desativada seguindo as instruções do fabricante. A ausência de DNA genômico foi confirmada por PCR com *primers* específicos para a sequência Bilby em RNA tratados com DNase. O DNAc foi sintetizado a partir de 1,5 µg de RNA total (First Strand Synthesis Kit de cDNA, Fermentas). A RT-PCR foi realizada como descrito por Carchilan et al. (2007). A mistura da PCR continha 75 ng de DNAc, 1 mM de cada *primer* (regiões 1RT, 2RT, 3RT, 4RT e 6RT, ver Tabela Suppl. 1 em Carchilan et al., 2007), tampão, trifosfato de desoxinucleotídeo e uma unidade de polimerase Taq. Foram realizados 35 ciclos de amplificação (45 s a 95 °C, 1 min a 64 °C, e 2 min a 72 °C) para os transcritos de E3900 e D1100 e 25 ciclos para os genes de controle GAPDH e EF α -1, respectivamente. Os experimentos de RT-PCR foram repetidos três vezes para confirmação do resultado.

Resultados

O B de centeio mostra a mesma composição de DNA em diferentes populações

A fim de comparar a estrutura do B de diferentes origens, o B foi subdividido em três regiões principais de acordo com a localização das sequências utilizadas como sondas (Fig. 1): (I) região pericentromérica, composta pelas sequências Sc11 e DNA mitocondrial; (II) região terminal de controle da não-disjunção, composta pelas sequências D1100, E3900, Sc26c82 e Sc9c130; (III) região intersticial do braço longo, composta por

blocos distintos de sequências repetidas em tandem Sc36c82, Sc55c1 e Sc63c34 e de DNA plastidial e mitocondrial.

Independentemente da origem dos genótipos de centeio todos os Bs revelaram uma distribuição similar de sinais de hibridização na região pericentromérica (Sc11), intersticial (Sc36c82) e terminal (D1100) (Fig. 2a-g, Fig. supl. 1 e 2). A distribuição de Sc11, Sc36c82 e Sc55c1 revelou uma marcação fraca ao longo dos cromossomos A, ao contrário dos Bs, e revelou padrões diferentes entre os genótipos (Fig. 2c, Fig. supl. 1a, d). A hibridização *in situ* do retroelemento Revolver revelou uma marcação preferencial ao longo dos Bs, enquanto o retroelemento Sabrina mostrou uma marcação menos intensa ao longo dos Bs em comparação com os cromossomos A (Fig. 2h-i', Fig. supl. 1b e 2). Dessa forma, a distribuição cromossômica das sequências repetitivas analisadas nos Bs de centeio se encontra conservada, independente da origem geográfica das populações.

Análise comparativa com DNA de organelas e microsatélite (CAA)₁₀ revelam polimorfismos estruturais fixados no B de centeio

A hibridização *in situ* do DNA plastidial e mitocondrial revelou que a forma padrão do B de centeio é representada por duas variantes estruturais. Cromossomos B de centeio cultivado do Japão, Coréia do Sul, China e Irã revelaram o maior sítio de DNA plastidial na região proximal do braço longo, distalmente ao sítio pericentromérico do DNA mitocondrial, e um sinal adicional pequeno na região intersticial (Fig. 3a-d e 3j). Por outro lado, os Bs de centeio cultivado da Turquia e do centeio silvestre do Afeganistão e do Paquistão exibiram o maior sítio do DNA plastidial no braço curto. Esta variante do B apresentou a maior parte do sítio pericentromérico de DNA mitocondrial no braço curto, ao contrário do observado na forma padrão anteriormente conhecida (Fig. 3e-g e 3j). Sinais de DNA mitocondrial e plastidial também foram encontrados nos cromossomos A, embora com intensidade muito menor (Fig. 3g, insertos destacados).

Para testar se uma inversão do braço curto do B, incluindo a região pericentromérica, foi responsável pela origem do polimorfismo observado, foi utilizada a sonda do microsatélite (CAA)₁₀, que revela um sítio terminal e outro mais proximal no braço curto do B padrão (Marques et al., 2012), em combinação com a sonda de DNA plastidial (Fig. 3c-i). Os Bs apresentaram dois padrões distintos de marcação. Os Bs do centeio cultivado do Japão, Coréia do Sul, China e Irã revelaram a mesma distribuição de sinais como reportado para o B padrão anteriormente, exibindo o maior sítio de DNA

plastidial na região proximal do braço longo, e dois pequenos sítios de (CAA)₁₀ no braço curto (Fig. 3h). Em contraste, os Bs do centeio cultivado da Turquia e do centeio silvestre do Afeganistão e do Paquistão, apresentaram o sinal de DNA plastidial no braço curto e apenas o sítio de hibridização mais terminal do microsatélite (CAA)₁₀ no braço curto. Um segundo sítio de (CAA)₁₀ foi encontrado na região proximal do braço curto do B (Fig. 3i). Nenhum sítio telomérico intersticial foi encontrado nessa variante (Fig. 3g'). Essas diferenças foram ainda mais evidentes em cromossomos prometafásicos (Fig. 3j). Portanto, a forma padrão do B de centeio é representada por duas variantes estruturais distinguíveis por uma inversão pericêntrica (Fig. 4).

As propriedades da região de controle da não-disjunção dos Bs de centeio são conservadas

Para determinar se a região de controle da não-disjunção é conservada nos Bs de diferentes origens, foi comparado a composição do DNA, a distribuição de histona H3 trimetilada na lisina 4 (H3K4me3), o padrão de replicação do DNA e a transcrição dos elementos D1100 e E3900.

Todas as sequências repetitivas localizadas na região de controle da não-disjunção do B padrão foram encontradas em todos os Bs de centeio de diferentes origens, como ilustrado na Figura 1. Apenas o B de centeio silvestre do Afeganistão mostrou uma redução dos sinais específicos de E3900, enquanto todas as outras sequências não revelaram redução detectável de intensidade dos sinais de hibridização (Fig. 3g seta no B na parte inferior; 3j).

A Imunocoloração com o anticorpo específico contra histona H3K4me3, uma das marcas específicas de eucromatina, revelou um forte sinal na região terminal heterocromática do braço longo nos Bs do centeio silvestre do Afeganistão e do Paquistão, co-localizado com os sinais de E3900 (Fig. 5). O cromossomo B de centeio silvestre do Afeganistão, que mostrou uma redução no número de *repeats* de E3900, mostrou também redução da marcação com anti-H3K4me3 (Fig. 5b, cromossomos destacados). Em contraste, os blocos de heterocromatina terminal dos As que são positivamente corados com DAPI foram negativos para H3K4me3. Além disso, as regiões pericentroméricas de todos os cromossomos A e B foram desprovidas de sinais de H3K4me3 (Fig. 5).

Para verificar se a redução no número de *repeats* de E3900 e H3K4me3 no B de centeio silvestre do Afeganistão estaria envolvida na expressão dos transcritos de E3900, foi realizada uma análise da transcrição desse elemento. Para caracterizar as sequências transcritas, foram realizados experimentos de RT-PCR com RNA total isolados de anteras de plantas com B e sem B de centeio de diferentes origens. Transcritos de E3900 foram amplificados a partir de cinco sub-regiões da sequência E3900 (1RT, 2RT, 3RT, 4RT e 6RT), utilizando os *primers* descritos por Carchilan et al. (2007), que mostram diferentes níveis de expressão (Figura 6a). Como controle, RT-PCR com *primers* específicos para o fator de alongamento eEF1- α e GAPDH mostrou um rendimento comparável em todos os genótipos indicando que as diferenças não foram devidas a quantidade desigual de DNA na reação. Notavelmente, apesar de o mesmo número de ciclos de PCR ter sido utilizado para amplificar as diferentes sub-regiões de E3900, as regiões 4RT e 6RT revelaram o maior nível de transcrição geral como referido anteriormente por Carchilan et al. (2007). Para todos os fragmentos de E3900 observou-se que a expressão em centeio cultivado da China (2B e 4B) e Turquia (2B) é muito maior do que em centeio cultivado do Irã (2B) e centeio silvestre do Afeganistão (2B) e Paquistão (2B e 4B). No entanto, a expressão do D1100 foi inferior em comparação com E3900 como já demonstrado por Carchilan et al. (2007) e a expressão máxima foi detectada nas plantas da China (2B e 4B). Embora, o B de centeio silvestre do Afeganistão tenha revelado uma redução no número de *repeats* do elemento E3900, nossa análise não mostrou uma diferença significativa de expressão em plantas 2B do Afeganistão em comparação com plantas 2B do Paquistão (Figura 6b).

Para caracterizar ainda mais a região de controle da não-disjunção dos Bs de centeio silvestre, foi analisado o comportamento de replicação tardia do DNA por incorporação de EdU. Sabe-se que a região que apresenta o *timing* de replicação do DNA mais tardio está localizada nos Bs (Lima-de-Faria e Jaworska, 1972). A aplicação de FISH sequencial utilizando como sondas as sequências Sc26c82 e E3900, localizadas na região de controle da não-disjunção do B, permitiu identificar que Sc26c82 foi a sequência mais tardiamente replicada do genoma, uma vez que esta mostrou co-localização precisa com os sinais de EdU mais tardiamente incorporados (Figura 7a). No entanto, o elemento de repetição E3900 não demonstrou qualquer sinal de replicação tardia de DNA. De fato, foi observado que E3900 se comporta como eucromatina em interfase sofrendo descondensação, como previamente relatado (Carchilan et al., 2007), e não incorporou EdU durante a replicação tardia do DNA ao contrário de Sc26c82 (Figura 7b).

Discussão

A estrutura do cromossomo B de centeio é conservada e contraria sua natureza não essencial no genoma hospedeiro

O cromossomo B de centeio mostrou uma composição estrutural conservada entre todas as populações analisadas, mesmo entre centeio cultivado e silvestre. Todos os Bs apresentaram a mesma composição de sequências e foram divididas em três regiões de acordo com sua distribuição no cromossomo (pericentromérica, intersticial e terminal), e está de acordo com a distribuição de sequências reportada para o B da linhagem de centeio 7415 (Martis et al., 2012; Klemme et al., em prep.). Esses resultados confirmam a origem monofilética do B de centeio, proposta por Niwa e Sakamoto (1995). A conservação em diversas populações de todas as sequências testada é inesperada, uma vez que a aparente natureza não essencial do B favoreceria o acúmulo de mutações e eventuais polimorfismos estruturais. De fato, tem sido encontrada uma taxa mais alta de mutações de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) em sequências gênicas do B de centeio que em sequências homólogas dos As, refletindo uma pressão seletiva reduzida para essas sequências nos Bs (Martis et al., 2012).

Em muitas espécies têm sido relatadas variantes estruturais do cromossomo B derivadas de um único tipo padrão (para revisão ver Jones, 1995). Em muitos casos, pode haver apenas dois tipos, como as formas metacêntrica e telocêntrica de *Aegilops mutica* (Mochizuki, 1960) ou grande e micro Bs em *Brachycome dichromosomatica* (Houben et al., 1999; Marschner et al., 2007a). Em outras espécies, como em *Allium schoenoprasum*, foram descritas sete formas diferentes do B em populações naturais (Bougourd e Parker, 1979). Em centeio todas as populações analisadas apresentaram cromossomos B com a mesma morfologia e tamanho, tanto em centeio cultivado quanto em centeio silvestre (Niwa e Sakamoto, 1995). No entanto, apesar da aparente uniformidade morfológica, algumas populações naturais de centeio apresentam uma inversão pericêntrica no cromossomo B, evidenciada pela posição de sequências de DNAs mitocondrial, plastidial e o microssatélite (CAA)₁₀, que aparentemente não alterou sua morfologia.

A observação de que o B padrão de centeio está representado por duas variantes estruturais devido a uma inversão pericêntrica, encontradas em populações naturais, é muito importante para entender a evolução dos cromossomos B. A origem do B de centeio deve ter ocorrido há 1,1-1,3 M.a, pouco depois da formação do gênero *Secale*,

cerca de 1,7 M.a. (Martis et al., 2012). Curiosamente, a estrutura do B de centeio parece mais conservada do que a dos cromossomos A, uma vez que são conhecidos diferentes padrões de sequências repetidas em tandem nos As de diferentes acessos (Zhou et al., 2010). Devido ao B de centeio ser composto principalmente de sequências repetidas em tandem era esperada uma maior frequência de polimorfismos de sequências repetitivas. A análise detalhada da morfologia de cromossomos paquitênicos também revelou algumas pequenas variações nos padrões de cromômeros do B de centeio (Lima-De-Faria, 1963). Em centeio, diversas variações estruturais do B têm sido relatadas em cruzamentos experimentais (Jimenez et al., 1995), mas sempre como estruturas efêmeras que não se mantêm em populações cultivadas. Variações desse tipo parecem estar associadas a erros de divisão centromérica e deleções de partes do braço longo (Marques et al., 2012).

A descoberta de que o B de centeio está representado naturalmente por duas variantes estruturais, que diferem por uma inversão pericêntrica e tamanho do sinal de E3900 na região de controle da não-disjunção sugere um maior índice de rearranjos nas regiões proximal e terminal. De fato, a análise de trocas de cromátides-irmãs em mitose revelou um nível mais elevado de recombinação nas regiões pericentromérica e terminal que nessas mesmas regiões dos cromossomos A (Klemme et al., em prep.). Essas regiões parecem também estar envolvidas na formação de alterações estruturais do B (Marques et al., 2012).

As propriedades da região terminal do cromossomo B de centeio e seu envolvimento no controle da não-disjunção

A região terminal do B é essencial para o mecanismo de não-disjunção e é composta principalmente por famílias de sequências repetidas em tandem (Sandery et al., 1990; Blunden et al., 1993; Klemme et al., em prep.). A observação de que o B de populações silvestres de centeio do Afeganistão apresentou uma redução do sinal de E3900/H3K4me3 sugere uma associação preferencial dessas marcas e permite testar o envolvimento dessa sequência repetitiva no mecanismo de acumulação do B.

Trabalhos anteriores evidenciaram que variedades de centeio que possuem Bs com um menor comprimento da região terminal do braço longo apresentam também um decréscimo na taxa de transmissão do B (Lima-De-Faria, 1963; ver Tabela 1 em Jones e Puertas, 1993). Posteriormente, foram identificados e localizados *in situ* dois elementos de repetição D1100 e E3900 nesse domínio terminal (Sandery et al., 1990; Blunden et al.,

1993; Wilkes et al., 1995). Uma análise extensa desta região revelou um elevado grau de instabilidade em suas sequências de DNA, e um potencial de amplificação associado com o elemento E3900, localizado principalmente na parte mais distal da região de controle da não-disjunção (Langdon et al., 2000). Aparentemente esse polimorfismo de sequências pode estar envolvido no equilíbrio de transmissão do B, uma vez que pequenas alterações na quantidade relativa de sequências E3900 podem alterar a condensação e o pareamento meiótico dos Bs. De fato, a redução do sinal de E3900/H3K4me3 em amostras das populações do Afeganistão pode estar relacionada com uma baixa taxa de transmissão reportada para esse B (Niwa e Sakamoto, 1995). No entanto, Bs de populações do Paquistão não apresentaram redução do sinal de E3900/K3K4me3, embora a frequência de plantas com Bs nessas populações foi muito baixa indicando uma baixa taxa de transmissão do B (Niwa e Sakamoto, 1996). Esses dados sugerem que não somente a redução do elemento E3900 esteja envolvida na redução da taxa de transmissão do B, mas que outros fatores, como por exemplo, o nível de expressão dessas sequências esteja envolvido nesse processo.

Dados anteriores mostraram que E3900 apresenta um nível mais elevado de atividade transcricional do que D1100, suportando a associação preferencial de H3K4me3 com o elemento de repetição E3900 (Carchilan et al., 2007). Adicionalmente, foi observado que a expressão dos transcritos B-específicos revelou flutuações entre os diferentes genótipos. Com base na expressão dessas sequências foi possível separar os Bs em dois grupos: aqueles presentes nas populações da China e Turquia, que mostraram níveis mais elevados de expressão de transcritos de E3900 e D1100, e os demais Bs provenientes de populações do Irã, Afeganistão e Paquistão, além do centeio de referência, todos com um nível menor de expressão de transcritos de E3900 e D1100. O reduzido nível de expressão de E3900 no B do Afeganistão não parece ter decorrido da redução do sinal de E3900/H3K4me3. Visto que as populações do Irã, Paquistão e centeio de referência, que não mostram redução do sinal de E3900/H3K4me3, também apresentaram uma redução no nível de expressão de E3900. Isso sugere que nem todos os loci de E3900 são transcricionalmente ativos e, provavelmente, aqueles com atividade transcricional são mais conservados. Além disso, a diferenciação da taxa de expressão das sequências D1100 e E3900 em dois grupos não parece ter relação com tipo de variante do B, uma vez que foi observado que o B da população da Turquia mostrou expressão substancialmente superior comparado aos do Afeganistão e Paquistão, embora compartilhem o mesmo polimorfismo estrutural.

A região terminal de controle da não-disjunção do B apresenta características típicas de heterocromatina por ser positiva para bandeamento C (Jones e Puertas, 1993) e composta principalmente por duas famílias de sequências repetitivas (D1100 e E3900). Entretanto, essa região sofre descondensação durante interfase e apresenta trimetilação de H3K4 e atividade transcricional, que são características da eucromatina (Carchilan et al., 2007; presente trabalho). Além disso, a região que apresenta o *timing* de replicação do DNA mais tardio em plantas com B está relacionada exclusivamente com a sequência repetitiva Sc26c82 (Klemme et al., em prep.), localizada na região terminal do B entre os blocos dos elementos repetitivos D1100 e E3900. De fato, a região da sequência Sc26c82 não sofre descondensação em interfase e não mostra qualquer atividade transcricional. Isso sugere que a região heterocromática do B esteja composta principalmente por sequências Sc26c82. Como os sistemas de reparo do DNA são menos eficientes em regiões heterocromáticas com replicação tardia que nas regiões eucromáticas de replicação precoce, essas primeiras tendem a acumular maior taxa de rearranjos (Herrick, 2011). No entanto, o bloco de sequências Sc26c82 não apresentou qualquer polimorfismo detectável entre os Bs das diferentes populações analisadas.

Esses resultados suportam a hipótese de que os elementos D1100 e E3900 estão envolvidos com o mecanismo de não-disjunção do B de centeio (Carchilan et al., 2007). Embora nenhum elemento de controle para este processo tenha sido caracterizado no domínio B-específico, a deleção desta região conduz a uma perda da não-disjunção durante a primeira mitose do pólen, indicando o seu envolvimento direto nesse processo (revisado em Jones, 2012). O processo de não-disjunção é geneticamente regulado e ocorre apenas no gametófito, mas não se pode excluir a hipótese de que ele esteja relacionado com a presença de uma combinação única de marcas de cromatina e RNA não-codificante em células haploides.

Conclusões

A presente análise reporta uma relativa conservação da estrutura cromossômica do B nos diferentes genótipos de centeio analisados, ao contrário do esperado. A variação entre os cromossomos A é mais evidente que as poucas alterações estruturais observadas no B. Uma explicação para isso é que uma estrutura única da cromatina, composição de DNA e da atividade transcricional seja de grande importância funcional

para o mecanismo de acumulação dos Bs. A identificação de duas variantes estruturais do B, que diferem entre si por uma inversão pericêntrica e pequenas alterações na expressão de ambos os elementos D1100 e E3900, revela alguns dos processos envolvidos na sua evolução. Considerando que a origem do centeio seja na Turquia, é provável que a forma do B encontrada no centeio cultivado na Turquia bem como no silvestre do Afeganistão e Paquistão seja a primeira surgida no gênero. Posteriormente, esse cromossomo B teria sofrido uma inversão pericêntrica originando a forma do B padrão encontrada na maioria dos acessos atuais que possuem Bs.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Leibniz-Institute of Plant Genetics e Crop Plant Research pelo suporte financeiro.

Referências

- Blunden R, Wilkes TJ, Forster JW, Jimenez MM, Sandery MJ *et al.*: Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome* 36: 706-711 (1993).
- Bougourd SM, Parker JS: B-chromosome system of *Allium schoenoprasum*. II. Stability, inheritance and phenotypic effects. *Chromosoma* 75: 369-383 (1979).
- Carchilan M, Delgado M, Ribeiro T, Costa-Nunes P, Caperta A *et al.*: Transcriptionally active heterochromatin in rye B chromosomes. *Plant Cell* 19: 1738-1749 (2007).
- Carchilan M, Kumke K, Mikolajewski S, Houben A: Rye B chromosomes are weakly transcribed and might alter the transcriptional activity of A chromosome sequences. *Chromosoma* 118: 607-616 (2009).
- Chomczynski P, Mackey K: Short technical reports. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19: 942-945 (1995).
- Endo TR, Nasuda S, Jones N, Dou Q, Akahori A *et al.*: Dissection of rye B chromosomes, and nondisjunction properties of the dissected segments in a common wheat background. *Genes and Genetic Systems* 83: 23-30 (2008).
- Hakansson A: Behaviour of accessory rye chromosomes in the embryo-sac. *Hereditas* 34: 35-59 (1948).
- Hasegawa N: A cytological study on 8-chromosome rye. *Cytologia* 6: 68-77 (1934).
- Herrick J: Genetic variation and DNA replication timing, or why is there late replicating DNA? *Evolution* 65: 3031-3047 (2011).
- Houben A, Kynast RG, Heim U, Hermann H, Jones RN *et al.*: Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 105: 97-103 (1996).

- Houben A, Thompson N, Ahne R, Leach CR, Verlin D *et al.*: A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 219: 127-135 (1999).
- Houben A, Carchilan M (2012) Plant B chromosomes – What makes them different ?, pp. 345 in *Plant Cytogenetics: Genome Structure and Chromosome Function*, edited by H. W. BASS and J. A. BIRCHLER. Springer-Verlag, New York.
- Jimenez MM, Romera F, Gallego A, Puertas MJ: Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. II. 0Bx2B crosses. *Heredity* 74: 518-523 (1995).
- Jones RN, Puertas MJ (1993) The B-chromosomes of rye (*Secale cereale* L.), pp. 81-112 in *Frontiers in Plant Science Research*, edited by K. K. DHIR and T. S. SAREEN. Bhagwati Enterprises, Delhi, India.
- Jones RN: Tansley review n° 85 - B chromosomes in plants. *New Phytologist* 131: 411-434 (1995).
- Jones RN, Houben A: B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science* 8: 417-423 (2003).
- Jones RN: B chromosomes in plants. *Plant Biosystems* 146: 727-737 (2012).
- Langdon T, Jenkins G, Seago C, Jones RN, Ougham H *et al.*: De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics* 154: 869-884 (2000).
- Lima-De-Faria A: The evolution of the structural pattern in a rye B-chromosome. *Evolution* 17: 289-295 (1963).
- Lima-de-Faria M, Jaworska H: The relation between the chromosome size gradient and the sequence of DNA replication in rye. *Hereditas* 70: 39-58 (1972).
- Ma L, Vu GTH, Schubert V, Watanabe K, Stein N *et al.*: Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. *Chromosome Research* 18: 841-850 (2010).
- Marques A, Fuchs J, Ma L, Heckmann S, Guerra M *et al.*: 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 (2011).
- Marques A, Klemme S, Guerra M, Houben A: Cytomolecular characterization of de novo formed rye B chromosome variants. *Molecular Cytogenetics* 5: 34-37 (2012).
- Marschner S, Kumke K, Houben A: B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* show a reduced level of euchromatic histone H3 methylation marks. *Chromosome Research* 15: 215-222 (2007).
- Martis MM, Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Blattner FR, Macas J *et al.*: Selfish supernumerary chromosome reveals its origin as a mosaic of host genome and organellar sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109: 13343-13346 (2012).
- Mochizuki A: A note on the B-chromosomes in natural populations of *Aegilops mutica* Boiss. in central Turkey. *Wheat Information Service* 11: 31-31 (1960).
- Morais-Cecílio L, Delgado M, Jones RN, Viegas W: Painting rye B chromosomes in wheat: interphase chromatin organization, nuclear disposition and association in plants with two, three or four Bs. *Chromosome Research* 4: 195-200 (1996).
- Muñoz-Pajares A, Martinez-Rodriguez L, Teruel M, Cabrero J, Camacho JPM *et al.*: A single, recent origin of the accessory B chromosome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Genetics* 187: 853-863 (2011).
- Müntzing A: Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. V. A new fragment type arisen by deletion. *Hereditas* 34: 435-442 (1948).
- Niwa K, Sakamoto S: Origin of B chromosomes in cultivated rye. *Genome* 38: 307-312 (1995).
- Niwa K, Sakamoto S: Detection of B chromosomes in rye collected from Pakistan and China. *Hereditas* 124: 211-215 (1996).
- Sandery MJ, Forster JW, Blunden R, Jones RN: Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome* 33: 908-913 (1990).
- Tsujimoto H, Niwa K: DNA structure of the B chromosomes of rye revealed by *in situ* hybridization using repetitive sequences. *Japanese Journal of Genetics* 67: 233-241 (1992).
- Wilkes TM, Francki MG, Langridge P, Karp A, Jones RN *et al.*: Analysis of rye B chromosome structure using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Research* 3: 466-472 (1995).

- Zhou JP, Yang ZJ, Li GR, Liu C, Tang ZX *et al.*: Diversified chromosomal distribution of tandemly repeated sequences revealed evolutionary trends in *Secale* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 287: 49-56 (2010).
- Zohary D, Hopf M (2000) Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Oxford University Press Inc., New York, United States.

Legenda das figuras

Figura 1. Distribuição de sequências localizadas no cromossomo B padrão de centeio mostrando sequências repetitivas B-específicas, não específicas, retroelementos, sítios de DNA de organelas e de microssatélites. (I) sequências pericentroméricas, (II) sequências localizadas na região de controle da não-disjunção, (iii) sequências localizadas na região intersticial.

Figura 2. Conservação estrutural do B entre as diferentes populações analisadas como evidenciada pela composição homóloga das sequências localizados nas regiões pericentromérica (Sc11), intersticial (Sc36c82) e terminal (D1100) do cromossomo B de centeio cultivado (**a-e** e **h-h'**) e silvestre (**f-g** e **i-i'**) de diferentes acessos. **a** Japão, **b** Coréia do Sul, **c** China, **d** Irã, **e** Turquia, **f** Paquistão, **g** Afeganistão, **h-h'** Japão e **i-i'** Afeganistão. Sondas aplicadas em **a-g** são indicadas por suas siglas nas respectivas cores em **g** e sondas aplicadas em **h-i'** são indicadas individualmente. Cabeças de seta apontam cromossomos B. Barra em **a** corresponde a 20 µm.

Figura 3. O B de centeio está representado por duas variantes estruturais, que diferem na distribuição de sinais de hibridização de DNA plastidial, DNA mitocondrial (**a-g**) e do microssatélite (CAA)₁₀ (**h-i**) e redução do sinal de E3900 (**g**). **a** Japão, **b** Coréia do Sul, **c** China, **d** Irã, **e** Turquia, **f** Paquistão, **g-g'** Afeganistão, **h** tipo B padrão de centeio (variedade JNK) e **i** B variante do Paquistão. **g'** Cromossomo B de centeio silvestre do Afeganistão hibridizado com as sondas de DNA plastidial (vermelho) e telomérica (verde). **j** Comparação entre cromossomos B prometafásicos de centeio cultivado (JNK) e silvestre (Afeganistão). Sondas aplicadas em **a-g**: DNA plastidial (vermelho) e mitocondrial (verde) e E3900 (amarelo); **h-i**: DNA plastidial (vermelho), (CAA)₁₀ (verde) e D1100 (amarelo). Cabeças de seta apontam cromossomos B, seta em **g** aponta sítio reduzido de E3900 e

setas em **h-i** apontam sítios invertidos de (CAA)₁₀. Linhas tracejadas em **h-i** indicam posição centromérica. Barra em **i** corresponde a 20 μ m.

Figura 4. Esquema das mudanças estruturais ocorridas durante a evolução do cromossomo B de centeio. Setas indicam a direção do evento.

Figura 5. Imunocoloração para histona H3 trimetilada na lisina 4 (H3K4me3) e FISH sequencial com E3900 em centeio silvestre do Paquistão (**a-a'**) e do Afeganistão (**b-b'**). Insertos em **a'** e **b'** destacam cromossomos B hibridizados com a sonda E3900. Cabeças de seta apontam cromossomos B. Barra em **a** corresponde a 20 μ m.

Figura 6. Transcrição dos elementos E3900 e D1100 localizados na região de controle da não-disjunção do B de centeio. A transcrição das sequências E3900 e D1100 foi analisada utilizando DNAc sintetizado a partir de RNA de anteras e *primers* para diferentes regiões de E3900 e D1100 de acordo com (Carchilan et al., 2007). gDNA = DNA genômico. A quantidade igual de DNAc de cada genótipo foi confirmada com *primers* para os genes GAPDH e fator de alongamento 1 alfa, utilizados como controle.

Figura 7. Marcação com EdU do DNA replicado mais tardiamente e FISH com sequências B-específicas da região de controle da não-disjunção revelam co-localização preferencial com o bloco heterocromático de Sc26c82. Incorporação com EdU e FISH com a sonda **a** Sc26c82 e **b** com as sondas E3900 e Sc26c82. Insertos em **a** destacam núcleo interfásico com as duas regiões mais tardiamente replicadas associadas com a sequência Sc26c82. Barra em **b** corresponde a 20 μ m.

Figuras suplementares

Figura suppl. 1. Hibridização de sequências localizadas no cromossomo B de centeio cultivado de diferentes acessos. **a-c** China, **d-e** Japão. Sondas aplicadas são identificadas pelas cores de suas siglas. Cabeças de seta apontam cromossomos B. Insertos em **c**, **e** destacam padrão de hibridização de Sc9c130 e Sc36c82, respectivamente. Barra em **e** corresponde a 20 μ m.

Figura supl. 2. Hibridização de sequências localizados no cromossomo B de centeio silvestre do **a-c** Afeganistão e do **d-f** Paquistão. Sondas aplicadas são identificadas pelas cores de suas siglas. Cabeças de seta apontam cromossomos B. Barra em **f** corresponde a 20 μm .

Figuras

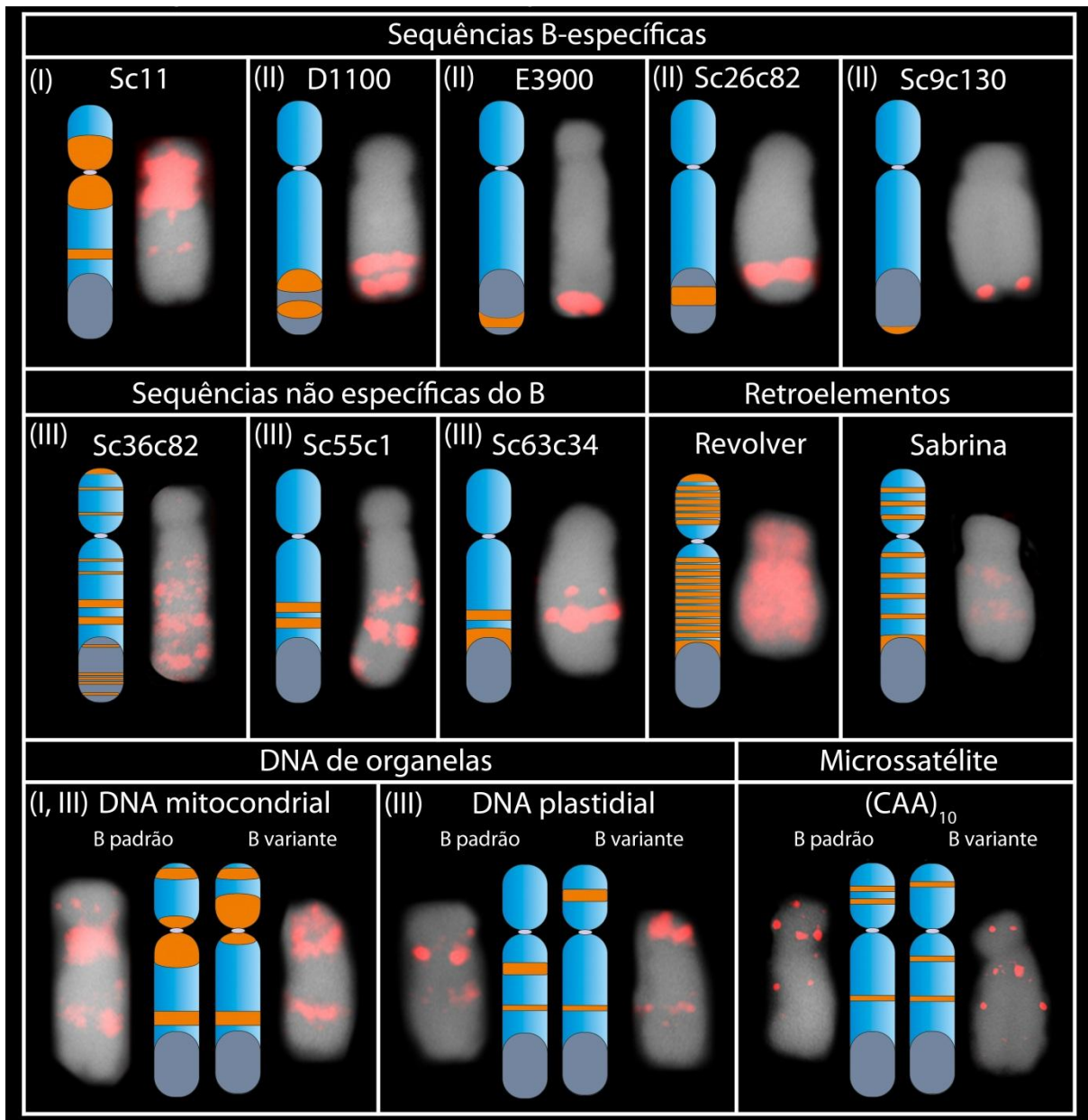


Figura 1

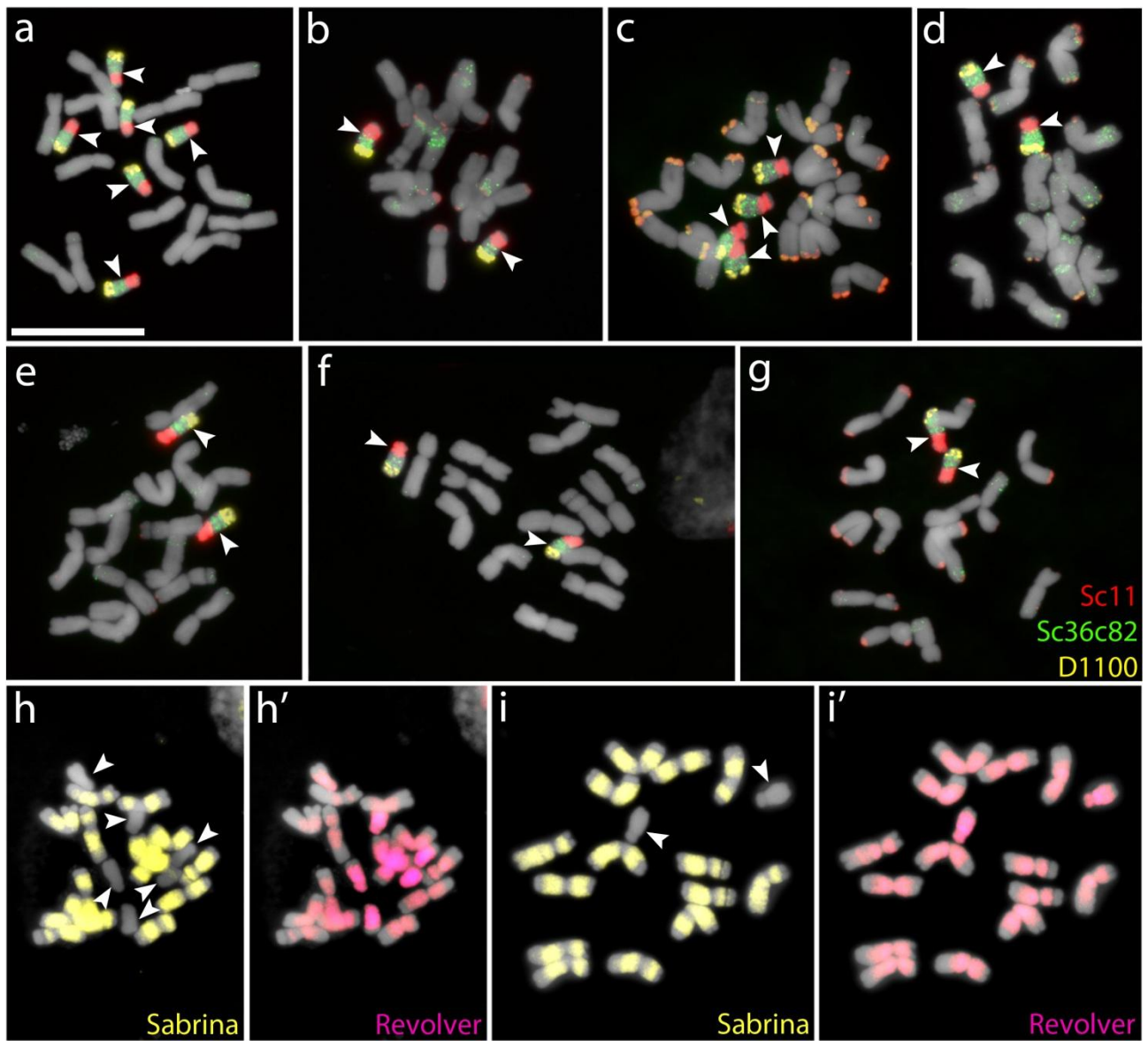


Figura 2

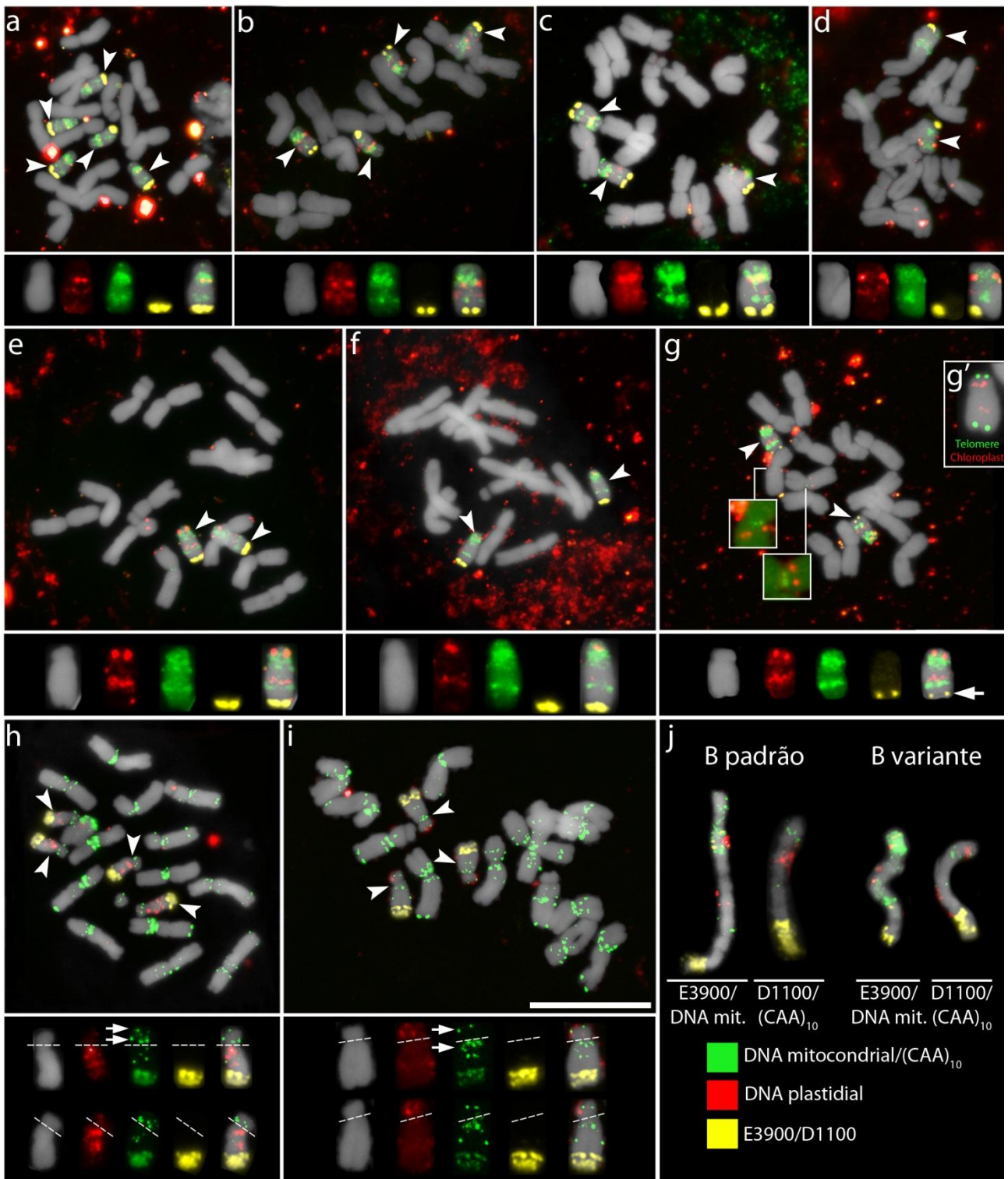


Figura 3

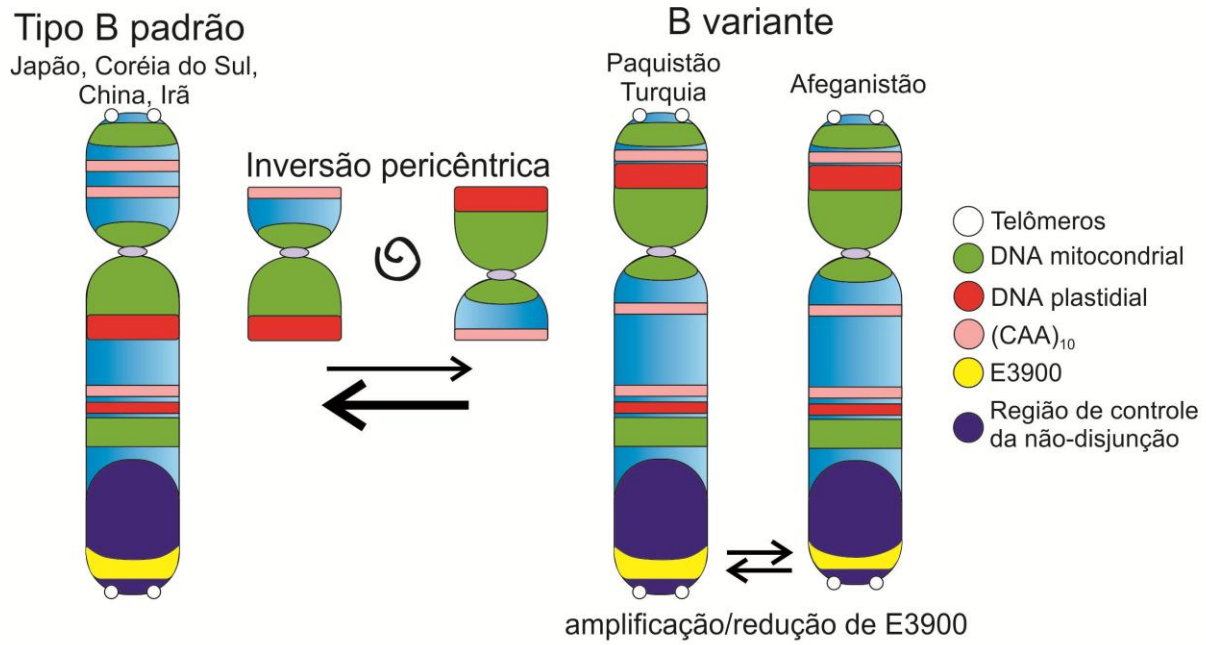


Figura 4

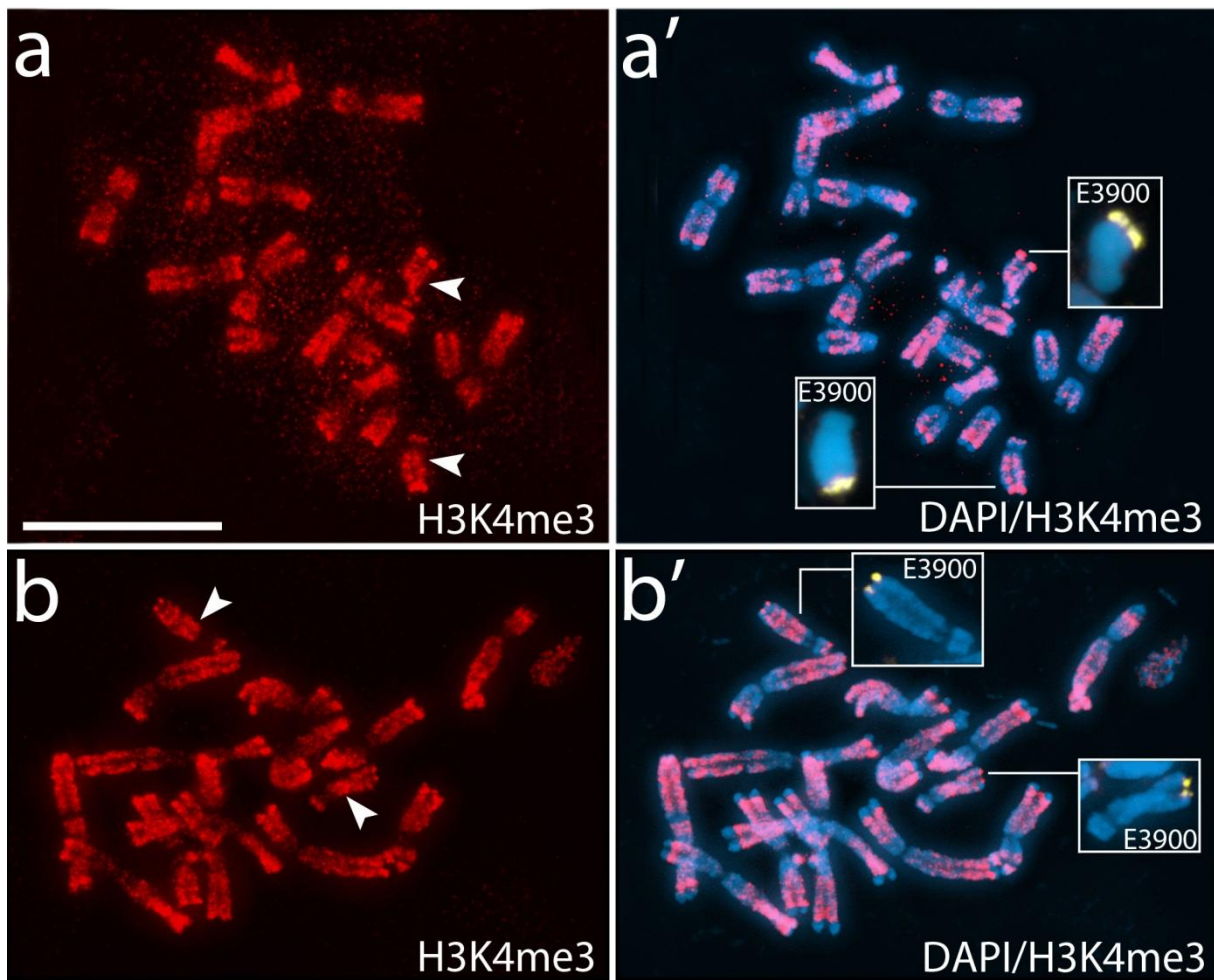


Figura 5

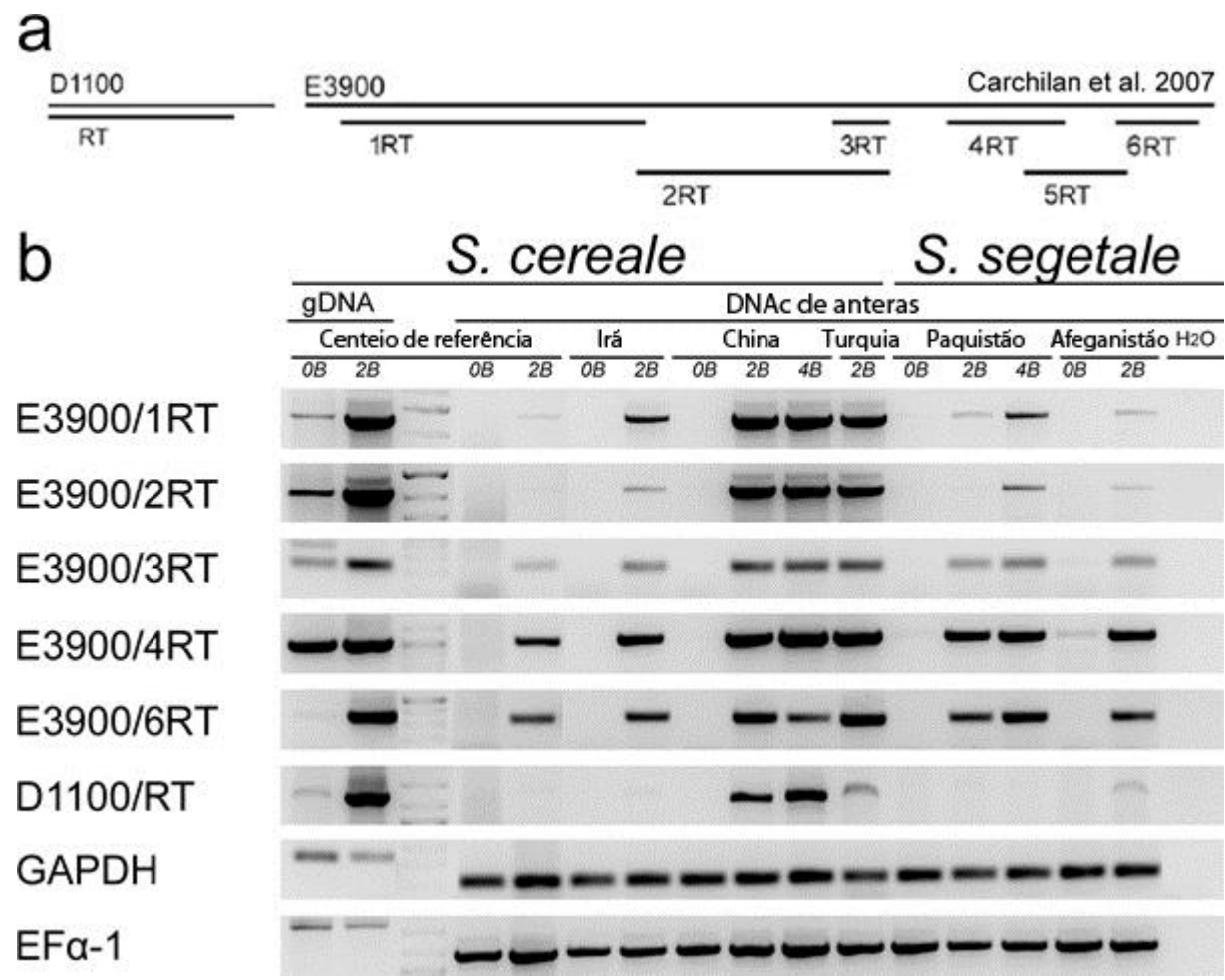


Figura 6

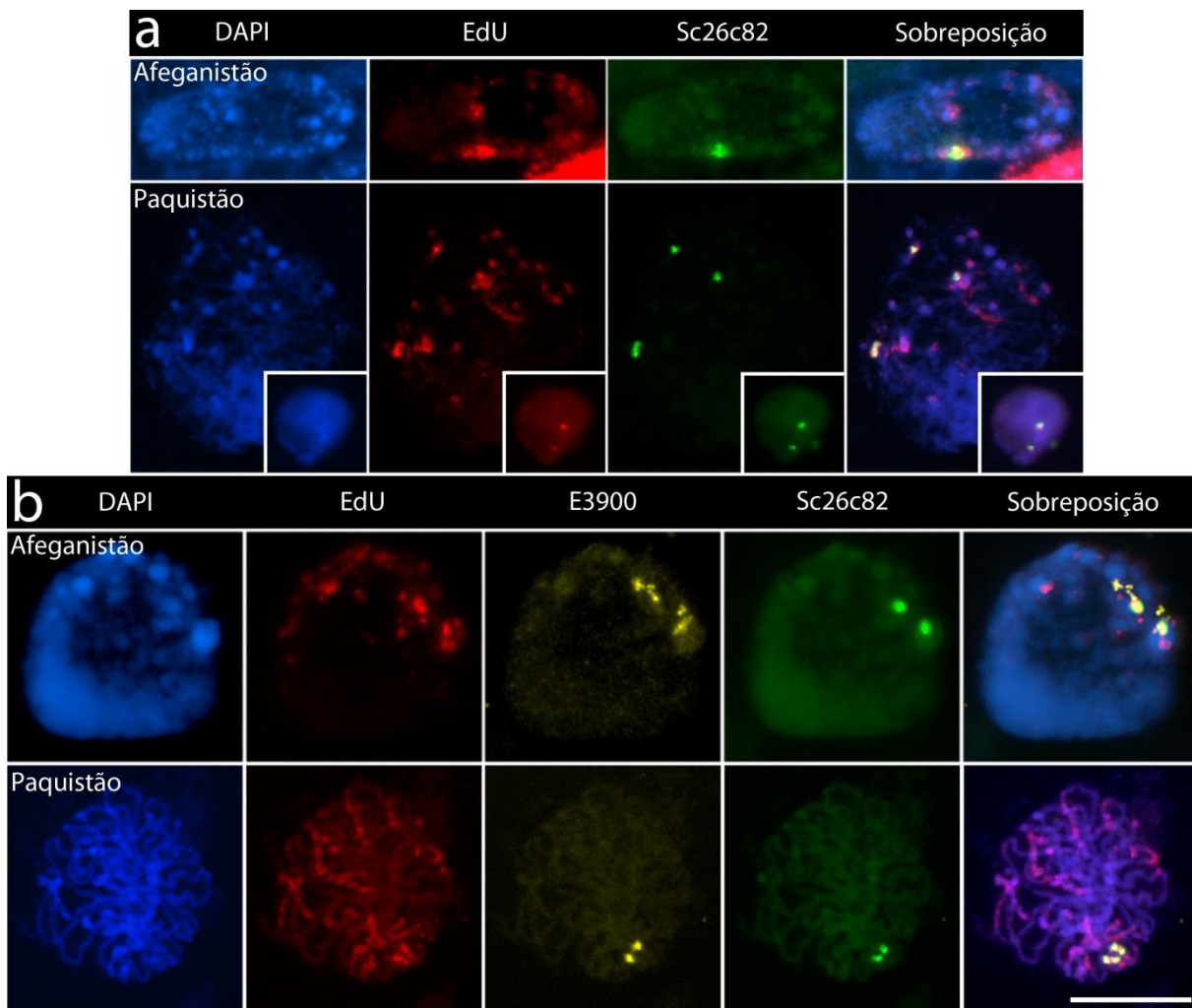


Figura 7

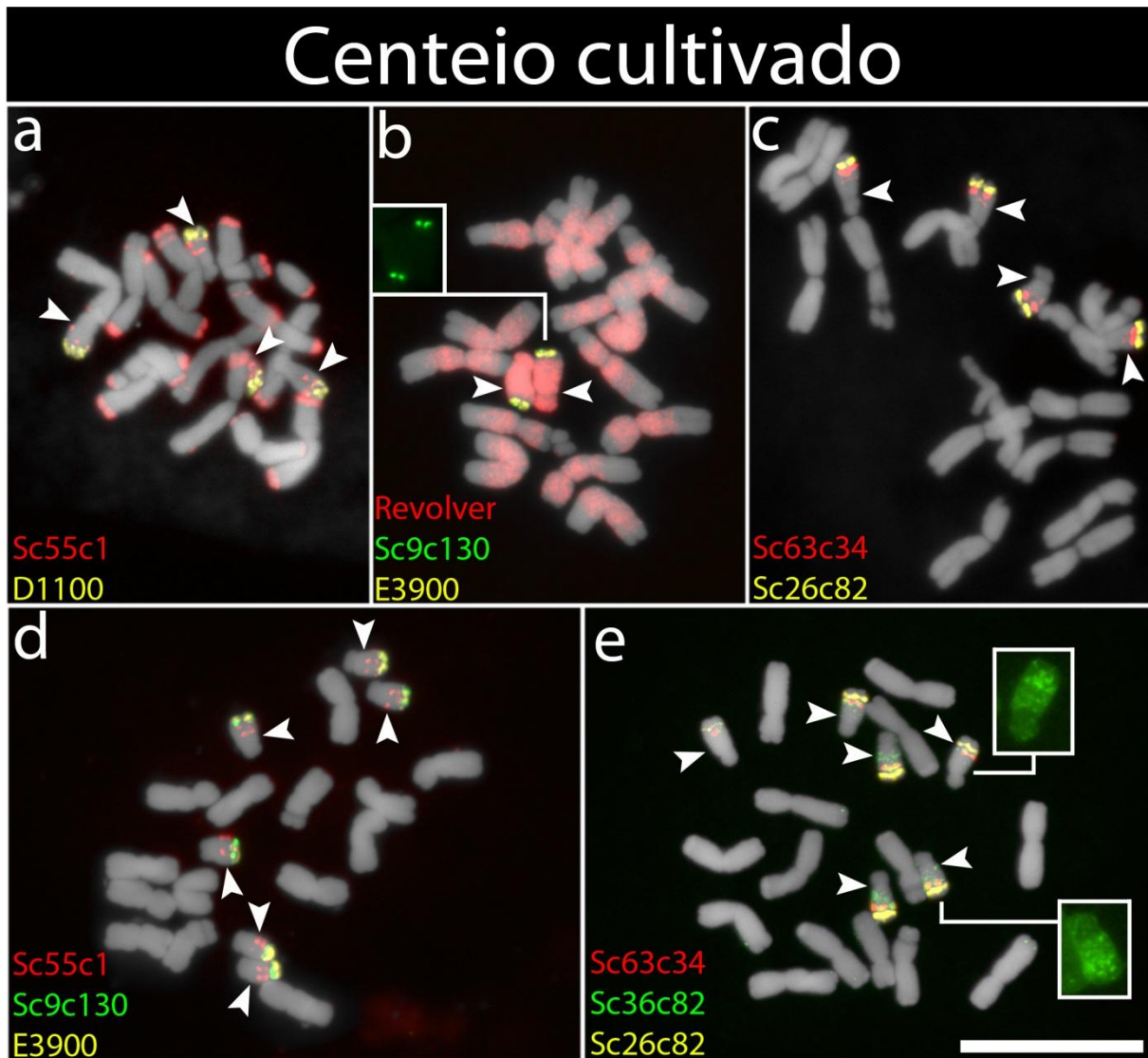


Figura supl. 1

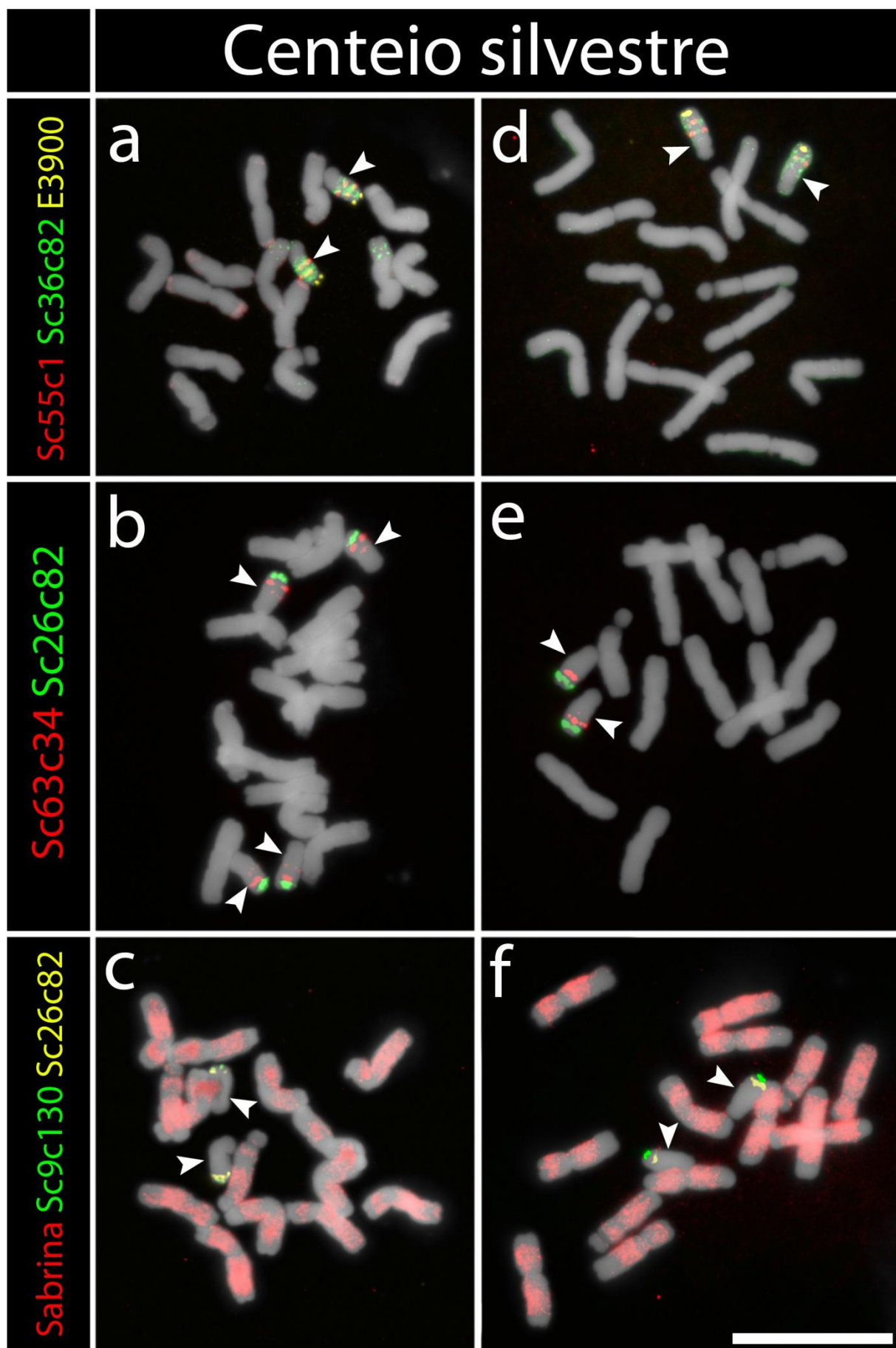


Figura supl. 2

7. RESUMO

Cromossomos B (Bs) são elementos dispensáveis que ocorrem em centeio (*Secale cereale*) e muitas outras espécies. Os Bs normalmente desenvolvem mecanismos que garantem sua acumulação através das gerações. Em centeio o mecanismo de acumulação se dá durante a primeira mitose do grão de pólen devido a uma não-disjunção das cromátides-irmãs do B e migração preferencial para o núcleo generativo. A região terminal do braço longo do B parece ter um papel importante nesse mecanismo de acumulação, denominada de região de controle da não-disjunção. Devido à natureza neutra dos Bs é esperada uma baixa pressão seletiva sobre ele e logo formação de variantes estruturais. Neste trabalho são revisadas as principais características dos Bs de centeio, seguida por uma análise extensa da sua estrutura, evolução e mecanismos funcionais. Foi encontrado que o cromossomo B de centeio, ao contrário do esperado, apresenta uma estrutura muito bem conservada desde sua origem. As poucas variações conhecidas de Bs de centeio estão representadas, principalmente, por duas variantes distinguíveis por uma inversão pericêntrica, uma redução da região de controle da não-disjunção e pequenas diferenças no padrão de expressão de sequências específicas do B. Analisando uma linhagem de centeio com uma alta taxa de rearranjos envolvendo os Bs, foi observado que variantes estruturais do B surgem principalmente por erros de divisão centromérica e posterior deleção de partes dos braços cromossômicos. Tanto a região pericentromérica como a região de controle da não-disjunção parecem estar envolvidas na geração de variantes desse cromossomo. No entanto, devido à perda da região de controle da não-disjunção do B, a maioria das variantes geradas não são capazes de acumularem em populações naturais.

Palavras-chave: cromossomos B, centeio, polimorfismo estrutural, rearranjos cromossômicos, *Secale cereale*.

8. ABSTRACT

B chromosomes (Bs) are dispensable elements that occur in many species including rye (*Secale cereale*). The Bs usually develop mechanisms to ensure its accumulation through the generations. In rye the B drive mechanism occurs during the first mitosis of the pollen grain due to a nondisjunction of both sister chromatids of the B and preferential migration to the generative nucleus. The B-terminal region of the long arm seems to play an important role in this accumulation mechanism and so called the nondisjunction control region. Due to the neutral nature of Bs we would expect low selective pressure acting over them tolerating more rearrangements and formation of structural polymorphisms. Here, it is reviewed the main features of the Bs, followed by an extensive analysis of the rye B chromosome structure, evolution and functional mechanisms. We have found that the B chromosome of rye, in contrast to the expectations, has a highly conserved structure since. The few structural variants detected are mainly represented by two chromosome types distinguishable only by a pericentric inversion, reduction of the nondisjunction control region and small differences in the expression pattern of B-specific sequences. However, analyzing a particular strain of rye with a high rate of rearrangements involving the Bs, it was observed that the B structural polymorphisms arose mainly by centromere misdivision and subsequent deletion of parts of the B long arm. Both the pericentromeric and the nondisjunction control region seem to be involved in the generation of rye B structural polymorphisms. However, most generated B variants are not able to accumulate in natural populations due to the loss of the nondisjunction control region.

Key words: B chromosomes, chromosomal rearrangements, rye, *Secale cereale*, structural polymorphism.

9. CONCLUSÕES

- O cromossomo B de centeio da linhagem 7415 apresentou alta instabilidade mitótica e variação estrutural. Dessa forma, a instabilidade mitótica encontrada é rara, gerando uma alta frequência de alterações do B.
- Erros de divisão centromérica e quebras parecem estar correlacionados com a formação de alterações estruturais do B, provavelmente devido à amplificação e deleção das sequências localizadas nas regiões pericentroméricas (CL11) e terminais (D1100) do B.
- Maioria das variantes é incapaz de acumular devido a ausência da região de controle da não-disjunção. O isocromossomo B do braço longo é a única variante capaz de acumular, mas apresenta disfunção centromérica e irregularidade meiótica. Assim, todas as variantes estruturais parecem ser eliminadas em populações naturais.
- O cromossomo B de centeio está representado por duas variantes estruturais em populações naturais
- A atividade transcricional das sequências B-específicas é independente do número de cópias, sugerindo que o número de cópias ativas seja conservado.
- A marcação atípica da cromatina da região terminal do braço longo do B é preferencialmente correlacionada com a sequência E3900. Assim a região heterocromática revelada pelo bandeamento C parece estar restrita ao bloco de Sc26c82.
- Aparentemente existe uma relação entre o tamanho da região de controle da não-disjunção e a taxa de transmissão do B.