



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Doutorado em Ciências Biológicas

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS
DE TRIGO (*Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*) COM
DIFERENTES COMBINAÇÕES GENÔMICAS**

Recife

2003



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Doutorado em Ciências Biológicas

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS
DE TRIGO (*Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*) COM
DIFERENTES COMBINAÇÕES GENÔMICAS**

Tese apresentada por Ana Christina Brasileiro-Vidal ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Guerra

Recife

2003



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Doutorado em Ciências Biológicas

**CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE HÍBRIDOS INTERGENÉRICOS DE TRIGO
(*Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum*) COM DIFERENTES
COMBINAÇÕES GENÔMICAS**

Comissão examinadora:

Membros titulares: _____

Prof. Dr. Marcelo Guerra – Depto. Botânica, UFPE (Orientador)

Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon – Depto. Genética, UFPE

Dr. José Francisco Montenegro Valls – Embrapa, CENARGEN

Profa. Dra. Luciane Vilela Resende – Depto. Agronomia, UFRPE

Dr. Nataniel Franklin de Melo – Embrapa, CPATSA

Membros suplentes: _____

Dra. Andrea de Carvalho Pedrosa – Depto. Botânica, UFPE

Profa. Dra. Maria José de Souza Lopes – Depto. Genética, UFPE

A Beto e Rafaela

Dedico

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e à Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio dispensado.

À Coordenação do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas, na pessoa da Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho pela atenção e colaboração.

Ao Prof. Dr. Marcelo Guerra, pela orientação, apoio e profissionalismo, necessários para o desenvolvimento de todas as etapas desse trabalho.

Aos pesquisadores doutores Ana Christina Albuquerque Zanatta, Ariano Moraes Prestes, Maria Irene B. Moraes-Fernandes e Sandra Patussi Brammer, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa – Trigo, pela fundamental colaboração, cordialidade e amizade.

À Profa. Dra. Angeles Cuadrado, pela grande atenção, ensinamentos e por ter colocado a minha disposição o Laboratório de Citogenética, Depto. de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, Espanha.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal, UFPE – André, Andrea, Adriana, Ana Emília, Ane, Beta, George, Gianna, Ivan, Ivanildo, Juliano, Kyria, Léo, Lia, Luzia, Maria Cristina, Nataniel, Paulo e Regi, pelos ensinamentos, cooperação e amizade.

À Dra. María Jesús Puertas Gallego por sua grande atenção e grandes contribuições no desenvolvimento dos dois primeiros manuscritos.

À Dra. Ana Maria Benko-Iseppon, Ms. Wagner Alexandre Lucena e Dr. Marcos Moraes, pela importante ajuda nos estudos moleculares.

Às funcionárias do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas da UFPE – Adenilda, Jaci e Liane, pelo apoio prestado.

Aos bibliotecários do IPA – Almira, Dirceu, Paulo e Sônia, pela atenção e colaboração na busca de trabalhos científicos.

A Etiene e Márcia, bibliotecárias da Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, pela atenção e presteza.

À Dra. Lília Willadino e Dra. Terezinha Câmara, pelo apoio, sugestões e amizade.

Aos meus pais e a tia Ignez, pela fundamental ajuda na revisão final desta tese.

A meus pais – Wellington e Helena, por terem me possibilitado uma boa formação acadêmica e pessoal.

A Beto, por sua participação efetiva, companheirismo, compreensão e amizade ao longo de todo o período de doutorado.

Finalmente, minha gratidão sincera para todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram.

Muito obrigada.

Sumário

<i>Lista de figuras e de tabela</i>	vii
<i>Lista de publicações</i>	x
<i>Resumo</i>	xii
<i>Abstract</i>	xiii
1 Introdução	1
2 Revisão de literatura	4
2.1 Importância do trigo	5
2.2 Evolução genômica em Triticeae	6
2.3 Transferência de genes para trigo	8
2.3.1 Procedimentos usados na caracterização de híbridos interespecíficos	11
2.4 Técnicas citogenéticas aplicadas à caracterização de cereais	12
2.4.1 Bandeamento cromossômico	12
2.4.2 Coloração com nitrato de prata	13
2.4.3 Quantidade de DNA	14
2.4.4 Hibridização <i>in situ</i>	15
3 Referências bibliográficas	16
4 Capítulo de livro	
Citogenética molecular em cereais	22
5 Manuscritos	40
Manuscrito 1	
Instabilidade mitótica em acessos oriundos do cruzamento entre <i>Triticum aestivum</i> × <i>Thinopyrum ponticum</i>	41
Manuscrito 2	
Chromosome characterization in <i>Thinopyrum ponticum</i> (Triticeae – Poaceae) using <i>in situ</i> hybridization with different DNA sequences	67
Manuscrito 3	
Caracterização citogenética molecular dos genomas parentais em anfidiplóides parciais derivados de <i>Triticum aestivum</i> × <i>Thinopyrum ponticum</i>	87
6 Conclusões gerais	104
7 Anexos	107

Lista de figuras e de tabela

Introdução

- Figura 1 Procedimento utilizado para obtenção dos acessos RC₂F₇ e duplo-haplóides estudados. 3

Revisão de literatura

- Figura 1 Representação esquemática da evolução do trigo hexaplóide *T. aestivum* a partir de três prováveis ancestrais. 7

Capítulo de livro

- Figura 1 Esquema simplificado da técnica de hibridização *in situ*. (a) A seqüência de DNA a ser utilizada como sonda deve ser isolada e marcada. (b) Paralelamente, devem ser preparadas lâminas com cromossomos bem espalhados. (c, d, e) Posteriormente, os DNAs da sonda e dos cromossomos devem ser desnaturados e colocados em contato para que ocorra a renaturação e conseqüentemente a hibridização *in situ*. (f, g) A localização da sonda é feita por uma molécula reconhecidora ligada a um fluorocromo e observada na microscopia de fluorescência. 36
- Figura 2 Célula em metáfase de *Thinopyrum ponticum* (2n = 10x = 70). (a) Cromossomos corados com DAPI (azul), evidenciando a sua morfologia. (b) A mesma célula anterior, mostrando a localização *in situ* de 20 sítios de DNAr 5S, marcados com digoxigenina e detectados com antidigoxigenina-FITC (verde), e de 17 sítios de DNAr 45S, marcados diretamente com rodamina (vermelho). 37
- Figura 3 Hibridização *in situ* utilizando sondas de DNA repetitivo em tandem, marcadas diretamente com rodamina (vermelho), mostrando os cromossomos contracorados com DAPI (azul). (a) Metáfase de *Triticum turgidum* (2n = 4x = 28), hibridizada com a sonda pSc119.2. (b) Célula do híbrido trigo × *Thinopyrum ponticum* (2n = 8x = 56), hibridizada com o microssatélite (AAC)₅. 38

Figura 4	Hibridização genômica <i>in situ</i> em triticale ($2n = 8x = 56$), utilizando como sonda o DNA genômico de centeio e como bloqueador o DNA genômico de trigo. (a) Localização <i>in situ</i> dos 14 cromossomos de centeio marcados com digoxigenina e detectados com antidigoxigenina-FITC (verde mais intenso). (b) A mesma célula anterior, mostrando a imagem sobreposta à dos cromossomos contracolorados com DAPI.	39
----------	--	----

Manuscrito 1

Figura 1	a-c. Células metafásicas mostrando alterações numéricas em diferentes acessos oriundos do cruzamento <i>T. aestivum</i> × <i>Th. ponticum</i> . a, c. Acessos em RC ₂ F ₇ , F7-14 ($2n = 53$) e F7-19 ($2n = 60$), respectivamente. b. Duplo-haplóide RC ₂ F ₅ , DH-2 ($2n = 39$). d, e. Telófases mitóticas mostrando a presença de cromátides retardatárias em ‘CEP 19’ e em F7-17, respectivamente.	64
----------	---	----

Figura 2	Imunolocalização da histona H3 fosforilada mitótica em células não pré-tratadas de trigo. a, b. Metáfase da cultivar ‘CEP 19’, corada com DAPI (a) e com FITC ligado ao anticorpo anti-H3 fosforilada (b), mostrando a não fosforilação em cromátides com separação precoce. c. Cromossomos do acesso F7-19, evidenciando a presença de um telocêntrico. d. Cromossomos de ‘CEP 19’, mostrando um fragmento acêntrico não fosforilado.	65
----------	---	----

Tabela 1	Variação do número cromossômico e do conteúdo de DNA em acessos derivados do cruzamento <i>T. aestivum</i> × <i>Th. ponticum</i> e nas cultivares de trigo analisadas.	66
----------	---	----

Manuscrito 2

Figura 1	Locating of specific sites in the chromosomes of <i>Thinopyrum ponticum</i> . a. Complete metaphase with $2n = 70$ DAPI stained chromosomes. b. The same cell showing seventeen 45S rDNA sites (red) and 20 sites of 5S rDNA (green). c. Reprobing of the same cell revealing the distribution of the highly repetitive DNA sequence pAs1. d. Partial prometaphase displaying 15 sites of 45S rDNA (red) and the terminal localization of the pSc119.2 probe (green).	85
----------	--	----

- Figura 2 Analysis of the NOR activity, using the silver-staining procedure. **a.** Partial metaphase showing the maximum number of Ag-NORs found in a single cell (17 sites). **b.** Interphase nuclei with six nucleoli. 86

Manuscrito 3

- Figura 1 Hibridização *in situ* da linhagem de trigo PF 839197 e de acessos híbridos derivados do cruzamento PF 839197 × *Thinopyrum ponticum*. (A) Metáfase da linhagem PF 839197, evidenciando um braço de centeio (em verde) translocado em homozigose para o genoma de trigo. (B) Anfidiplóide parcial (PF 984506) com 2n = 56, mostrando 14 cromossomos de *Th. ponticum* (em verde), marcados com biotina e detectados avidina conjugada com FITC. (C, D) Célula de PF 984506 com 2n = 56, corada com DAPI (C) e a mesma célula, em (D), mostrando 16 sítios de DNAr 5S, marcados com digoxigenina (verde) e 12 sítios de DNAr 45S, marcados com rodamina (vermelho). 108

Lista de publicações

Este trabalho deu origem, até o momento, a quatro resumos em congressos, um capítulo de livro e três manuscritos. As normas utilizadas para a escrita do capítulo de livro e dos manuscritos encontram-se no item 'Anexos'.

Resumos em congressos

- Resumo 1 BRASILEIRO, A. C. R.; GUERRA, M. Caracterização cromossômica de uma cultivar brasileira de centeio (*Secale cereale* L.) cv. BR1. 02-15. In: 45^o Congresso Nacional de Genética, 1999, Gramado. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1999, v. 22, p. 104.
- Resumo 2 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. Estudo da instabilidade cromossômica em genótipos oriundos de cruzamento entre *Triticum aestivum* x *Agropyron elongatum*. In: 46^o Congresso Nacional de Genética, 2000, Águas de Lindóia. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2000, v.23, p.388-389.
- Resumo 3 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C. A.; MORAES-FERNANDES, M. I.; GUERRA, M. Organização cromossômica de diferentes classes de cromatina em *Triticum aestivum* linhagem PF 839197 através da técnica de hibridização *in situ*. In: IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal, 2001, Goiânia. **Programas e Resumos**. Red Bio, 2001, p. 165.
- Resumo 4 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C. A.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; GUERRA, M. Localização cromossômica de diferentes seqüências de DNA em *Thinopyrum ponticum* (Triticeae – Poaceae). In: 48^o Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2000, cd-rom.

Capítulo de livro

- Capítulo 1 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P. (ed). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: EMBRAPA. No prelo.

Manuscritos

- Manuscrito 1 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; ZANATTA, A. C. A.; BRAMMER, S. P.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; GUERRA, M. Mitotic instability in *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* derivatives. Em preparação.
- Manuscrito 2 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; ZANATTA, A. C. A.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B.; GUERRA, M. Chromosome characterization of *Thinopyrum ponticum* (Triticeae – Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**. Enviado para publicação.
- Manuscrito 3 BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; GUERRA, M. Caracterização citogenética molecular dos genomas parentais em anfidiplóides parciais derivados de *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum*. Em preparação.

Resumo

Foram caracterizados citogeneticamente oito acessos, incluindo a linhagem de trigo PF 839197 (*Triticum aestivum*, $2n = 42$), *Thinopyrum ponticum* PF Ag. el. 84001 ($2n = 70$) e seis acessos híbridos derivados de PF 839197/PF Ag. el. 84001//2*'CEP19', com cinco ou sete gerações de autofecundação. Cromossomos de PF 839197 e de Ag. el. 84001 foram analisados por hibridização *in situ* com as sondas pTa794, pTa71, pSc119.2, pAs1 e (AAG)₅. A linhagem PF 839197 mostrou padrão de marcas semelhante ao da cultivar 'Chinese Spring', exceto para o braço 1BS de padrão típico de centeio, sugerindo uma translocação 1BL.1RS, confirmada por hibridização genômica *in situ* (GISH). O acesso PF Ag. el. 84001 apresentou 17 cromossomos com sítios de DNAr 45S e 5S e três cromossomos apenas com DNAr 5S. Os acessos híbridos foram instáveis mitoticamente, observando-se variação numérica extensa, com mosaicismos em 100% dos indivíduos e maior frequência de números superiores a 42 cromossomos. Essas variações foram confirmadas pela medição do conteúdo de DNA. Em mitose, verificou-se a presença de cromossomos de separação precoce, cromátides retardatárias, fragmentos cromossômicos e micronúcleos, também evidenciada pela imunocoloração com anti-histona H3 fosforilada. Observou-se que nos cromossomos de separação precoce e nas cromátides retardatárias as histonas não fosforilaram. Essa instabilidade pode ter sido herdada da cultivar 'CEP 19', que foi relativamente instável. A GISH, utilizando DNA genômico de *Th. ponticum*, mostrou que o complemento cromossômico de cinco acessos consiste de 36 a 42 cromossomos de trigo e de 11 a 14 de *Thinopyrum*, sugerindo que estes últimos tendem a ser transmitidos como conjuntos monoplóides nos anfidiplóides parciais.

Palavras chave: trigo, *Thinopyrum ponticum*, instabilidade mitótica, conteúdo de DNA, prata, FISH, GISH

Endereço eletrônico: brasileiro_vidal@hotmail.com

Abstract

The wheat line PF 839197 (*Triticum aestivum*, $2n = 42$), the *Thinopyrum ponticum* accession PF Ag. el. 84001 ($2n = 70$) and six hybrid derivatives from PF 839197/PF Ag. el. 84001//2*'CEP19', with five or seven generations of self-fertilization were characterized cytogenetically. Chromosomes of PF 839197 and Ag. el. 84001 were analyzed by *in situ* hybridization with the followed probes: pTa794, pTa71, pSc119.2, pAs1 and (AAG)₅. Hybridization patterns of PF 839197 were similar to the patterns previously reported to the cultivar 'Chinese Spring', except for the 1BS. In this arm, the probes showed a typical rye distribution, suggesting the presence of a 1BL.1RS translocation, which was confirmed by genomic *in situ* hybridization (GISH). Seventeen 45S and twenty 5S rDNA sites were observed in the short arms of 17 *Th. ponticum* chromosomes. In three other chromosomes, only the 5S rDNA site was observed. The hybrid derivatives were mitotically unstable. Chromosome number ranged extensively and mosaicism was observed in all individuals analyzed, with a predominance of chromosome numbers higher than $2n = 42$. These results were confirmed by the measurement of nuclear DNA content. Precociously separated chromosomes, delayed separating chromatids, chromosome fragments and micronuclei were found in mitosis. Immunostaining with an antibody recognizing histone H3 phosphorylated revealed unphosphorylated H3 in the precociously separated chromosomes and delayed separating chromatids. This instability could be inherited from 'CEP 19', that was relatively unstable. GISH with genomic DNA from *Th. ponticum* demonstrated that each chromosome complement consists of 36 to 42 chromosomes from wheat and 11 to 14 chromosomes from *Th. ponticum*, suggesting that *Thinopyrum* chromosomes tend to be transmitted as monoploid sets in partial amphiploids.

Keywords: wheat, *Thinopyrum ponticum*, mitotic instability, DNA content, silver staining, FISH, GISH

E-mail: brasileiro_vidal@hotmail.com

O trigo comum, *Triticum aestivum* L., pertencente à família Poaceae, é um dos alimentos mais importantes na dieta da população nacional. Contudo, a importação brasileira desse grão e de seus derivados permanece significativa: mais de sete milhões de toneladas, em 2001 (Secretaria da Receita Federal, 2002). Essa cultura é oriunda de regiões de clima seco e temperado, por isso a produção nacional de trigo é muito afetada pelas condições climáticas. Além disso, o trigo é suscetível a diversas doenças, como é o caso das ferrugens, que têm causado grandes perdas na produção (Milach & Cruz, 1997). O uso de cultivares resistentes é o método de controle mais favorável sob o ponto de vista ambiental e uma boa alternativa ao uso de defensivos.

Apesar do grande reservatório de variabilidade genética encontrado nas cultivares de trigo, em alguns casos, é necessário recorrer a espécies silvestres próximas para a introgressão dos genes desejados. A tribo Triticeae, à qual pertence o gênero *Triticum*, tem origem relativamente recente, o que favorece a hibridização entre seus gêneros, facilitando a passagem de genes de uma espécie para outra (Moraes-Fernandes, 1982). Dentre os genomas dos gêneros silvestres, os de *Thinopyrum* têm sido os mais amplamente utilizados, por serem fontes valiosas de genes para trigo e devido ao estreito relacionamento com os genomas de *Triticum*. A espécie perene *Th. ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey, [syn: *Agropyron elongatum* auct. non (Host) P. Beauv., *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub., *Lophopyrum ponticum* (Podp.) Á. Löve], tem contribuído significativamente para o melhoramento do trigo, através da transferência de genes para tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos, principalmente a ferrugens, ao 'barley yellow dwarf virus' (BYDV) e à salinidade (ver McIntosh et al. 1998; Jauhar & Peterson, 1996). Os híbridos F₁ (2n = 8x = 56) são perenes e incorporam três genomas de trigo, denominados ABD, e cinco de *Th. ponticum*, denominados JJJJ^SJ^S. Nas gerações seguintes, os cromossomos de *Th. ponticum* vão sendo eliminados, e as progênies passam a ser anuais, com a maioria das características de trigo, conservando de *Th. ponticum* apenas os caracteres para resistência selecionados.

A Embrapa Trigo (unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Passo Fundo, Rio Grande do Sul) vem desenvolvendo, desde 1988, um amplo trabalho para a introgressão de genes de *Th. ponticum*, por meio de híbridos entre esta espécie e linhagens ou cultivares de trigo. O presente trabalho foi desenvolvido utilizando híbridos oriundos do cruzamento entre *T. aestivum* (linhagem PF 839197) e *Th. ponticum* (acesso PF Ag. el. 84001).

Foram analisados três acessos na sétima geração do retrocruzamento dois (RC₂F₇) bem como três duplo-haplóides em RC₂F₅, obtidos via eliminação somática, através de cruzamento com milho. Além disso, foram analisados os genitores e a cultivar de trigo ‘CEP 19’ (Pel 72380/‘Arthur 71’//PF 75336/3/‘Alondra SIB’/PF 72707//‘PAT 19’), usada nos retrocruzamentos (Figura 1). Dessa forma, este trabalho teve como finalidade principal caracterizar citogeneticamente os genitores utilizados no cruzamento inicial e estudar o comportamento dos cromossomos ou dos segmentos cromossômicos de ambos os genitores nas gerações referidas acima.

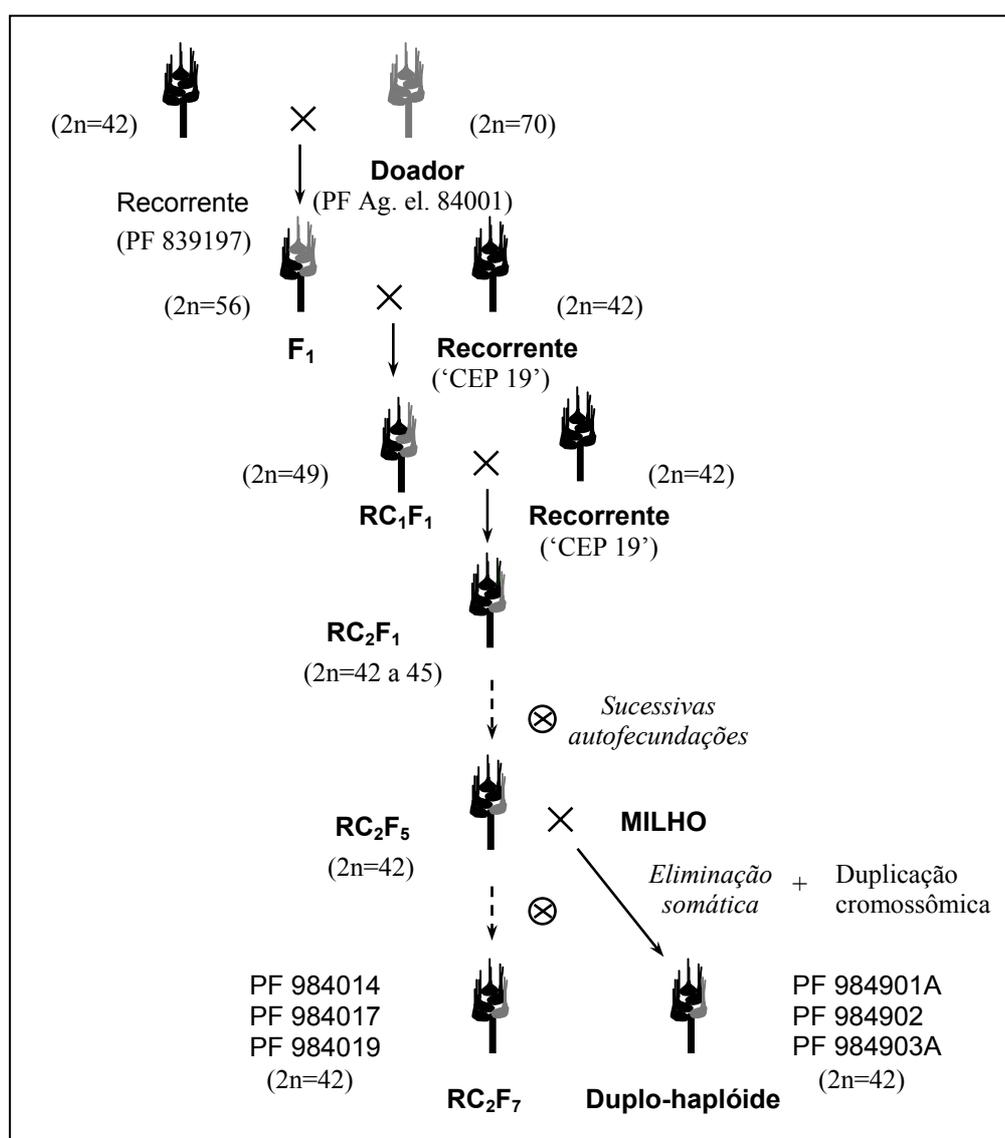


Figura 1. Procedimento utilizado para obtenção dos acessos RC₂F₇ e duplo-haplóides estudados.

2 *Revisão de literatura*

2.1 Importância do trigo

O trigo é originário do Sudoeste da Ásia e sua domesticação remonta a 7500 – 6500 anos a.C. (Feldman, 1986). Devido ao seu grande número de variedades, mais de 25 mil (Fedak, 1998), o trigo é cultivado desde a latitude de 67° norte na Noruega, Finlândia e Rússia até 45° sul na Argentina, apesar de nos subtrópicos e trópicos seu cultivo ser restrito a altas elevações (Feldman, 1986). Possui, entre todas as culturas alimentícias, a maior área plantada, representando em torno de 18% de toda a área cultivada no mundo (FAO, 2002). No Brasil, o segmento da panificação emprega aproximadamente 600 mil pessoas, sendo 570 mil em panificadoras artesanais e 30 mil em indústrias de pequeno porte (ABIP, 2002). Em 2001, a produção nacional foi de cerca de 3,2 milhões de toneladas, com um rendimento de 1,88 t/ha (FAO, 2002). Os Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul são os maiores produtores, sendo responsáveis por cerca de 92% da produção nacional no ano 2000 (IBGE, 2002). Contudo, o Brasil é um país tradicionalmente importador de trigo em grão, importando no ano 2000 cerca de 7,8 milhões de toneladas (FAO, 2002), o que representa um grau de dependência externa da ordem de 82%.

O grão de trigo tem fornecido cerca de 20% das calorias provenientes dos alimentos consumidos pelo homem (Feldman, 1986), apresentando um consumo *per capita* nacional de 49,2 kg no ano 2000 (FAO, 2002). É uma excelente fonte de carboidratos (60 – 80%, principalmente como amido), proteínas (8 – 15%, com quantidades adequadas de todos os aminoácidos essenciais, exceto lisina, triptofano e metionina), gorduras (1,5 – 2%), minerais (1,5 – 2%) e vitaminas como as do complexo B e vitamina E. Por causa do alto conteúdo de glúten do endosperma, o grão do trigo comum é altamente valioso para a produção de pão. O glúten retém o gás carbônico produzido no processo de fermentação, fazendo com que a massa cresça, originando um produto leve e saboroso. Por outro lado, os grãos dos trigos tetraplóides, especialmente de *Triticum durum* var. *durum*, produzem uma farinha com baixo teor de glúten, adequada para a elaboração de macarrão (Feldman 1986). Em forma de pão e de outros derivados, o trigo constitui um dos alimentos mais importantes da cesta básica brasileira e um componente essencial da alimentação humana (Silva et al., 1996).

2.2 Evolução genômica em Triticeae

A tribo Triticeae, pertencente à família Poaceae (Gramineae), contém cerca de 500 espécies anuais e perenes, dentre as quais destacam-se três grandes cereais: trigo, cevada e centeio. As espécies diplóides dessa tribo divergiram a partir de um ancestral comum com um número básico de $x = 7$ cromossomos. As espécies poliplóides foram desenvolvidas através da duplicação de genomas (autopoliplóides) ou após hibridização entre diferentes espécies (alopoliplóides). A existência de espécies autopoliplóides com vários níveis de ploidia e a complexidade dos alopólplóides com diversos genomas envolvidos, associadas a uma possível existência de poliploidização recorrente, dificultam o entendimento da estrutura filogenética de toda a tribo (Maestra & Naranjo, 2000).

Os cromossomos dos diferentes genomas que preservam uma homologia residual, por causa de sua origem comum, são designados homeólogos. Dessa forma, devido ao número básico de $x = 7$, as espécies de Triticeae apresentam sete grupos de homeologia. A identificação das relações genéticas entre tais cromossomos pode fornecer informações valiosas sobre a evolução cromossômica da tribo como também para a introgressão de genes nas espécies cultivadas. O trigo comum, *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD), é um alohexaplóide que se originou a partir de dois eventos de hibridização seguidos de duplicação cromossômica, envolvendo três genitores diplóides (Figura 1). Uma primeira hibridização, entre *T. urartu* (AA) e *Aegilops speltoides* (SS)¹, produziu o trigo tetraplóide *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$, AABB). A segunda hibridização envolveu uma forma cultivada de *T. turgidum* e a espécie silvestre *Ae. tauschii* (DD) (ver Maestra & Naranjo, 2000; WGRC, 2002). Durante a evolução dessa espécie, também ocorreram algumas alterações estruturais envolvendo os braços 4AL, 5AL e 7BS. A seqüência seguinte de rearranjos cromossômicos foi proposta por Naranjo (1990). Uma translocação inicial 4AL/5AL aconteceu durante a evolução do genoma A e *T. urartu* transmitiu essa translocação para o trigo tetraplóide, *T. turgidum*. Uma segunda translocação, 4AL/7BS, e uma inversão pericêntrica do cromossomo 4A ocorreram no estágio tetraplóide. Estas alterações foram então transmitidas na formação do trigo hexaplóide, *T. aestivum*.

A importância econômica dos trigos cultivados torna suas relações com outras espécies de grande interesse, devido ao uso destas espécies como reservatório de genes para a transferência de caracteres. Diferentes abordagens têm sido usadas para identificar a afinidade genética entre cromossomos dos diferentes genomas. Os primeiros testes empregados foram os de substituição-compensação, que foram desenvolvidos por Sears para

¹ O genoma S de *Ae. speltoides* ou de outra espécie próxima pertencente a *Aegilops* é o genoma conhecido mais próximo do genoma B (ver Maestra & Naranjo, 2000).

estabelecer os sete grupos de homeologia em trigo e têm sido usados para distribuir os cromossomos de espécies próximas nos sete grupos homeólogos. Estes testes se baseavam no fato de que, em indivíduos nulissômicos-tetrassômicos, a presença de quatro cópias de um tipo cromossômico compensa a ausência de outro tipo cromossômico pertencente a um mesmo grupo de homeologia (Sears, 1966). Análises de pareamento homeólogo em metáfase I em híbridos interespecíficos também permitem a identificação da homeologia dos braços entre cromossomos de diferentes genomas (Rodríguez et al., 2000). Outras alternativas, usadas na identificação de genomas e em estudos comparativos, têm sido a análise de cariótipos por técnicas de bandeamento cromossômico e a localização cromossômica de seqüências de DNA mediante hibridização *in situ* como, por exemplo, a seqüência pAs1, oriunda de *Ae. tauschii*, e pSc119.2, isolada de centeio, ambas utilizadas na caracterização de genomas de outras espécies (Linde-Laursen et al., 1992; Badaeva et al., 1996). Finalmente, a construção de mapas genéticos usando marcadores moleculares, tem fornecido informações sobre o grau de conservação da colinearidade genética entre genomas (Draye et al., 2001).

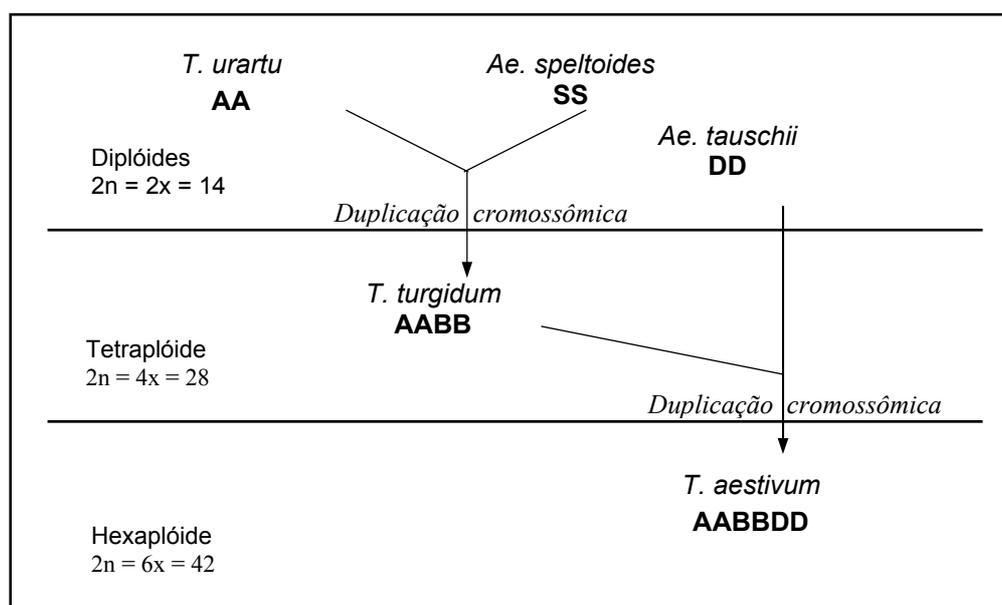


Figura 1. Representação esquemática da evolução do trigo hexaplóide *T. aestivum* a partir de três prováveis ancestrais (adaptado de WGRC, 2002).

A construção de mapas físicos para trigo foi impulsionada inicialmente por Sears, com o desenvolvimento de estoques aneuplóides para todos os cromossomos (Sears, 1966), facilitando significativamente o mapeamento de marcadores fenotípicos e moleculares em trigo. Esses estoques desempenharam um importante papel na identificação e mapeamento de diversos genes importantes para o entendimento da base biológica e agrônômica do trigo (Gill & Gill, 1998). Além disso, a estreita relação entre as espécies de Poaceae e a disponibilidade

de um grande número de marcadores moleculares têm permitido a construção de mapas físicos consensuais de alta resolução (Hohmann et al., 1995), a integração desses mapas com mapas genéticos de ligação já existentes e a análise comparada entre espécies próximas (Draye et al., 2001).

O mapa genético consensual de trigo revela uma extrema conservação da ordem dos locos entre os genomas A, B e D, diferindo apenas devido aos eventos evolutivos de translocação, envolvendo os cromossomos 2B, 4A, 5A, 6B e 7B (Gale et al., 1993). A sintenia gênica (conservação de grupos de ligação entre espécies) também tem sido mostrada entre espécies de diferentes tribos da família Poaceae, como por exemplo, entre sorgo, trigo, arroz e milho (Draye et al., 2001).

2.3 Transferência de genes para trigo

A expansão da agricultura, associada ao aumento de produtividade em decorrência da adaptação de cultivares, levou, gradualmente, à eliminação de variedades locais. Esse fenômeno, denominado 'erosão da variabilidade genética', além de limitar o futuro incremento no rendimento e na qualidade do trigo, o torna gradativamente vulnerável a estresses bióticos e abióticos (Jiang et al., 1994). Dessa forma, a produção de cultivares mais adaptadas e produtivas depende de um contínuo suprimento de variabilidade genética (Fedak, 1998).

Apesar da existência de mais de 25 mil cultivares de trigo, a variabilidade para alguns genes não existe em trigo e deve ser transferida a partir de espécies próximas. Além de outras características, estas espécies são fontes complementares de resistência a pragas e doenças. Por exemplo, dos 41 genes *Lr* para resistência à ferrugem das folhas, 30 têm sido introduzidos a partir de espécies próximas de Triticeae (Fedak, 1998).

O sucesso na transferência de genes a partir de espécies próximas para o trigo depende da distância evolutiva entre as espécies envolvidas (Friebe et al., 1996). De acordo com a proximidade de seus genomas em relação aos de trigo, as espécies foram classificadas em reservatórios de genes primários, secundários e terciários (Jiang et al., 1994). Para estabelecer as bases teóricas para estes reservatórios, foram fundamentais: o esclarecimento dos mecanismos de origem dos trigos cultivados (ver Maestra & Naranjo, 2000); os trabalhos de manipulação cromossômica desenvolvidos por Sears (ver Sears, 1966), através da série aneuplóide para a cultivar 'Chinese Spring'; e a descoberta do sistema de regulação do pareamento homólogo na meiose (Sears, 1976).

As espécies do reservatório primário de trigo compartilham genomas homólogos. Este grupo inclui as raças nativas de *T. aestivum*, as formas selvagem e cultivada de *T. turgidum* (AABB), a espécie doadora do genoma A do trigo comum, *T. urartu*, e a espécie próxima, *T.*

monococcum, além da espécie doadora do genoma D, *Ae. tauschii*. Os genes oriundos do reservatório primário podem ser transferidos através de hibridização direta, recombinação cromossômica homóloga, retrocruzamentos e seleção (ver Friebe et al., 1996). Nenhuma manipulação especial é necessária, exceto o resgate de embriões, que em alguns casos é necessário para produzir híbridos F₁. O reservatório gênico secundário consiste de espécies proximamente relacionadas, como a maioria dos poliplóides dos gêneros *Triticum* e *Aegilops*, que compartilha um genoma em comum com trigo, e as espécies diplóides de *Aegilops* (seção Siptosis), cujos genomas estão relacionados ao genoma B. Nesses casos, quando o gene está localizado em um cromossomo homólogo, a transferência de genes é semelhante às espécies do reservatório primário. Caso contrário, algumas manipulações citogenéticas especiais são necessárias, como acontece para o reservatório gênico terciário. Este último inclui as espécies diplóides e poliplóides, contendo genomas não homólogos aos de trigo. Dessa forma, as transferências genéticas não podem ser feitas por recombinação homóloga (Jiang et al., 1994). Apesar disso, os genomas das espécies do reservatório terciário são geneticamente relacionados (homeólogos) aos genomas de trigo e podem ser transferidos com sucesso, usando procedimentos citogenéticos especiais como, por exemplo, a supressão do sistema de regulação do pareamento homólogo, ou mediante a indução de translocações cromossômicas, através de radiação ionizante ou de cultura de tecidos (Jauhar, 1993; Jiang et al., 1994).

O controle do pareamento cromossômico em trigo é realizado pela ação de diversos genes promotores e supressores. O gene *Ph1* (*pairing homeologous*), localizado no braço longo do cromossomo 5B, é o maior supressor de pareamento entre cromossomos homeólogos dos trigos alopoliplóides, restringindo a formação de bivalentes a cromossomos homólogos. Outro gene supressor é o *Ph2*, localizado no braço curto do cromossomo 3D e menos eficiente que o *Ph1*. Na presença desses genes supressores, os cromossomos do trigo e da espécie próxima (homeólogos) não irão parear durante a meiose e, portanto, não ocorrerá permuta, o que impossibilita a transferência gênica. No entanto, a indução de pareamento homeólogo pode ser obtida pelo uso de nulissômicos para os cromossomos 5B ou 3D ou através de mutantes para deleção terminal, tornando possível a transferência de genes a partir de espécies próximas para o trigo (ver Sears, 1976; Benavente et al., 1998).

Outros procedimentos também têm auxiliado no processo de transferência de genes como, por exemplo, o resgate de embriões imaturos, que facilita a obtenção de híbridos intergenéricos que produzem embriões abortivos (Angra et al., 1999), e a duplicação de cromossomos por tratamento com colchicina (Lange & Jochemsen, 1992). Além disso, algumas técnicas têm sido empregadas para acelerar a formação de novas cultivares, como por exemplo, cruzamentos entre trigo e milho, usados para a produção de haplóides e posterior obtenção de duplo-haplóides. Após a formação do zigoto, os cromossomos de milho são

eliminados durante os três primeiros ciclos mitóticos na maioria dos embriões (Laurie & Bennett, 1989).

A condição poliplóide do trigo confere certas características que facilitam a incorporação de genes de espécies próximas. Dentre essas, pode ser citada a tolerância à perda ou ao ganho de cromossomos inteiros, de braços ou de segmentos cromossômicos (Law, 1981). Essa tolerância é devida ao efeito tampão advindo da triplicação do genoma diplóide e à homeologia entre os genomas de trigo e das espécies próximas (Jauhar, 1993). Os cromossomos homeólogos de trigo possuem um conteúdo gênico similar e podem ser compensados por outros, através de substituições, em combinações nulissômicas-tetrassômicas, por exemplo (Sears, 1966). De modo similar, os cromossomos de espécies próximas também podem compensar a perda de cromossomos homeólogos de trigo (Friebe et al., 1996). Dessa forma, têm sido produzidas diversas linhagens, contendo cromossomos extras ou cromossomos substituídos, denominadas linhas de adição ou de substituição, respectivamente. Em termos de contribuição para o melhoramento do trigo, as linhas de substituição cromossômica são mais promissoras em relação às linhas de adição, por serem mais estáveis, devido à compensação da falta da cromatina de trigo pelo segmento introgridido. No entanto, os cromossomos transferidos também possuem genes de efeito adverso, os quais podem superar as vantagens dos genes úteis substituídos. Assim, a condição ideal é a produção de linhas de translocação, onde ocorre a transferência apenas de pequenos segmentos do cromossomo da outra espécie para o genoma de trigo (Law, 1981).

Diversas espécies têm sido hibridizadas com sucesso com trigo, envolvendo combinações com quase todos os genomas básicos de Triticeae, incluindo os genoma R de centeio e os genomas E e J de *Thinopyrum* (Sharma & Gill, 1983a; Jiang et al., 1994). As espécies de *Thinopyrum* Á. Löve, por exemplo, são fontes valiosas de genes para diversas características de interesse agrônomo para trigo, tais como tolerância a estresses ambientais, como ao frio, à seca e à salinidade, e resistência a doenças (Jauhar & Peterson, 1996). Friebe et al. (1996), apresentaram uma revisão sobre a transferência de genes para trigo, mostrando um conjunto de 57 translocações espontâneas ou induzidas. Os autores documentaram 20 translocações, envolvendo segmentos cromossômicos de espécies de *Thinopyrum*, contendo genes de interesse como por exemplo, os genes de resistência à ferrugem da folha *Lr19*, *Lr24*, *Lr29* e *Lr38*, à ferrugem do colmo *Sr24*, *Sr25* e *Sr26* e ao 'barley yellow dwarf virus' (BYDV).

Th. ponticum (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey, [syn: *Agropyron elongatum* auct. non (Host) P. Beauv., *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub., *Lophopyrum ponticum* (Podp.) Á. Löve], é uma espécie decaplóide perene ($2n = 10x = 70$) usada na transferência de genes especialmente para resistência às ferrugens do colmo e da folha, ao BYDV, ao 'wheat streak mosaic virus' (WSMV), ao 'Cephalosporium stripe', causada por *Cephalosporium gramineum* Nis. & Ika e para tolerância à salinidade (Jauhar & Peterson, 1996; Cai et al., 1996; McIntosh et

al., 1998; Chen et al., 1998). Dessa forma, muitas linhas de adição, substituição e translocação de *T. aestivum*–*Th. ponticum* têm sido produzidas, contribuindo de forma significativa para o melhoramento de trigo.

2.3.1 Procedimentos usados na caracterização de híbridos interespecíficos

O cruzamento entre variedades de trigo ou entre o trigo e espécies próximas deve ser acompanhado por uma avaliação de diversas características morfológicas e agrônômicas ao longo das gerações (Sethi, 1989). Na caracterização morfológica, podem ser considerados vários aspectos, tais como o hábito de crescimento e a morfologia das folhas, das espigas, das glumas e dos grãos (Brettiol, 1971). Além disso, características agrônômicas como número de espigas por planta, número de espiguetas por espiga, densidade de perfilhamento, vigor da planta, dentre outros são aspectos de suma importância (Sharma & Gill, 1983b; Angra, 1995). Por outro lado, o estado híbrido de uma plântula pode ser determinado pelo número somático de cromossomos e pelo comportamento meiótico (Sharma & Gill, 1983b; Sethi, 1989).

A introgressão de genes pode ser auxiliada por procedimentos para a detecção de cromossomos ou de segmentos cromossômicos (Jiang et al., 1994), como o uso de marcadores, direta ou indiretamente relacionados a esses genes, ao longo das gerações. O estabelecimento de tais associações pode reduzir o tamanho da população utilizada em um programa de melhoramento, através da identificação precoce dos indivíduos desejados. Por essa razão, marcadores morfológicos (Asiedu et al., 1989), bioquímicos (Friebe et al., 1992), citológicos (Chen et al., 1999) e de sondas de RFLP (Sharp et al., 1989) têm sido amplamente empregados na produção e na caracterização de linhas de adição, de substituição e de translocação (Jiang et al., 1994).

As técnicas citológicas mais usadas em cereais têm sido o bandeamento C e a hibridização *in situ*. Análises por bandeamento cromossômico ou por hibridização *in situ*, mediante o uso de sondas de DNA repetitivo, têm permitido a identificação de cromossomos ou de segmentos cromossômicos envolvidos em introgressões, enquanto a hibridização *in situ*, utilizando o DNA genômico total como sonda (GISH), tem possibilitado a determinação do tamanho do segmento transferido bem como as posições dos pontos de quebra (Friebe et al., 1996). Assim, a combinação da GISH com uma das outras duas técnicas tem possibilitado a identificação das linhas de adição e de substituição e a caracterização das translocações entre cromossomos de trigo e de espécies próximas (Cuadrado et al., 1998). Através dessas técnicas, Friebe et al. (1996), por exemplo, definiram os segmentos cromossômicos contendo os genes de resistência *Lr28*, *Lr38*, *Lr45*, *Gb5*, *H25*, *Sr26* e *Sr44*, e Jiang et al. (1993) identificaram um segmento cromossômico de *Th. ponticum* contendo resistência para o vírus WSMV.

2.4 Técnicas citogenéticas aplicadas à caracterização de cereais

2.4.1 Bandeamento cromossômico

As técnicas de bandeamento cromossômico são bastante valiosas na diferenciação de cromossomos ou de cariótipos similares com coloração convencional. Em Triticeae, são utilizadas três técnicas principais, denominadas bandeamento C, bandeamento N e bandeamento C modificado. O bandeamento C padrão é o mais extensamente utilizado e tem funcionado como poderoso instrumento na análise citogenética e na manipulação dos genomas em espécies de Triticeae (ver Gill et al., 1991). Tem auxiliado também no estudo da estrutura e função das regiões eucromáticas e heterocromáticas, fornecendo uma estimativa da recombinação genética nas regiões cromossômicas específicas e possibilitando o reconhecimento de muitas alterações cromossômicas, antes não detectáveis. Além disso, possibilita um estudo comparativo mais aprofundado da evolução cromossômica em Triticeae, uma análise mais detalhada do pareamento meiótico e o monitoramento da transferência de segmentos cromossômicos (Gill, 1993).

Em trigo, é muito difícil distinguir os cromossomos pela morfologia, uma vez que todos são submetacêntricos, com exceção do 7A que é metacêntrico e, dentro de cada grupo de homeologia, os três cromossomos apresentam, em geral, razão entre braços similar (Endo & Gill, 1984). O bandeamento C permitiu a identificação dos 21 pares cromossômicos dessa espécie, além da diferenciação de diversos segmentos cromossômicos. As bandas C são abundantes em todos os braços cromossômicos pertencentes aos genomas B e D, sendo o genoma B o mais fortemente marcado, principalmente nas regiões centroméricas e pericentroméricas. Para o genoma D, apesar do grande número de bandas centroméricas, intercalares e terminais, a marcação é mais discreta. No genoma A, a maioria dos braços apresenta marcadores cromossômicos, com exceção dos braços 1AS, 3AL, 4AS e 6AS (ver Gill et al., 1991).

Inicialmente, o bandeamento C era a técnica mais utilizada no estudo cromossômico das espécies de Triticeae (Gill & Kimber, 1977). Atualmente, essa técnica tem sido usada, mais frequentemente, associada à técnica de hibridização *in situ*, tanto com sondas genômicas quanto com DNA repetitivo. No híbrido *Triticale* e em linhas de translocação trigo × centeio, por exemplo, as duas técnicas foram utilizadas em conjunto para detectar introgressões interespecíficas em trigo (Cuadrado et al., 1996). Em *Hordeum chilense*, ambas foram usadas na identificação de trissômicos (Cabrera et al., 1999). Assim, esse procedimento pode ser utilizado na caracterização de diferentes acessos de uma mesma espécie, na identificação de linhas de adição e de substituição (Friebe et al., 1993) e na detecção de alterações estruturais, como deleções, inversões e translocações (Gill et al., 1991).

2.4.2 Coloração com nitrato de prata

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) correspondem aos sítios de DNAr 45S e estão associadas às constrições secundárias. A formação de nucléolos envolve a produção de uma estrutura complexa, onde ocorrem a transcrição dos genes de DNAr 45S e a ativação da maquinaria ribossomal (ver Medina et al., 1995). Desse modo, a formação de nucléolos é considerada como uma evidência da expressão do gene de DNAr 45S e a sua ausência indica a não transcrição gênica (Flavell et al., 1986).

O nitrato de prata tem sido usado para corar diferencialmente os nucléolos nos núcleos interfásicos e as RONs em cromossomos metafásicos (Lima-Brito et al., 1998), devido a sua reação com proteínas nucleolares ácidas, denominadas proteínas Ag-RONs (ver Medina et al., 1995). Como a reação com nitrato de prata pode ser considerada um indicativo da atividade gênica, esse procedimento passou a ser utilizado para a análise da atividade dos sítios de DNAr 45S, onde apenas as RONs funcionalmente ativas durante a intérfase são coradas pela prata (Ag-RONs) na metáfase mitótica seguinte (Lacadena et al., 1988). Em cereais, essa atividade tem sido estudada ao nível citológico, através da contagem do número e do volume dos nucléolos e do número de RONs coradas com prata (Martini & Flavell, 1985; Lima-Brito et al., 1998).

Essa técnica também tem sido usada para analisar anfiplastia – termo proposto para as mudanças morfológicas que ocorrem nos cromossomos após hibridização interespecífica (Lacadena et al., 1988). A anfiplastia é manifestada como uma competição nucleolar, que determina a inativação preferencial das RONs de um dos genomas genitores em espécies aloploplóides e em híbridos interespecíficos (Stace, 2000). Nesses casos, a atividade das RONs ‘em excesso’ é suprimida ou reduzida devido à presença de outras RONs (Houchins et al., 1997). Essa dominância nucleolar parece estar associada a um silenciamento seletivo de um conjunto de genes ribossomais, através de modificações químicas da cromatina, como a metilação de citosinas e a desacetilação de histonas (ver Pikaard, 2000).

Em trigo, por exemplo, as RONs são ativadas preferencialmente na seguinte ordem: 6BS > 1BS > 5DS > 1AS > 7DL (Mukai et al., 1991). Além disso, a expressão diferencial das RONs em híbridos interespecíficos e intergenéricos de Triticeae tem sido documentada em muitas combinações. Por exemplo, a atividade da RON de centeio é suprimida nas combinações híbridas com espécies tetraplóides e hexaplóides de *Triticum* e em combinações com *Aegilops* e *Hordeum* (Lacadena et al., 1988). Por outro lado, as RONs dos cromossomos de trigo são consideradas codominantes em relação às de *Th. ponticum* (Lacadena et al., 1984).

2.4.3 Quantidade de DNA

A quantidade de DNA nuclear de um genoma haplóide não replicado é referida como valor C e pode ser expressa em unidades de massa (normalmente em picogramas) ou em número de pares de nucleotídeos (1pg = $9,65 \times 10^8$ pares de nucleotídeos). O valor C tem sido relatado na literatura por Bennett e colaboradores para mais de 2.500 espécies de angiospermas (Bennett & Smith, 1976; Bennett & Leitch, 1995; 1997) e está unificado em uma base de dados, disponível no endereço www.rgbkew.org.uk/cval/database1.html. Esses dados representam cerca de 1% de todas as angiospermas conhecidas (Bennett & Leitch, 1997).

O tamanho do genoma nuclear difere consideravelmente entre as angiospermas, variando de 0,05 pg em *Cardamine amara* (Brassicaceae, $2n = 16$) a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (Liliaceae, $2n = 48$), o que representa uma diferença de mais de 2.500 vezes (Stace, 2000). Descrito por Thomas, em 1971, como 'paradoxo do valor C' (Stace, 2000), variações na quantidade de DNA nuclear também podem ocorrer entre espécies próximas, como por exemplo, o genoma de centeio, que é cerca de 16 vezes maior que o de arroz (Bennett & Smith, 1976). Apesar dessas grandes diferenças no tamanho do genoma entre as espécies de angiospermas, variações na quantidade de DNA ao nível intraespecífico não são muito freqüentes, sendo, em alguns casos, atribuídas a erros metodológicos. Por outro lado, alterações e polimorfismos cromossômicos podem levar a uma variação intraespecífica (Greilhuber, 1998), como acontece em milho (Poggio et al., 1998), devido, provavelmente, a uma amplificação do número de cópias dos retrotransposons (Sanmiguel & Bennetzen, 1998). Em trigo, contudo, não tem sido observada uma variação significativa entre as cultivares euplóides (Bennett & Smith, 1976; Wetzel et al., 1999), observando-se um valor C de 17,3 pg para *T. aestivum* (Bennett & Smith, 1976) comparado a um tamanho médio de 5-6 pg para a tribo Triticeae (Gill & Gill, 1994).

Em trigo e derivados híbridos, as análises do conteúdo de DNA têm sido utilizadas para a detecção de pequenas diferenças no tamanho do genoma e para a conseqüente discriminação entre plantas euplóides e aneuplóides. Pfosser et al. (1995), por exemplo puderam detectar diferenças de até 1,84% no conteúdo de DNA nuclear, como conseqüência do ganho ou perda de cromossomos ou braços cromossômicos em linhas de adição trigo-centeio e em triticales. Dessa forma, a estimativa da quantidade de DNA nuclear pode ser usada tanto na distinção de grupos de cromossomos com quantidades similares (Vrána et al., 2000) como na estimativa do conteúdo de DNA de cromossomos ou de braços cromossômicos individuais (Lee et al., 1997; Gill et al., 1999). Lee et al. (1997), por exemplo, estimaram o conteúdo de DNA dos 21 tipos cromossômicos de trigo, baseado na diferença do valor 2C de linhas monossômicas de trigo em relação ao valor 2C de um indivíduo euplóide.

As estimativas do tamanho do genoma das angiospermas eram feitas, nas décadas de 50 e 60, através de trabalhosos métodos de extração química. Em seguida, foram desenvolvidas as técnicas de microdensitometria de Feulgen e de citometria de fluxo. Esta última tem permitido uma estimativa do tamanho do genoma mais fácil e mais rápida para inúmeras espécies (Bennett & Leitch, 1997). Mais recentemente, Vilhar et al. (2001) testaram e confirmaram a eficiência do método que utiliza a densidade óptica da coloração Feulgen via microcomputador, propondo o termo citometria fotométrica para os métodos clássicos, baseados na detecção da quantidade de DNA via fotômetro, e citometria de imagem para o método baseado em imagens digitalizadas em microcomputador.

2.4.4 Hibridização *in situ*

A revisão sobre a técnica hibridização *in situ* foi enviada para publicação na forma de capítulo de livro e por isso está apresentada à parte, no item '4 Capítulo de livro', intitulado '**Citogenética molecular em cereais**'.

3 Referências bibliográficas

3 Referências bibliográficas

- ANGRA, D. C. **Transferência da resistência à ferrugem da folha através de cruzamentos intergenéricos entre *Triticum aestivum* e *Agropyron elongatum***. 1995. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ANGRA, D. C.; BARBOSA, M. M.; PRESTES, A. M.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Cultivo de embriões em retrocruzamentos entre *Triticum aestivum* Thell. e *Agropyron elongatum* Host. & Beauv. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 209-215, 1999.
- ASIEDU, R.; MUJEEB-KAZI; KUILE, N. Marker-assisted introgression of alien chromatin into wheat. In: MUJEEB-KAZI, A.; SITCH, L. A. **Review of advances in plant biotechnology**, 1985 – 1988. Mexico, DF: CIMMYT, 1989. p. 133-144.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO. **ABIP Database Results**. Belo Horizonte: ABIP, 2002. Disponível em: <<http://www.abip.org.br>>. Acesso em: 31 de julho de 2002.
- BADAEVA, E. D.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 293-306, 1996.
- BENAVENTE, E.; ORELLANA, J.; FERNÁNDEZ-CALVIN, B. Comparative analysis of the meiotic effects of wheat *ph1b* and *ph2b* mutations in wheat x rye hybrids. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 1200-1204, 1998.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, London, v. 76, p. 113-176, 1995.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms – 583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 169-196, 1997.
- BENNETT, M. D.; SMITH, J. B. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B**, London, v. 274, p. 227-274, 1976.
- BRETTIOL, A. I. Aspectos botânicos em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 215-220, 1971.
- CABRERA, A.; RAMIREZ, M. C.; MARTIN, A. Application of C-Banding and fluorescence *in situ* hybridization for the identification of the trisomics of *Hordeum chilense*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 109, p. 123-129, 1999.
- CAI, X.; JONES, S. S.; MURRAY, T. D. Characterization of an *Agropyron elongatum* chromosome conferring resistance to cephalosporium stripe in common wheat. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 56-62, 1996.
- CHEN, Q.; CONNER, R. L.; AHMAD, F.; LAROCHE, A.; FEDAK, G.; THOMAS, J. B. Molecular characterization of the genome composition of partial amphiploids derived from *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum* and *T. aestivum* x *Th. Intermedium* as sources of resistance to wheat streak mosaic virus and its vector, *Aceria tosichella*. **Theoretical and Applied Genetic**, Berlin, v. 97, p. 1-8, 1998.

- CHEN, Q.; CONNER, R. L.; LAROCHE, A.; JI, W. Q.; ARMSTRONG, K. C.; FEDAK, G. Genomic *in situ* hybridization analysis of *Thinopyrum* chromatin in a wheat-*Th. intermedium* partial amphiploid and six derived chromosome addition lines. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 1217-1223, 1999.
- CUADRADO, A.; RUBIO, P.; FERRER, E.; JOUVE, N. Sequential combinations of C-banding and *in situ* hybridization and their use in the detection of interspecific introgressions into wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 89, p. 107-112, 1996.
- CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T. The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 107, p. 587-594, 1998.
- DRAYE, X.; LIN, Y.-R.; QIAN, X.-Y.; BOWERS, J. E.; BURROW, G. B.; MORRELL, P. L.; PETERSON, D. G.; PRESTING, G. G.; REN, S.-X.; WING, R. A.; PATERSON, A. H. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomolecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, p. 1325-1341, 2001.
- ENDO, T. R.; GILL, B. S. Somatic karyotype, heterochromatin distribution, and nature of chromosome differentiation in common wheat, *Triticum aestivum* L. em Thell. **Chromosoma**, Berlin, v. 89, p. 361-369, 1984.
- FEDAK, G. Procedures for transferring agronomic traits from alien species to crop plants. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatoon. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan Extension, 1998, v. 1, p. 1-7.
- FELDMAN, M. Wheats. In: Simmonds, N. W. **Evolution of crop plants**. Hong Kong: Longman Scientific & Technical, 1986. p. 120-128.
- FLAVELL, R. B.; O' DELL, M.; THOMPSON, W. F.; VINCENTZ, M.; SARDAN, R.; BARKER, R. F. The differential expression of rRNA genes. **Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B**, v. 314, p. 385-397, 1986.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT Database Results**. Rome: FAO, 2002. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org/lim50/nhp-wrap.pl?Production.Crops.Primary&Domain=SUA>>. Acesso em: 03 de outubro de 2002.
- FRIEBE, B.; JIANG, J.; RAUPP, W. J.; MCINTOSH, R. A.; GILL, B. S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. **Euphytica**, Dordrecht, v. 91, p. 59-87, 1996.
- FRIEBE, B.; TULEEN, N.; JIANG, J.; GILL, B. S. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and its cytogenetic relationship with *T. aestivum*. **Genome**, Ottawa, v. 36, p. 731-742, 1993.
- FRIEBE, B.; ZELLER, F. J.; MUKAI, Y.; FORSTER, B. P.; BARTOS, P.; MCINTOSH, R. A. Characterization of rust-resistant wheat-*Agropyron intermedium* derivatives by C-banding, *in situ* hybridization and isozyme analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 775-782, 1992.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: SIDRA Sistema IBGE de Recuperação Automática, 2002. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>>. Acesso em: 03 de outubro de 2002.
- GALE, M. D.; ATKINSON, M. D. CHINOY, C. N.; HARCOURT, R. L.; JIA, J.; LI, Q. Y.; DEVOS, K. M. Genetics maps of hexaploid wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 8., Beijing. **Proceedings...** Beijing: China Agricultural Sciencetech, 1993. v. 1, p. 29-32.
- GILL, B. S. Molecular cytogenetics: integration of C-banding, *in situ* hybridization, and RFLP's in genome mapping and crop improvement of wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT

- GENETICS SYMPOSIUM, 8., Beijing. **Proceedings...** Beijing: China Agricultural Sciencetech, 1993. v. 1, p. 41-47.
- GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, Ottawa, v. 34, p. 830-839, 1991.
- GILL, B. S.; KIMBER, G. Recognition of translocations and alien chromosome transfers in wheat by Giemsa C-banding technique. **Crop Science**, Madison, v. 17, p. 264-266, 1977.
- GILL, B. S.; GILL, K. S. Molecular cytogenetic explorations into the genome of wheat. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatoon. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan Extension, 1998, v. 1, p. 29-32.
- GILL, K. S.; ARUMUGANATHAN, K.; LEE, J. -H. Isolating individual wheat (*Triticum aestivum*) chromosomes arms by flow cytometric analysis of ditelosomic lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p. 1248-1252, 1999.
- GILL, K. S.; GILL, B. S. Mapping in the realm of polyploidy: The wheat model. **BioEssays**, Cambridge, v. 16, p. 841-846, 1994.
- GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. **Annals of Botany**, London, v. 82 (Supplement A), p. 27-35, 1998.
- HOHMANN, U.; GRANER, A.; ENDO, T. R.; GILL, B. S.; HERRMANN, R. G. Comparison of wheat physical maps with barley linkage maps for group 7 chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.91, p. 618-626, 1995.
- HOUCHINS, K.; O'DELL, M.; FLAVELL, R. B. Cytosine methylation and nucleolar dominance in cereal hybrids. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 255, p. 294-301, 1997.
- JAUHAR, P. P. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: DAMANIA, A. B. (ed) **Biodiversity and Wheat Improvement**. Chinchester: Wiley-Sayce, 1993, p.103-117.
- JAUHAR, P. P.; PETERSON, T. *Thinopyrum* and *Lophopyrum* as sources of genes for wheat improvement. **Cereal Research Communications**, v. 24, p. 15-21, 1996.
- JIANG, J.; FRIEBE, B.; DHALIWAL, H. S.; MARTIN, T. J.; GILL, B. S. Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron elongatum* chromatin in wheat germplasm specifying resistance to wheat streak mosaic virus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 41-48, 1993.
- JIANG, J.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 73, p. 199-212, 1994.
- LACADENA, J. R.; CERMEÑO, M. C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J. L. Analysis of nucleolar activity in *Agropyron elongatum*, its amphiploid with *Triticum aestivum* and the chromosome addition lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 68, p. 75-80, 1984.
- LACADENA, J. R.; CERMEÑO, M. C.; ORELLANA, J.; SANTOS, J. L. Nuclear competition in *Triticeae*. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE, 3., 1987, Kew. **Proceedings...** Kew. London: HMSO, 1988. p. 151-165.
- LANGE, W.; JOCHEMSEN, G. J. Use of the gene pools of *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* and *Aegilops squarrosa* for the breeding of common wheat (*T. aestivum*), through chromosome-doubled hybrids. *I. Two strategies for the production of the amphiploids*. **Euphytica**, Dordrecht, v. 59, p. 197-212, 1992.
- LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. The timing of chromosome elimination wheat × maize crosses. **Genome**, Ottawa, v. 32, p. 953-961, 1989.
- LAW, C. N. Chromosome manipulation in wheat. In: BENNETT, M. D.; BOBROW, M.; HEWITT, G. M. **Chromosomes Today**. London: George Allen & Unwin, 1981. v.7, p. 194-205.

- LEE, J.-H.; YEN, Y.; ARUMUGANATHAN, K.; BAENZINGER, P. S. DNA content of wheat monosomics at interphase estimated by flow cytometry. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 1300-1304, 1997.
- LIMA-BRITO, J.; GUEDES-PINTO, H.; HESLOP-HARRISON, J. S. The activity of nucleolar organizing chromosomes in multigenic F₁ hybrids involving wheat, triticale, and tritordeum. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 763-768, 1998.
- LINDE-LAURSEN, I. B.; VON BOTHMER, R.; JACOBSEN, N. Relationships in the genus *Hordeum*: Giemsa C-banded karyotypes. **Hereditas**, Lund, v. 116, p. 111-116, 1992.
- MAESTRA, B.; NARANJO, T. Genome evolution in Triticeae. In: OLMO, E.; REDI, C. A. **Chromosomes Today**. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2000. v. 13, p. 155-167.
- MAESTRA, B.; NARANJO, T. Structural chromosome differentiation between *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* and *T. aestivum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 744-750, 1999.
- MARTINI, G. M.; FLAVELL, R. B. The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study at three development stages. **Heredity**, Essex, v. 54, p. 111-120, 1985.
- MCINTOSH, R. A.; HART, G. E.; DEVOS, K. M.; GALE, M. D.; ROGERS, W. J. Patogenic disease/pest reaction. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatoon. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan Extension, 1998, v. 5, p. 129-139.
- MEDINA, F. J.; CERDIDO, A.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. **Experimental Cell Research**, New York, v. 221, p. 111-125, 1995.
- MILACH, S. C. K.; CRUZ, R. P. da. Piramidização de genes de resistência às ferrugens em cereais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 685-689, 1997.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Citogenética. In: OSÓRIO, E. A. **Trigo no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. v. 1, p. 96-143.
- MUKAI, Y.; ENDO, T. R.; GILL, B. S. Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. **Chromosoma**, Berlin, v. 100, p. 71-78, 1991.
- NARANJO, T. Chromosome structure of durum wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 79, p. 397-400, 1990.
- PFOSSER, M.; AMON, A.; LAFFERTY, J.; HEBERLE-BORS, E.; LELLEY, T. Gain or loss of single chromosomes in wheat-rye addition lines and in 6x triticale detected by flow cytometry. **Plant Breeding**, Belfast, v. 114, p. 555-557, 1995.
- PIKAARD, C. S. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 163-177, 2000.
- POGGIO, L.; ROSATO, M.; CHIAVARINO, A. M., NARANJO, C. A. Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). **Annals of Botany**, London, v. 82 (Supplement A), p. 107-115, 1998.
- RODRÍGUEZ, S.; MAESTRA, B.; PERERA, E.; DÍEZ M.; NARANJO, T. Pairing affinities of the B- and G-genome chromosomes of polyploid wheats with those of *Aegilops speltoides*. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 814-819, 2000.
- SANMIGUEL, P.; BENNETZEN, J. L. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons. **Annals of Botany**, London, v. 82 (Supplement A), p. 37-44, 1998.

- SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 10, p. 31-51, 1976.
- SEARS, E. R. Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In: LEWIN, D. R. **Chromosome manipulation and plant genetics**. London: Oliver and Boyd, 1966. p. 29-47.
- SECRETARIA DA RECEITA FEDERAL. **Aduana e Comércio Exterior**. [S.l.]: Secretaria da Receita Federal, 2002. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/aduana/importacao/2001/dezembro/tabelas/tabela22.htm>>. Acesso em: 24 de outubro de 2002.
- SETHI, G. S. Towards the introgression of rye genes into wheat. In: MUJEEB-KAZI, A.; SITCH, L. A. **Review of advances in plant biotechnology**, 1985 – 1988. Mexico, DF: CIMMYT, 1989. p. 145-155.
- SHARMA, H. C.; GILL, B. S. Current status of wide hybridization in wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 32, p. 17-31, 1983a.
- SHARMA, H. C.; GILL, B. S. New hybrids between *Agropyron* and wheat. 2. Production, morphology and cytogenetic analysis of F₁ hybrids and backcross derivatives. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 66, p. 111–121, 1983b.
- SHARP, P. J.; CHAO, S.; DESAI, S.; GALE, M. D. The isolation, characterization and application in Triticeae of a set of wheat RFLP probes identifying each homoeologous chromosome arm. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 78, p. 342-348, 1989.
- SILVA, D. B.; GUERRA, A. F.; REIN, T. A.; ANJOS J. de R. N. dos; ALVES, R. T.; ROGRIGUES, G. C.; CARDOSO E SILVA, I. A. **Trigo para o abastecimento familiar: do plantio à mesa**. Brasília: Embrapa – SPI, 1996. p. 13-18.
- STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. **Taxon**, v. 49, p. 451-477, 2000.
- VILHAR, B.; GREILHUBER, J.; KOCE, J. D.; TEMSCH, E. M.; DERMASTIA, M. Plant genome size measurement with DNA image cytometry. **Annals of Botany**, London, v. 87, p. 719-728, 2001.
- VRÁNA, J.; KUBALÁKOVÁ, M.; ŠIMKOVÁ, H.; ČÍHALÍKOVÁ, J.; LYSÁK, M. A.; DOLEŽEL, J. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genetics**, Chapel Hill, v. 156, p. 2033-2041, 2000.
- WANG, S. L.; QI, L. L.; CHEN, P. D.; LIU, D. J.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Molecular cytogenetic identification of wheat-*Elymus tsukushiense* introgressions lines. **Euphytica**, Dordrecht, v. 107, p. 217-224, 1999.
- WETZEL, J. B.; AREF, S.; BALIGAR, V. C.; RAYBURN, A. L. A lack of nuclear DNA content variability among wheat near isolines differing in aluminum response. **Annals of Botany**, London, v. 83, p. 725-728, 1999.
- WHEAT GENETICS RESOURCE CENTER. **Current theory of the evolution**. Kansas: WGRC, 2002. Disponível em: <<http://www.ksu.edu/wgrc/Extras/evolve.html>>. Acesso em: 24 de outubro de 2002.

4 *Capítulo de livro*

Citogenética molecular em cereais

Brasileiro-Vidal, A. C.; Guerra, M.

In: BRAMMER, S. P. (ed)
**Atualização em técnicas celulares e moleculares
aplicadas ao melhoramento genético vegetal.**
Passo Fundo: EMBRAPA. No prelo.

Citogenética molecular em cereais

Ana Christina Brasileiro-Vidal

Marcelo Guerra (✉)²

Introdução

A manipulação citogenética é um dos métodos mais importantes no melhoramento de cereais, usado principalmente para o monitoramento da transferência de variabilidade genética entre espécies. A análise cromossômica através da citogenética molecular tem sido fundamental para o entendimento da evolução, genética e estabilidade cariotípica desses materiais.

A caracterização cromossômica foi por muito tempo baseada unicamente em parâmetros morfológicos, como tamanho dos braços, posição dos centrômeros e localização das constrições secundárias. Com a introdução das técnicas de bandeamento, que permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada (bandas), a caracterização cromossômica foi significativamente melhorada. No trigo comum, por exemplo, todos os cromossomos podem ser reconhecidos pelo padrão de distribuição distinto de bandas heterocromáticas (Gill et al., 1991). Contudo, muitas outras espécies apresentam cariótipos com cromossomos de tamanho e padrão de bandas uniformes. Nestes casos, o desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* tem possibilitado a identificação de cromossomos individuais, com base na localização de seqüências de DNA associada a outras características cromossômicas.

Em linhas gerais, essa técnica envolve a preparação de lâminas, o isolamento e a marcação da seqüência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos. O DNA marcado funciona como uma sonda para localizar as seqüências do DNA cromossomal complementares a ela, denominadas DNA alvo. Para visualizar as regiões hibridizadas com a sonda, é necessário associar um corante à sonda e um outro corante ao restante dos cromossomos. A detecção da sonda era feita, inicialmente, por auto-radiografia, utilizando radioisótopos, ou através da

² Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil. Fax: 55 81 32718348. E-mail: mguerra@ufpe.br

associação da seqüência de DNA com um sistema enzimático (geralmente a fosfatase alcalina). Atualmente, a detecção da sonda é, em geral, realizada mediante o emprego de fluorocromos (moléculas que fluorescem quando excitadas por um comprimento onda de luz ultravioleta específico).

A técnica de hibridização *in situ* utilizando fluorocromos, denominada FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization), tem sido amplamente utilizada para localizar diferentes seqüências de DNA em cromossomos mitóticos ou meióticos, em núcleos interfásicos e em fibras de cromatina estendidas (Dong et al., 2001). A detecção dessas seqüências *in situ* tem gerado avanços importantes na citogenética de plantas, destacando-se a construção de mapas físicos, a investigação detalhada da estrutura cromossômica, o acompanhamento da quantidade de cromatina introgridida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas.

O princípio da técnica de FISH

As principais etapas da técnica de hibridização *in situ* estão representadas na Fig. 1. O primeiro passo é o desenvolvimento da sonda, que são seqüências de DNA, geralmente com cerca de 100 a 300 pb, complementares ao DNA alvo (Fig. 1a). Essas seqüências podem ser cópias de um gene ou de qualquer fragmento do DNA que possa ser isolado. A marcação da sonda pode ser feita pela substituição de alguns de seus nucleotídeos por nucleotídeos idênticos conjugados a fluorocromos (marcação direta) ou a moléculas marcadoras, localizadas posteriormente utilizando anticorpos conjugados a fluorocromos (marcação indireta). As moléculas marcadoras mais usadas na marcação indireta são a biotina e a digoxigenina, enquanto os fluorocromos mais utilizados para sinalizar a presença das sondas são o FITC (isotiocianato de fluoresceína), de cor verde, e a rodamina, de cor vermelha.

A preparação de lâminas (Fig. 1b) segue basicamente os mesmos procedimentos utilizados para outras técnicas, como o bandeamento C ou a coloração com fluorocromos (ver Guerra & Lopes, 2002). No caso da FISH, é recomendada uma seleção cuidadosa da qualidade das lâminas devido aos custos elevados da técnica. Para isso, os cromossomos devem ser observados em microscopia de contraste de fase ou após coloração simples e direta, como por exemplo com carmim acético ou

com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Apenas as melhores lâminas são estocadas a –20°C e, posteriormente, utilizadas para a hibridização.

Uma vez obtidas a sonda marcada e as lâminas adequadas, o passo seguinte é a hibridização da sonda no cromossomo. Para isso, é necessário primeiramente desnaturar tanto a sonda em solução quanto o DNA cromossomal (Figs. 1c, d), o que é feito por aquecimento a temperaturas entre 70 e 80°C. Em seguida, é feita a renaturação, ou a hibridização *in situ* propriamente dita, na qual ocorre a associação da sonda com o DNA cromossomal. Nessa fase, as lâminas contendo a sonda em solução são mantidas a 37°C, por cerca de 18 horas (Fig. 1e). Após o processo de hibridização, as lâminas passam por uma série de banhos pós-hibridização. Estes têm a função de remover as seqüências incompletamente hibridizadas, resultantes de pareamentos inespecíficos entre a sonda e as seqüências do DNA cromossomal parcialmente similares ao DNA alvo.

Se a marcação foi feita com fluorocromos (método direto), os sítios hibridizados com a sonda podem ser visualizados no microscópio de fluorescência, logo após a renaturação. Por outro lado, se a marcação foi feita com biotina ou digoxigenina, será necessário utilizar moléculas reconhecedoras acopladas a fluorocromos (FITC ou rodamina). A biotina, por exemplo, pode ser reconhecida tanto com o anticorpo antibiotina quanto com a avidina ou estreptoavidina (moléculas com alta afinidade pela biotina). Para a digoxigenina, apenas a antidigoxigenina pode ser usada na detecção (Fig. 1f). Tanto na marcação direta quanto na indireta, os cromossomos precisam ser contracorados e a lâmina montada com lamínula. A contracoloração permite visualizar melhor a morfologia dos cromossomos e é feita com o fluorocromo DAPI, de cor azul, ou com o iodeto de propídeo, vermelho (Fig. 1g). Observe na Fig. 2a, cromossomos corados com DAPI (azul) e, na Fig. 2b, a mesma célula hibridizada com duas sondas, uma marcada com digoxigenina e detectada com antidigoxigenina-FITC (verde) e outra marcada diretamente com rodamina (vermelho). Nas Figs. 3a e 3b, as sondas foram marcadas com rodamina (vermelho) e os cromossomos contracorados com DAPI (azul).

O número de sondas que podem ser hibridizadas simultaneamente depende do número de fluorocromos distintos que podem ser usados na marcação ou na detecção. Os fluorocromos mais utilizados são de cor vermelha ou verde e por isso se detecta no máximo duas sondas em cada hibridização. Uma alternativa para aumentar o número de seqüências detectadas em uma mesma célula é a rehibridização, ou seja, uma vez

concluída a FISH e fotografadas as melhores células, as lâminas são descoradas e reutilizadas para novas hibridizações. Em arroz, por exemplo, foi possível localizar dez seqüências de DNA diferentes em um mesmo cromossomo, realizando cinco hibridizações com duas sondas em cada (Cheng et al., 2001).

Tipos de seqüências de DNA utilizadas na hibridização *in situ*

Seqüências repetidas em tandem

Muitos tipos de seqüências de DNA têm sido visualizados através da hibridização *in situ*, desde as de cópias únicas ou com baixo número de cópias até aquelas altamente repetitivas. As primeiras seqüências detectadas foram as de DNA repetitivo, cujas unidades de repetição podem estar distribuídas em tandem ou dispersas ao longo do genoma. As seqüências em tandem ocorrem em blocos de centenas a milhares de cópias, localizadas em um ou mais sítios de um dado genoma. Essa categoria inclui DNA codificante, como genes para RNAr, e não-codificante, como DNA telomérico, centromérico e outros (Leitch et al., 1994). A localização desses sítios tem fornecido informações importantes sobre a estrutura e a evolução dos genomas, além de permitir a detecção de alterações cromossômicas estruturais.

Os genes ribossomais 5S e 45S têm sido as seqüências mais utilizadas na hibridização *in situ*. A unidade de repetição do DNAr 45S é uma seqüência com cerca de 9,2 kb contendo os genes para DNAr 18S, 5,8S e 26S, sempre nessa ordem. Esses genes foram muito bem conservados durante a evolução vegetal, o que permite a hibridização de uma seqüência extraída de uma espécie em qualquer outra espécie vegetal. O melhor exemplo disso é a sonda pTa71, oriunda de trigo (Gerlach & Bedbrook, 1979), utilizada para localizar esses sítios em organismos tão diferentes como o feijão caupi (Guerra et al., 1996) e a samambaia *Osmunda japonica* (Kawakami et al., 1999). O gene ribossomal 5S é uma seqüência menor e relativamente menos conservada. Ainda assim, a sonda pTa794, contendo um fragmento de 410 pb de DNAr 5S também isolado de trigo (Gerlach & Dyer, 1980), hibridiza bem em qualquer outra Triticeae e na maioria das angiospermas. Os sítios de DNAr ocorrem freqüentemente em diversos cromossomos das espécies de Triticeae, servindo como marcadores cromossômicos que, aliados à pequena variação de tamanho dos cromossomos e de posição dos centrômeros, facilitam a diferenciação cariotípica. Em *Leymus* (Triticeae),

por exemplo, foi possível analisar a similaridade do genoma de diferentes espécies com base nos sítios de hibridização desses genes (Anamthawat-Jónsson & Bödvarsdóttir, 2001). As Figs. 2a e 2b mostram uma metáfase de *Thinopyrum ponticum* (Triticeae), aonde se observa a localização de 20 sítios de DNAr 5S e 17 sítios de DNAr 45S.

Além dos genes ribossomais, as seqüências em tandem mais utilizadas na FISH são as do DNA telomérico e as do DNA centromérico. A hibridização de seqüências exclusivas da região terminal ou da região centromérica permite identificar alterações estruturais que modifiquem a localização dessas sondas, como deleções, inversões ou translocações. Por exemplo, em linhas de translocação trigo × centeio, foi possível identificar quais os cromossomos ou braços cromossômicos eram oriundos de trigo ou de centeio, através de sondas centroméricas específicas para centeio e para trigo (Zhang et al., 2001).

Existem ainda outras seqüências de DNA repetitivo, que hibridizam em locais diferentes dos cromossomos de uma ou mais espécies. Essas seqüências podem ser exclusivas de uma espécie ou presentes em várias espécies ou gêneros relacionados. Por exemplo, a seqüência pSc74 (480 pb) parece ser específica para centeio (Cuadrado et al. 1997), enquanto a seqüência pSc119.2 (120 pb) é oriunda de centeio, mas pode ser detectada por FISH em várias espécies da tribo Triticeae (Lapitan et al., 1987; Fig. 3a). Essas sondas auxiliam na identificação dos pares cromossômicos em uma espécie ou dos cromossomos de diferentes espécies em híbridos interespecíficos. Em um triticales (trigo × centeio) hexaplóide, por exemplo, foi possível o reconhecimento de todos os 42 cromossomos através da sonda pSc119.2 associada a outras características cromossômicas (Cuadrado & Schwarzacher, 1998).

Os microssatélites, formados geralmente por unidades de repetição com cinco nucleotídeos ou menos, também se encontram arranjados em tandem e podem ser detectados por FISH. Em trigo, o microssatélite (AAC)₅ hibridiza em vários sítios do genoma de forma semelhante às bandas N, possibilitando a identificação dos sete pares cromossômicos do genoma B, além de alguns cromossomos do genoma A (Cuadrado et al., 2000). A vantagem da hibridização *in situ* sobre as técnicas de bandeamento é a boa repetição dos resultados e a possibilidade de utilizar várias sondas em uma mesma célula, incrementando a análise de rearranjos cromossômicos e a detecção de cromossomos introgrididos em híbridos interespecíficos (Fig. 3b).

Seqüências repetitivas dispersas

A segunda categoria de DNA repetitivo é a de seqüências dispersas, intercaladas por seqüências de DNA de cópia simples ou repetitivas. Alguns DNAs dispersos se encontram distribuídos mais ou menos uniformemente por todo o genoma, o que possibilita a detecção dos cromossomos de uma espécie em um híbrido sintético ou do genoma de um ancestral diplóide contido em um alopoliplóide. Por exemplo, o clone pAs120a, isolado de *Avena strigosa*, uma espécie diplóide com genoma AA, permite a identificação dos cromossomos do genoma A em aveia, um hexaplóide com genoma AACCCDD. Por outro lado, o clone pAm1, oriundo do diplóide *A. murphyi* (CC), permite o reconhecimento dos cromossomos do genoma C e uma hibridização com essas duas sondas diferencia claramente os três genomas de aveia (Linares et al., 1998; 2001).

Um outro exemplo de seqüências dispersas são os retrotransposons, amplamente encontrados nos genomas de plantas, especialmente naqueles com elevada quantidade de DNA, como na maioria das Triticeae. Em algumas espécies, como cevada e aveia, os retrotransposons são amplamente encontrados em todos os cromossomos (Vicient et al., 1999; Linares et al., 2001), podendo também ser usados como sondas para diferenciar os genomas de híbridos e em estudos evolutivos.

Seqüências de cópias únicas ou com baixo número de cópias

Em vegetais, até recentemente, poucas seqüências de DNA de cópia única ou com baixo número de cópias haviam sido detectadas por FISH. Um dos poucos exemplos conhecidos era o gene da α -amilase-2 de cevada (Leitch & Heslop-Harrison, 1993). Isto se deve à menor sensibilidade da técnica de FISH nas preparações de vegetais, dificultando a detecção de sondas menores que 5 kb (Dong et al., 2001). Essa dificuldade tem sido superada pela utilização de clones de grandes insertos de DNA contendo a seqüência simples desejada, como, por exemplo, marcadores de RFLP ancorados em YACs ou BACs (Cheng et al., 2001). De modo semelhante, no estudo de plantas transgênicas, a detecção dos transgenes tem se limitado a insertos grandes ou àqueles representados por muitas cópias no genoma, variando de 10 – 60 kb no total (Dong et al., 2001).

DNA genômico

A hibridização *in situ* pode utilizar como sonda o DNA genômico total de uma espécie, proporcionando a marcação de todos os seus cromossomos. Esse tipo de hibridização é denominado de GISH (Genomic *In Situ* Hybridization). A técnica de GISH permite distinguir os cromossomos oriundos de diferentes parentais, em híbridos interespecíficos ou em espécies aloploplóides (Raina & Rani, 2001). Por exemplo, no trigo hexaplóide (AABBDD), os três genomas podem ser distinguidos simultaneamente com o uso de sondas genômicas oriundas de suas espécies ancestrais (Mukai et al., 1993). O efeito produzido por GISH é idêntico àquele obtido com o DNA repetitivo disperso, com a vantagem de ser muito mais fácil obter a sonda. Além disso, nem sempre um único DNA disperso marca todo o genoma.

Na hibridização genômica *in situ*, o objetivo é localizar os cromossomos de apenas um dos parentais envolvidos na formação do híbrido. Dessa forma, o DNA do segundo parental deve ser bloqueado, a fim de evitar a hibridização de seqüências comuns a ambos os genomas. Para isso, hibridiza-se, em conjunto com a sonda, o DNA não-marcado do genoma que se deseja bloquear, numa proporção suficiente para impedir a marcação de cromossomos do segundo parental. Por exemplo, para distinguir os cromossomos de centeio dos de trigo, na linhagem 140061 de triticales octoplóide ($2n=56$) produzida pela Embrapa Trigo, foi utilizado como sonda o DNA total de centeio marcado com digoxigenina/ antidigoxigenina-FITC e como bloqueador o DNA total de trigo não-marcado. O DNA sem marcação, utilizado numa concentração 10 vezes mais alta que a da sonda, funcionou como bloqueador das seqüências comuns ao trigo e ao centeio, ficando as seqüências exclusivas de centeio coradas fortemente com o FITC. Os 14 cromossomos oriundos de centeio mostraram uma marcação forte em toda a sua extensão (exceto nos blocos de heterocromatina, que possuem seqüências comuns às duas espécies), enquanto os 42 cromossomos de trigo apresentaram apenas uma coloração fraca (Fig. 4a). Essa imagem foi sobreposta à dos cromossomos contracolorados com DAPI, para permitir visualizar melhor os cromossomos de trigo (Fig. 4b).

A hibridização genômica *in situ* tem sido importante nos programas de melhoramento de cereais, por permitir o monitoramento da cromatina introgridida nas sucessivas gerações de retrocruzamentos e de autofecundações. Dessa forma, têm sido estudadas diversas linhas de adição e de substituição cromossômicas, envolvendo

trigo e espécies pertencentes a gêneros próximos, como *Leymus*, *Thinopyrum*, *Hordeum* e *Secale* (Schwarzacher et al. 1992; Wang et al., 1999). Translocações e recombinações também têm sido identificadas em plantas de origem híbrida. Wetzel & Rayburn (2000), por exemplo, identificaram por GISH a introgressão de um braço cromossômico de centeio em uma cultivar de trigo, resultante de uma translocação entre cromossomos dessas espécies. Jiang & Gill (1993) observaram, em uma linha de translocação de trigo, que o cromossomo 5A exibia uma marcação do tipo 'zebra', causada por múltiplas translocações de segmentos cromossômicos de *Elymus trachycaulus* para o genoma do trigo. De modo semelhante, pequenos segmentos cromossômicos de centeio também foram transferidos e localizados por GISH em trigo (Ribeiro-Carvalho et al., 1997).

A GISH também tem sido usada para identificar pareamentos cromossômicos intergenômicos na meiose de híbridos de *Triticum* × *Thinopyrum* (King et al., 1993) *Triticum* × *Secale* (King et al., 1994) e de outros híbridos. Como os cromossomos podem ser detectados em todos os estágios do ciclo celular, a técnica pode fornecer ainda informações sobre a organização e a distribuição espacial dos genomas no núcleo interfásico. Leitch et al. (1991), por exemplo, observaram que os conjuntos cromossômicos parentais do híbrido cevada × *Secale africanum* se encontram em domínios separados no núcleo interfásico e tendem a manter as mesmas posições ao longo do ciclo celular.

Seqüências que marcam um único par cromossômico (pintura cromossômica)

Uma variação da técnica de hibridização *in situ* utiliza sondas isoladas de cromossomos individuais que marcam apenas um par cromossômico ou segmentos cromossômicos derivados daquele par. As seqüências comuns a outros cromossomos devem ser suprimidas da hibridização, utilizando como bloqueador o DNA genômico ou seqüências repetitivas dispersas, ambos não-marcados (Schubert et al., 2001). O resultado é que apenas um par cromossômico parece inteiramente marcado, como uma 'pintura cromossômica'. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em cromossomos humanos e em estudos comparativos em mamíferos (Ferguson et al. 2000).

Em vegetais, a pintura cromossômica ainda é pouco usada, devido à abundância de seqüências repetitivas dispersas nos genomas vegetais, o que dificulta

a eficiência do bloqueio (Schubert et al., 2001). Um bom exemplo da aplicação dessa técnica em cereais está em centeio, no qual o cromossomo 1R foi isolado, amplificado por PCR e clonado para criar uma biblioteca cromossomo-específica do tipo pintura (Zhou et al., 1999).

Técnicas mais recentes

Os exemplos anteriores mostram a importância da hibridização *in situ* na análise cariotípica relacionada ao melhoramento vegetal e a estudos evolutivos. Atualmente, os maiores desafios têm sido a detecção e a integração, em mapas genéticos, de seqüências de pequeno tamanho, como os marcadores moleculares e os genes de cópia única.

Um fator que interfere na visualização dos sinais é o nível de condensação dos cromossomos mitóticos, que impede uma melhor resolução das seqüências separadas a menos de 1 Mpb (Yamamoto & Mukai, 1998). Uma alternativa para aumentar o nível de resolução da hibridização *in situ* é o uso de cromossomos meióticos na fase de paquíteno. Esses cromossomos encontram-se de 7 a 40 vezes mais estendidos que os cromossomos mitóticos (de Jong et al., 2000). Um outro procedimento auxiliar no mapeamento por FISH é a técnica de 'fibras estendidas', que permite uma resolução acima de 0,7 kb. Nesta técnica, o núcleo interfásico é lisado e as fibras de DNA do núcleo são espalhadas na superfície da lâmina. A hibridização *in situ* é feita nessas fibras (Yamamoto & Mukai, 1998).

Finalmente, aperfeiçoamentos da FISH, que possibilitem a visualização simultânea de várias seqüências alvo, contribuirão para a análise de poliplóides mais complexos, como por exemplo, o milho, que era descrito anteriormente como diplóide (Gaut et al., 2000). Esses aprimoramentos também serão importantes para facilitar a integração dos mapas cromossômicos com os mapas de ligação já existentes e a análise comparada desses mapas em espécies próximas (Cheng et al., 2001; Draye et al., 2001).

Referências bibliográficas

- ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; BÖDVARSDÓTTIR, S. K. Genomic and genetic relationships among species of *Leymus* (Poaceae: Triticeae) inferred from 18S-26S ribosomal genes. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, p. 553-559, 2001.
- CHENG, Z.; PRESTING, G. G.; BUELL, C. R.; WING, R. A.; JIANG, J. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. **Genetics**, Chapel Hill, v. 157, p. 1749-1757, 2001.
- CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T. The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 107, p. 587-594, 1998.
- CUADRADO, A.; SCHWARZACHER, T.; JOUVE, N. Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 711-717, 2000.
- CUADRADO, A.; VITELLOZZI, F.; JOUVE, N.; CEOLINI, C. Fluorescence *in situ* hybridization with multiple repeated DNA probes applied to the analysis of wheat-rye chromosome pairing. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 347-355, 1997.
- de JONG, J. H.; ZHONG, X.-B.; FRANSZ, P. F.; WENNEKES-VAN EDEN, J.; JACOBSEN, E.; ZABEL, P. High resolution FISH reveals the molecular and chromosomal organization of repetitive sequences of individual tomato chromosomes. In: OLMO, E.; REDİ, C. A. **Chromosomes Today**. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2000. v. 13, p. 267-275.
- DONG, J.; KHARB, P.; CERVERA, M.; HALL, T. C. The use of FISH in chromosomal localization of transgenes in rice. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, p. 105-113, 2001.
- DRAYE, X.; LIN, Y.-R.; QIAN, X.-Y.; BOWERS, J. E.; BURROW, G. B.; MORRELL, P. L.; PETERSON, D. G.; PRESTING, G. G.; REN, S.-X.; WING, R. A.; PATERSON, A. H. Toward integration of comparative genetic, physical, diversity, and cytomelecular maps for grasses and grains, using the sorghum genome as a foundation. **Plant Physiology**, Washington, v. 125, p. 1325-1341, 2001.
- FERGUSON-SMITH, M. A.; O'BRIEN, P. C. M.; RENS, W.; YANG, F. Comparative chromosome painting. In: OLMO, E.; REDİ, C. A. **Chromosomes Today**. Switzerland: Birkhäuser Verlag, 2000. v. 13, p. 259-265.
- GAUT, B. S.; D'ENNEQUIN, M. T.; PEEK, A. S.; SAWKINS, M. C. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, p. 7008-7015, 2000.
- GERLACH, W. L.; BEDBROOK, J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, p. 1869-1885, 1979.

- GERLACH, W. L.; DYER, T. A. Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat, which contains 5S rDNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4851–4865, 1980.
- GILL, B. S.; FRIEBE, B.; ENDO, T. R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). **Genome**, Ottawa, v. 34, n. 5, 1991.
- GUERRA, M.; KENTON, A.; BENNETT, M. D. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. **Annals of Botany**, London, v. 78, p. 157-161, 1996.
- GUERRA, M.; LOPES, M. J. S. **Como analisar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC: Ribeirão Preto, 2002, 132p.
- JIANG, J.; GILL, B. S. A zebra chromosome arising from multiple translocations involving non-homologous chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 102, p. 612-617, 1993.
- KAWAKAMI, S. M.; KONDO, K.; KAWAKAMI, S. Analysis of nucleolar organizer constitution by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in diploid and artificially produced haploid sporophytes of the fern *Osmunda japonica* (*Osmundaceae*). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 216, p. 325-331, 1999.
- KING, I. P.; PURDIE, K. A.; ORFORD, S. E.; READER, S. M.; MILLER, T. E. Detection of homoeologous chiasma formation in *Triticum durum* x *Thinopyrum bessarabicum* hybrids using genomic *in situ* hybridization. **Heredity**, Essex, v. 71, p. 369-372, 1993.
- KING, I. P.; READER, S. M.; PURDIE, K. A.; ORFORD, S. E.; MILLER, T. E. A study of the homoeologous pairing promoter on chromosome pairing in wheat/rye hybrids using genomic *in situ* hybridization. **Heredity**, Essex, v. 72, p. 318-321, 1994.
- LAPITAN, N. L. V.; GILL, B. S.; SEARS, R. G. Genomic and phylogenetic relationships among rye and perennial species in the Triticeae. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 682–687, 1987.
- LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. An introduction to *in situ* hybridization. In: LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I. J. ***In situ* hybridization: a practical guide**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994, Cap.1, p. 1-2.
- LEITCH, A. R.; SCHWARZACHER, T.; MOSGÖLLER, W.; BENNETT, M. D.; HESLOP-HARRISON, J. S. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. **Chromosoma**, Berlin, v. 101, p. 206-213, 1991.
- LEITCH, I. J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of four sites 5S rDNA sequences and one site of the α -amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). **Genome**, Ottawa, v. 36, p. 517-523, 1993.
- LINARES, C.; FERRER, E.; FOMINAYA, A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 12450-12455, 1998.
- LINARES, C.; LOARCE, Y.; SERNA, A.; FOMINAYA, A. Isolation and characterization of two novel retrotransposons of the Ty1-*copia* group in oat genomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 110, p. 115-123, 2001.

- MUKAI, Y.; NAKAHARA, Y.; YAMAMOTO, M. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. **Genome**, Ottawa, v. 36, p. 489-494, 1993.
- RAINA, S. N.; RANI, V. GISH technology in plant genome research. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, p. 83-104, 2001.
- RIBEIRO-CARVALHO, C.; GUEDES-PINTO, H.; HARRISON, G.; HESLOP-HARRISON, J. S. Wheat-rye chromosome translocation involving small terminal translocations and intercalary rye chromosome segments in the Portuguese wheat landrace Barbela. **Heredity**, Essex, v. 78, p. 539-546, 1997.
- SCHUBERT, I.; FRANSZ, P. F.; FUCHS, J.; de JONG, J. H. Chromosome painting in plants. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, p. 57-69, 2001.
- SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; HARRISON, G. E.; ISLAM, A. K. M. R.; JIA, J. Z.; KING, I. P.; LEITCH, A. R.; MILLER, N.; READER, S. M.; ROGERS, W. J.; SHI, M.; HESLOP-HARRISON, J. S. Genomic *in situ* hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, p. 778-786, 1992.
- VICIENT, C. M.; SUONIEMI, A.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; TANSKANEN, J.; BEHARAV, A. Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1769-1784, 1999.
- WANG, S. L.; QI, L. L.; CHEN, P. D.; LIU, D. J.; FRIEBE, B.; GILL, B. S. Molecular cytogenetic identification of wheat-*Elymus tsukushiense* introgressions lines. **Euphytica**, Dordrecht, v. 107, p. 217-224, 1999.
- WETZEL, J. B.; RAYBURN, A. L. Use of fluorescence genomic *in situ* hybridization (GISH) to detect the presence of alien chromatin in wheat lines differing in nuclear DNA content. **Cytometry**, New York, v. 41, p. 36-40, 2000.
- YAMAMOTO, M.; MUKAI, Y. High-resolution mapping in wheat and rye by FISH on extended DNA fibers. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatchewan. **Proceedings...** Saskatchewan: University Extension Press, 1998, v. 1, p. 12-16.
- ZHANG, P.; FRIEBE, B.; LUKASZEWSKI, A. J.; GILL, B. S. The centromere structure in Robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary constriction. **Chromosoma**, Berlin, v. 110, p. 335-344, 2001.
- ZHOU, Y.; ZANMIN, H.; DANG, B.; WANG, H.; DENG, X.; WANG, L.; CHEN, Z. Microdissection and microcloning of rye (*Secale cereale* L.). **Chromosoma**, Berlin, v. 108, p. 250-255, 1999.

Legendas

Fig. 1. Esquema simplificado da técnica de hibridização *in situ*. **(a)** A seqüência de DNA a ser utilizada como sonda deve ser isolada e marcada. **(b)** Paralelamente, devem ser preparadas lâminas com cromossomos bem espalhados. **(c, d, e)** Posteriormente, os DNAs da sonda e dos cromossomos devem ser desnaturados e colocados em contato para que ocorra a renaturação e conseqüentemente a hibridização *in situ*. **(f, g)** A localização da sonda é feita por uma molécula reconhecedora ligada a um fluorocromo e observada na microscopia de fluorescência.

Fig. 2. Célula em metáfase de *Thinopyrum ponticum* ($2n = 10x = 70$). **(a)** Cromossomos corados com DAPI (azul), evidenciando a sua morfologia. **(b)** A mesma célula anterior, mostrando a localização *in situ* de 20 sítios de DNAr 5S, marcados com digoxigenina e detectados com antidigoxigenina-FITC (verde), e de 17 sítios de DNAr 45S, marcados diretamente com rodamina (vermelho). Barra corresponde a 10 μm . Fotos: Brasileiro-Vidal et al., em preparação.

Fig. 3. Hibridização *in situ* utilizando sondas de DNA repetitivo em tandem, marcadas diretamente com rodamina (vermelho), mostrando os cromossomos contracorados com DAPI (azul). **(a)** Metáfase de *Triticum turgidum* ($2n = 4x = 28$), hibridizada com a sonda pSc119.2. **(b)** Célula do híbrido trigo \times *Thinopyrum ponticum* ($2n = 8x = 56$), hibridizada com o microssatélite (AAC)₅. As barras correspondem a 10 μm . Fotos: **a**, Angeles Cuadrado; **b**, original.

Fig. 4. Hibridização genômica *in situ* em triticales ($2n = 8x = 56$), utilizando como sonda o DNA genômico de centeio e como bloqueador o DNA genômico de trigo. **(a)** Localização *in situ* dos 14 cromossomos de centeio marcados com digoxigenina e detectados com antidigoxigenina-FITC (verde mais intenso). **(b)** A mesma célula anterior, mostrando a imagem sobreposta à dos cromossomos contracorados com DAPI. Barra corresponde a 10 μm . Fotos: originais.

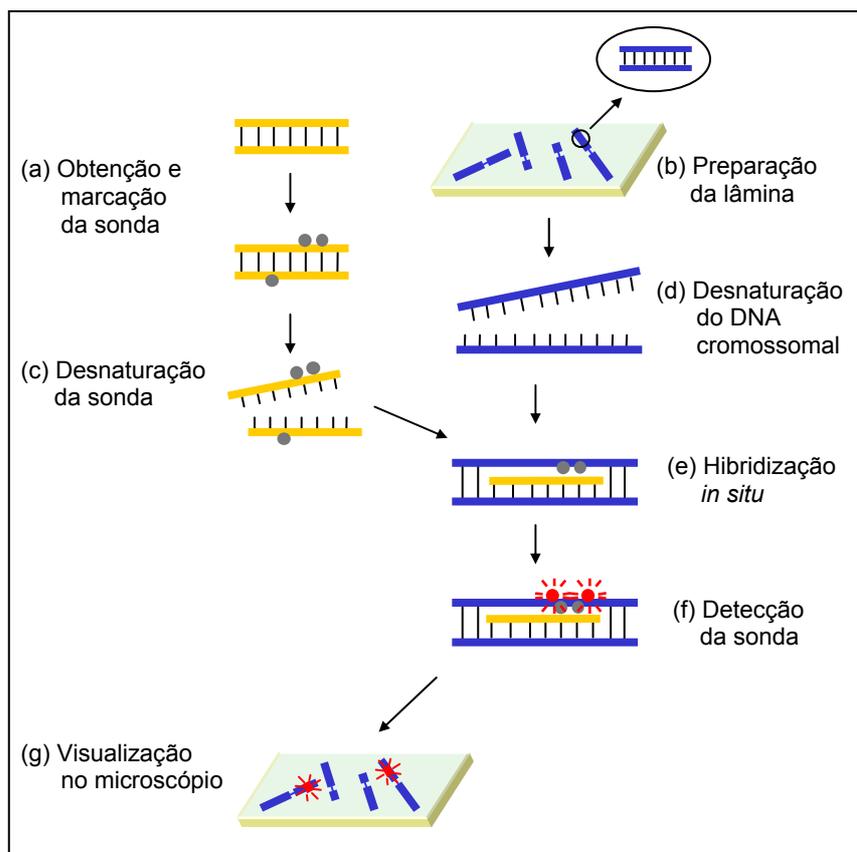


Fig. 1

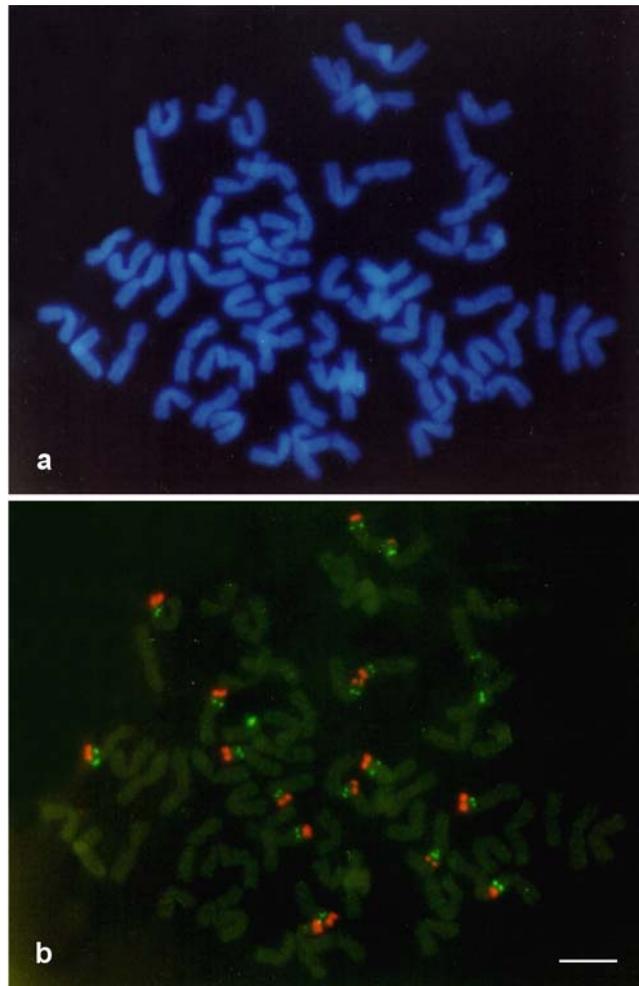


Fig. 2

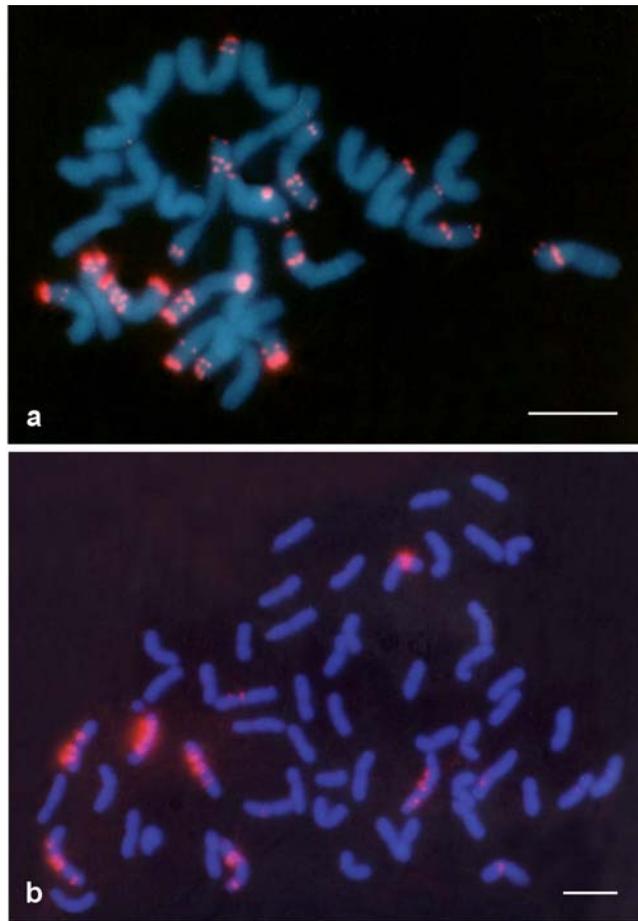


Fig. 3

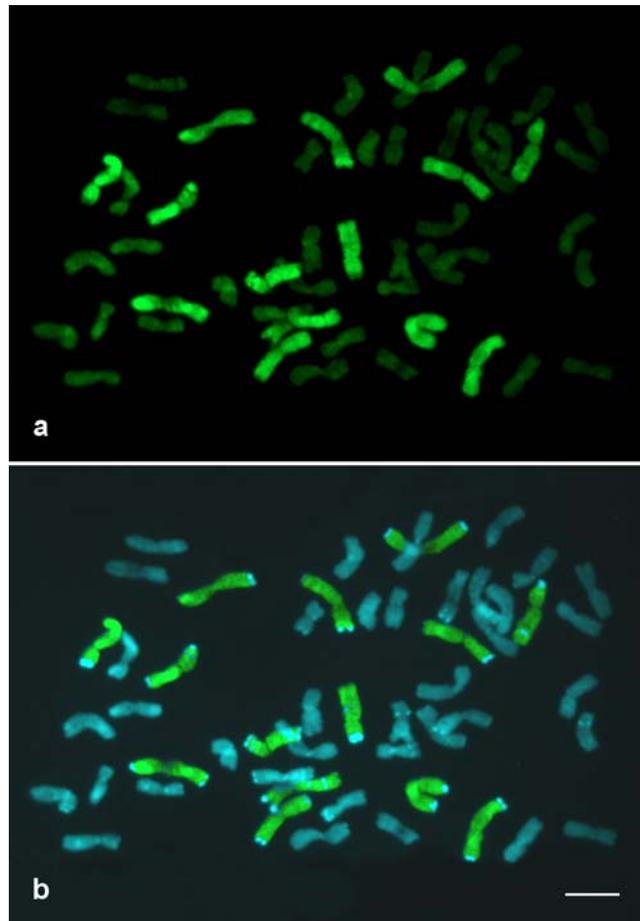


Fig. 4

Manuscrito 1

Instabilidade mitótica em acessos oriundos do cruzamento entre
Triticum aestivum × *Thinopyrum ponticum*

Manuscrito a ser enviado para a revista Euphytica

**Instabilidade mitótica em acessos oriundos do cruzamento entre
Triticum aestivum × *Thinopyrum ponticum***

Ana Christina Brasileiro-Vidal, Sandra Patussi Brammer, María Jesús Puertas, Ana Christina Albuquerque Zanatta, Ariano Moraes Prestes, Maria Irene B. de Moraes-Fernandes & Marcelo Guerra

Marcelo Guerra (✉), Ana Christina Brasileiro-Vidal

Depto. de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

Fax: 55 81 32718348

E-mail: mguerra@ufpe.br

Sandra Patussi Brammer, Ana Christina Albuquerque Zanatta, Ariano Moraes Prestes, Maria Irene B. de Moraes-Fernandes

Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rodovia BR 285, Km174, 99001-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

María Jesús Puertas

Depto. de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense, 28040, Madrid, España.

Palavras-chave: número cromossômico, conteúdo de DNA, instabilidade mitótica, *Thinopyrum*, trigo

Resumo

A estabilidade mitótica de acessos derivados do cruzamento *Triticum aestivum* ($2n = 42$) \times *Thinopyrum ponticum* ($2n = 70$) foi avaliada através da análise do número cromossômico de três acessos na sétima geração do retrocruzamento dois (RC_2F_7), três duplo-haplóides em RC_2F_5 , da linhagem de trigo genitora PF 839197 e das cultivares de trigo ‘CEP 19’, utilizada nos retrocruzamentos, e ‘Chinese Spring’, usada como controle. Nos derivados híbridos, os números cromossômicos variaram de $2n = 36$ a $2n = 60$, verificando-se mosaicismo em 100% dos indivíduos. O número somático esperado ($2n = 42$) foi observado em apenas 5% a 30% das células, constatando-se uma maior frequência de números superiores a $2n = 42$, exceto para o acesso PF 984902. Apesar de PF 839197 e ‘Chinese Spring’ terem se mostrado estáveis, ‘CEP 19’ apresentou alterações numéricas em 20% das células. Essas variações foram confirmadas pela medição do conteúdo de DNA nuclear, feita por citometria de imagem em prófases intactas de quatro acessos híbridos e da cultivar ‘CEP 19’, observando-se um coeficiente de correlação significativo entre as duas variáveis ($r = 0,93$; $P \leq 0,01$). Para verificar possíveis falhas no mecanismo de separação de cromátides, células em divisão mitótica foram analisadas, revelando a presença de cromossomos de separação precoce, cromátides retardatárias, fragmentos cromossômicos e micronúcleos em cinco acessos e em ‘CEP 19’. A

imunocoloração com anticorpo contra a histona H3 fosforilada na serina 10 mostrou que nos cromossomos de separação precoce, fragmentos cromossômicos e cromátides retardatárias não houve fosforilação e confirmou a presença de cromossomos telocêntricos. As possíveis causas que levaram à instabilidade mitótica são discutidas no texto.

Key words: chromosome number, DNA content, mitotic instability, *Thinopyrum*, wheat

Abstract

To evaluate the mitotic stability of the *Triticum aestivum* ($2n = 42$) \times *Thinopyrum ponticum* ($2n = 70$) derivatives, the chromosome numbers of six hybrid accessions, three BC₂F₇ and three BC₂F₅ doubled haploids, were determined. The wheat progenitor line, PF 839197, the wheat recurrent parent ‘CEP 19’ and the control wheat cultivar, ‘Chinese Spring’, were also investigated. In the hybrid derivatives, the chromosome number ranged from $2n = 36$ to $2n = 60$, and mosaicism was observed in all individuals analyzed. The wheat somatic chromosome number was found in only 5% to 30% of the hybrid derivative cells, with a predominance of chromosome numbers higher than $2n = 42$, except for the accession PF 984902. While PF 839197 and ‘Chinese Spring’ were stable, ‘CEP 19’ showed chromosome number variation in 20% of the cells surveyed. The variation in chromosome number was confirmed by determination of nuclear DNA content in intact prophase of four accessions and of cultivar ‘CEP 19’ by image cytometry. A significant correlation between the mean values of the two variables was observed ($r = 0.93$, $P \leq 0.01$). In order to verify possible failure in the chromatid separation mechanism, cells in mitosis were analyzed. Delayed separating chromatids, precociously separated chromosomes, chromosome fragments and micronuclei were found in five accessions and in ‘CEP 19’. Immunostaining with an antibody recognizing histone

H3 phosphorylated at serine 10 showed that in precociously separated chromosomes, chromosome fragments and delayed separating chromatids there was no H3 phosphorylation, and confirmed the presence of telocentric chromosomes. The possible causes of the observed mitotic instability are discussed in this paper.

Introdução

O trigo comum (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, AABBDD) é uma espécie alohexaplóide autógama, cultivada mundialmente, nas mais variadas condições agroecológicas. Em função da manutenção em cultivo há mais de 10.000 anos e de sua reprodução por autofecundação, é compreensível que a base genética do trigo seja relativamente estreita, considerando que em muitas das regiões de cultivo ocorrem estresses bióticos e abióticos mais intensos do que os observados no seu centro de origem. No melhoramento genético, espécies silvestres de *Triticum* e de outros gêneros afins, como *Aegilops*, *Secale* e *Thinopyrum*, têm servido como fonte suplementar para a introgressão de genes, aumentando a diversidade genética disponível para a produção de novas cultivares (ver Jauhar 1993; Friebe et al. 1996).

A transferência interespecífica de genes para *T. aestivum*, a partir de espécies afins, consiste basicamente na obtenção da combinação híbrida, seguida de retrocruzamentos com a espécie cultivada e de sucessivas gerações de autofecundações. Nas primeiras gerações filiais de híbridos entre *T. aestivum* e espécies afins, há em geral uma variação dos números cromossômicos (Sharma & Gill, 1983), os quais são progressivamente estabilizados em $2n = 42$, devido à eliminação cromossômica nas meioses das sucessivas gerações de retrocruzamentos e autofecundações (Cai et al. 1998).

Além da perda de cromossomos nos ciclos meióticos, eliminações cromossômicas durante as divisões mitóticas também podem ocorrer, como acontece em alguns híbridos interespecíficos de *Hordeum* (Finch & Bennett 1983). Trabalhando com híbridos F_1 entre *T. aestivum* e seis espécies de *Agropyron*, Sharma

& Gill (1983) observaram, na maioria dos casos, um número cromossômico estável, com exceção do híbrido *A. trachycaulum* × *T. aestivum*, cujo número cromossômico variou de $2n = 26$ a $2n = 42$. A perda de cromossomos durante o ciclo mitótico é um acontecimento incomum na natureza, embora possa ser freqüente em híbridos sintéticos ou linhas endogâmicas, levando ao surgimento de tecidos com diferentes números cromossômicos (Koba et al. 1991).

Em trigo e derivados híbridos, análises do conteúdo de DNA podem ser utilizadas para a detecção de pequenas diferenças no tamanho do genoma (Pfosser et al. 1995). A técnica de citometria de fluxo tem sido usada tanto na distinção de grupos de cromossomos com valores similares (Vrána et al. 2000) como na estimativa do conteúdo de DNA de cromossomos ou de braços cromossômicos individuais (Lee et al. 1997; Gill et al. 1999).

Diversas espécies de *Thinopyrum* têm sido utilizadas para a introgressão de genes em trigo, destacando-se *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey [syn: *Agropyron elongatum* auct. non (Host) P. Beauv., *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub., *Lophopyrum ponticum* (Podp.) Á. Löve] com $2n = 10x = 70$ e genomas JJJJ^SJ^S (Chen et al. 1998). O anfidiplóide *T. aestivum* × *Th. ponticum* apresenta, em geral, $2n = 56$ e, no decorrer dos retrocruzamentos com o trigo e autofecundações, o número cromossômico tende a se estabilizar em $2n = 42$, como resultado de uma perda preferencial dos cromossomos de *Th. ponticum* (Cai et al. 1998).

Thinopyrum ponticum tem sido usada no programa de melhoramento de trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo) desde 1988. Com o intuito de avaliar o comportamento cromossômico de derivados do híbrido *T.*

aestivum × *Th. ponticum*, foram analisados mitoticamente alguns acessos em gerações RC₂F₅ (quinta geração do retrocruzamento dois) e RC₂F₇. Para isso, foram efetuadas contagens cromossômicas, análises do ciclo mitótico, através das técnicas de coloração convencional e de imunocoloração, bem como medições do conteúdo de DNA, a fim de identificar possíveis alterações numéricas.

Materiais e métodos

Material vegetal

Foram selecionados seis acessos oriundos do cruzamento entre *T. aestivum* (linhagem PF 839197) e *Th. ponticum* (acesso Ag. el. 84001): três em geração RC₂F₇ (PF 984014, PF 984017, PF 984019, no presente artigo denominados F7-14, F7-17 e F7-19, respectivamente) e três duplo-haplóides em RC₂F₅ (PF 984901A, PF 984902, PF 984903A, denominados DH-1, DH-2 e DH-3, respectivamente), obtidos via eliminação somática, através de cruzamento com milho³. Além disso, foram analisadas a linhagem genitora de trigo PF 839197, a cultivar ‘CEP 19’ (Pel 72380/‘Arthur 71’//PF 75336/3/‘Alondra SIB’/PF 72707//‘PAT 19’), usada nos retrocruzamentos, e a cultivar ‘Chinese Spring’, utilizada como controle.

³ O procedimento utilizado para a obtenção dos referidos acessos está descrito na página 3.

Análise cromossômica

Raízes e ápices caulinares de plântulas de sementes germinadas foram pré-tratados em 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 24 h, fixados em etanol: ácido acético (3:1, v:v) por três dias à temperatura ambiente e estocados a -20°C . O material foi lavado em água destilada, hidrolisado em HCl 5 N durante 20 min, macerado em ácido acético 45% e congelado em nitrogênio líquido. Após a retirada da lamínula e secagem ao ar, as lâminas foram coradas com Giemsa 2% (Guerra 1983).

Contagens cromossômicas foram efetuadas para diversas plântulas, totalizando 100 células de cada um dos seis acessos selecionados e 50 células dos genitores, PF 839197 e ‘CEP 19’, e da cultivar ‘Chinese Spring’ (Tabela 1). Para minimizar os possíveis erros devidos à sobreposição de cromossomos de duas células ou perda de cromossomos, apenas as células isoladas ou com citoplasma intacto foram consideradas para a contagem.

Para observação de anáfases e telófases mitóticas, foram utilizadas pontas de raízes e ápices caulinares não pré-tratados, de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Foram analisadas no mínimo 50 células de cada acesso estudado, as quais foram coradas com hematoxilina 1%, para visualizar melhor o citoplasma (Guerra 1999).

Imunocoloração

Esse procedimento seguiu metodologia descrita por Manzano et al. (2000). Pontas de raízes, não pré-tratadas, dos acessos F7-14 e F7-19 e da cultivar

‘CEP 19’ foram fixadas por 45 min em paraformaldeído 4% (p/v), contendo tampão fosfato salino (PBS), lavadas por 40 min em PBS e digeridas a 37°C por 1 h em uma mistura de celulase ‘Onozuka R-10’ 2,5% (p/v) e ‘Pectoliase Y-23’ 2,5% (p/v) dissolvidas em PBS. Em seguida, as raízes foram lavadas por 15 min em PBS e maceradas sobre a lâmina em PBS. As laminulas foram removidas em nitrogênio líquido e as lâminas foram mergulhadas em PBS.

Para evitar marcação não específica do anticorpo, as lâminas foram incubadas por 10 min em PBS contendo BSA 3% (p/v) e Triton X100 0,1% à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em câmara úmida com anticorpo primário de coelho que reconhecia especificamente a histona H3 fosforilada na Ser10 (Upstate Biotechnology, USA) diluído 1:300 em PBS contendo BSA 3%. Após aproximadamente 16 h de incubação a 4°C e lavagem por 15min em PBS, as lâminas foram incubadas em IgG anticoelho conjugado com FITC (fluoresceína isotiocianato, Jackson Immuno Research) diluído 1:100 em PBS, 3% BSA por 3 h à temperatura ambiente. Após as lavagens em PBS, as preparações foram contra-coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 2 µg/ml e montadas em Vectashield H-1000.

Documentação das células

Imagens digitais das células analisadas foram capturadas em fotomicroscópio Leica DMLB equipado com câmera Cohu CCD e um microcomputador, utilizando-se o *software* Leica QWin. As melhores células foram fotografadas com filme Imagelink HQ-Kodak ASA 25, copiadas em papel

Kodabromide F3 da Kodak e escaneadas a 300 dpi. As imagens foram otimizadas para melhor contraste e brilho, utilizando o Adobe Photoshop 6.0.

Medição do conteúdo de DNA

O conteúdo de DNA foi estimado em prófases iniciais (4C) dos acessos F7-14, F7-19, DH-1, DH-2, 'CEP 19' e do controle 'Chinese Spring'. O procedimento utilizado seguiu metodologia descrita por Greilhuber & Ebert (1994), com pequenas modificações. Três raízes de cada acesso foram fixadas no mesmo frasco em formaldeído tamponado 4% (1 h e 30 min), lavadas em metanol: ácido acético (3:1) e estocadas em etanol 96% a -20°C . Em seguida, as raízes foram hidrolisadas em HCl 5 N a 20°C por 60 min, coradas com reagente de Schiff por 2 h à temperatura ambiente, lavadas por 30 min em água sulfurada e os meristemas foram macerados em ácido acético 45%. Raízes da cultivar 'Chinese Spring' ($4\text{C} = 69,27 \text{ pg}$) sugerida por Bennett & Smith (1976) como padrão, foram fixadas e coradas conjuntamente com as raízes dos acessos investigados, a fim de converter as unidades arbitrárias de densidade óptica da reação DNA-Feulgen para picogramas. As medições foram realizadas através de um sistema de análise de imagem digital, utilizando o *software* Leica QPloidy.

Neste experimento, o conteúdo de DNA de 30 prófases iniciais (4C) por lâmina foi medido em unidades arbitrárias de densidade óptica. Três lâminas foram analisadas, perfazendo um total de 90 núcleos por acesso. Os dados foram submetidos à análise da variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Foi determinado, também, o coeficiente de correlação (r ; $P \leq 0,01$)

entre as estimativas das médias dos números de cromossomos e dos respectivos conteúdos de DNA (4C/pg) para cada acesso.

Resultados

A contagem cromossômica, nos três acessos RC₂F₇ (F7-14, F7-17, F7-19) e nos três duplo-haplóides (DH-1, DH-2, DH-3), mostrou que os números cromossômicos variaram inesperadamente tanto entre acessos quanto dentro de cada acesso. Igualmente, dentro de cada indivíduo, foram verificadas as mesmas alterações, tanto em raízes quanto em ápices caulinares, com uma variação máxima de $2n = 37$ a $2n = 57$ em um único indivíduo do acesso DH-3 (Tabela 1).

Nos indivíduos em RC₂F₇, o número cromossômico variou de $2n = 39$ a $2n = 60$. Apenas 5% das células de cada um dos três acessos apresentaram $2n = 42$ e apenas uma célula do acesso F7-14 e outra do F7-19 tiveram números menores que $2n = 42$. Nos duplo-haplóides, foi observado $2n = 42$ em 5% das células analisadas do acesso DH-1, em 30% do DH-2 e em 8% do DH-3. Verificou-se, nesses acessos, uma variação numérica de $2n = 36$ a $2n = 57$, com uma maior frequência de números superiores a $2n = 42$, nos acessos DH-1 e DH-3, correspondente a 70% e 80%, respectivamente (Figuras 1a-c; Tabela 1). Das 50 metáfases analisadas para o genitor PF 839197 e para a cultivar 'Chinese Spring', as variações numéricas ocorreram em apenas três e uma célula, respectivamente. Na cultivar 'CEP 19', constatou-se, no entanto, alterações no número de cromossomos em 20% das células analisadas.

Nas células dos indivíduos em RC₂F₇, não tratadas com antimitótico, verificou-se 2,82% de anáfases com cromátides retardatárias e 1,13% de telófases com formação de micronúcleos. Essas alterações foram mais freqüentes nos acessos F7-14 e F7-17 (Figura 1e). Entre os duplo-haplóides, apenas o acesso DH-1 apresentou cromátides retardatárias (1,85%) e micronúcleos (1,85%). O genitor PF 839197 e o controle ('Chinese Spring') não apresentaram alterações visíveis em anáfases e telófases. Por outro lado, a cultivar 'CEP 19' apresentou 5,26% das células com cromátides retardatárias e 1,75% com formação de micronúcleos (Figura 1d).

O padrão de imunomarcção com anticorpo contra H3 fosforilada, nos diferentes estágios da mitose foi similar ao encontrado para cromossomos de *Secale cereale* por Houben et al. (1999) e Manzareno et al. (2000). Não foi observada imunomarcção nos núcleos interfásicos, enquanto em prófases, metáfases e anáfases, a cromatina pericentromérica mostrou um brilho gradativamente mais intenso. Contudo, os cromossomos de separação precoce e as cromátides retardatárias não apresentaram nenhuma imunomarcção (Figuras 2a, b). Além disso, foi possível identificar a presença de fragmentos acêntricos e de cromossomos telocêntricos em algumas das células analisadas, indicando a ocorrência de alterações estruturais (Figuras 2c, d).

A estimativa do conteúdo de DNA de seis dos nove acessos selecionados (F7-14, F7-19, DH-1, DH-2, 'CEP 19' e 'Chinese Spring') confirmou a variação numérica, observando-se um coeficiente de correlação significativo ($P \leq 0,01$) entre as duas variáveis de $r = 0,93$. O conteúdo médio de DNA (4C) variou de 68,50 pg em DH-2 a 84,59 pg em F7-19 (Tabela 1). De modo semelhante ao verificado para a

contagem cromossômica, os acessos F7-14, F7-19 e DH-1 apresentaram médias 4C superiores ao valor de 69,27 pg da cultivar ‘Chinese Spring’ usada como referência (Tabela 1). Por outro lado, o conteúdo médio de DNA do duplo-haplóide DH-2 (68,50 pg) foi estatisticamente semelhante ao obtido para o controle ‘Chinese Spring’ (Tabela 1), enquanto que, para a cultivar ‘CEP 19’, houve um aumento médio de 6,24 pg em relação ao valor de referência 4C (‘Chinese Spring’).

Discussão

Em cruzamentos interespecíficos seguidos de gerações de retrocruzamento e de autofecundação, os acessos tendem a se tornar citologicamente estáveis e a apresentar o mesmo número cromossômico do ancestral utilizado nos retrocruzamentos (Cai et al. 1998). No entanto, nos descendentes do anfidiplóide *T. aestivum* × *Th. ponticum* analisados no presente trabalho, verificou-se alta variação inter e intraindividual do número somático, tanto nos indivíduos em RC₂F₇ quanto nos duplo-haplóides (RC₂F₅). Essa variabilidade somática foi constatada em um grande número de metáfases e confirmada pela estimativa do conteúdo de DNA das prófases de alguns desses acessos, utilizando citometria de imagem. A identificação de alterações no conteúdo de DNA relacionadas à perda ou ganho de cromossomos já havia sido descrita anteriormente em trigo por citometria de fluxo (Pfosser et al. 1995; Lee et al. 1997; Gill et al. 1999).

Como a distribuição da variação do número cromossômico foi distinta entre indivíduos dos diferentes acessos, é possível que esta diferença tenha ocorrido

devido à instabilidade meiótica dos híbridos (F_1) e de seus derivados (RC_1F_1 a RC_2F_7), originando gametas com números cromossômicos variáveis e quase sempre superiores a $n = 21$. O amplo predomínio de células hiperaneuplóides encontrado em cinco dos seis acessos estudados no presente trabalho (F7-14, F7-17, F7-19, DH-1, DH-3) pode estar relacionado à não disjunção dos bivalentes ou inclusão de bivalentes dentro de um mesmo gameta. Uma tendência similar também foi observada em progênies RC_{1-3} de cruzamentos envolvendo *T. aestivum* e diferentes espécies de *Agropyron* (Sharma & Gill 1983; Chen et al. 1992; Jauhar 1995).

A eliminação cromossômica somática observada nos derivados híbridos de *T. aestivum* × *Th. ponticum*, embora não seja um mecanismo comum, pode ocorrer com relativa frequência em híbridos interespecíficos, provavelmente devido a uma alteração do tempo de separação das cromátides ou por falhas na atividade do fuso (Sybenga 1992; Laurie & Bennett, 1989). A mudança no *timing* de migração das cromátides pode resultar na eliminação cromossômica através de micronúcleo(s) (Bennett et al. 1976), ou na ausência de cromossomo(s) em uma célula filha e presença deste(s) na outra (Sybenga 1992). As alterações cromossômicas em híbridos interespecíficos, também parecem ser influenciadas por modificações da expressão dos genes, decorrentes de interações entre os genomas parentais e/ou de mudanças do nível de ploidia (Comai 2000). Em cruzamentos de diferentes espécies de *Hordeum*, por exemplo, o silenciamento gênico, gerado pela metilação de genes localizados na região centromérica ou relacionados a sua atividade, foi apontado como a causa original da eliminação somática (Finch & Bennett 1983).

Além da eliminação de cromossomos e formação de micronúcleos, foi observada a presença de telocêntricos e de outros fragmentos cromossômicos.

Alterações cromossômicas desse tipo, em plantas cultivadas *in vitro*, são também frequentemente associadas a mudanças na metilação do DNA, resultando em uma replicação tardia de regiões heterocromáticas, como as regiões pericentroméricas (Lee & Phillips 1988, Fluminhan et al. 1996). Além disso, a presença de retrotransposons, em plantas *in vivo* ou *in vitro*, é capaz de provocar recombinações desiguais ou ectópicas entre elementos similares dispersos nos genomas, gerando alterações estruturais, como deleções, duplicações, inversões e translocações (Kumar & Bennetzen, 1999).

O fato de que, nas cromátides retardatárias, as histonas H3 não foram fosforiladas indica que a instabilidade mitótica não seja um problema apenas mecânico, mas acompanhado por modificações moleculares no complexo centrômero-cinetócoro. Houben et al. (1999) sugeriram que hiperfosforilação da H3 é essencial para gerar uma cromatina centromérica com a estabilidade mecânica necessária para competir com as forças geradas nos cinetócoros durante o movimento cromossômico. A não-fosforilação em cromátides retardatárias também foi observada em linhas de adição de trigo por Manzareno et al. (2000).

A instabilidade mitótica observada no presente trabalho tem sido encontrada em outros cruzamentos intergenéricos com trigo. Em plantas F₁ de cruzamentos entre *T. aestivum* e *H. vulgare*, Koba et al. (1991) constataram uma taxa de 40% de aneuplóides, dos quais cerca de 50% mostraram mosaicismos nos tecidos analisados. Esses autores verificaram que a frequência de eliminação cromossômica foi influenciada pelo genótipo, encontrando diferenças evidentes entre as cultivares estudadas. Igualmente, algumas cultivares brasileiras de trigo também têm se mostrado instáveis, tanto meiótica quanto mitoticamente (Guerra & Moraes-

Fernandes 1977; Del Duca et al. 1980; Bodanese-Zanettini et al. 1993). A cultivar ‘CEP 19’, utilizada nos retrocruzamentos do presente experimento, também apresentou variações cromossômicas numéricas, embora numa frequência mais baixa que a observada nos derivados híbridos (RC₂F₅ e RC₂F₇), onde 100% dos indivíduos apresentaram mosaicismos. Portanto, é possível que os fatores determinantes dessas alterações já estivessem presentes nos acessos parentais, tendo sua expressão acentuada pela condição híbrida.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- Bennett, M.D., R.A. Finch & I.R. Barclay, 1976. The time rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma* 54: 175–200.
- Bennett, M.D. & J.S. Smith, 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil Trans Roy Soc Lond Series B* 274: 227–274.
- Bodanese-Zanettini, M.H., C.C. Zanella, A.M. Silva Zary, M.I.B. Moraes-Fernandes & S.M. Callegari-Jacques, 1993. Aneuploidy and chromosome mosaics in

- hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. Thell.) cultivars. *Cereal Res Commun* 21: 269–275.
- Cai, X., T.D. Murray & S.S. Jones, 1998. Identification and manipulation of *Thinopyrum ponticum* chromatin conferring resistance to *Cephalosporium* stripe disease and a perennial habit in wheat. p. 29–31. In: A.E. Slinkard (Ed.), *Proc 9th Int Wheat Genet Symp vol 2*, University of Saskatchewan, Saskatoon.
- Chen, Q., J. Jahier & Y. Cauderon, 1992. Production and cytogenetic analysis of BC₁, BC₂, and BC₃ progenies of an intergeneric hybrid between *Triticum aestivum* (L.) Thell. and tetraploid *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn. *Theor Appl Genet* 84: 698–703.
- Chen, Q., R.L. Conner, A. Laroche & J.B. Thomas, 1998. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic in situ hybridization. *Genome* 41: 580–586.
- Comai, L., 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Mol Biol* 43: 387–399.
- Del Duca, L.J.A. & M.I.B. Moraes-Fernandes, 1980. Meiotic instability in some Brazilian common wheat cultivars. *Cereal Res Commun* 8: 619–625.
- Finch, R.A. & M.D. Bennett, 1983. The mechanism of somatic chromosome elimination in *Hordeum*. p. 147–154. In: P.E. Brandham & M.D. Bennett (Eds.), *Proc 2th Kew Chromosome Conference*. George Allen & Unwin, London.
- Fluminhan Jr, A., M.L.R. de Aguiar-Perecin & J.A. dos Santos, 1996. Evidence for heterochromatin involvement in chromosome breakage in maize callus culture. *Ann Bot* 78: 73–81.

- Friebe, B., J. Jiang, W.J. Raupp, R.A. McIntosh & B.S. Gill, 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica* 91: 59–87.
- Gill, K.S., K. Arumuganathan & J.-H. Lee, 1999. Isolating individual wheat (*Triticum aestivum*) chromosome arms by flow cytometric analysis of ditelosomic lines. *Theor Appl Genet* 98: 1248–1252.
- Greilhuber, J. & I. Ebert, 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome* 37: 646–655.
- Guerra, M.S., 1983. O uso do Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ci e Cult* 35: 190–193.
- Guerra, M.S., 1999. Haematoxylin: a simple multiple-use dye for chromosome analysis. *Genet Mol Biol* 22: 77–80.
- Guerra, M.S. & M.I.B. Moraes-Fernandes, 1977. Somatic instability in the Brazilian semi-dwarf wheat IAS 54. *Can J Genet Cytol* 19: 225–230.
- Houben, A., T. Wako, R. Furushima-Shimogawara, G. Presting, G. Künzel, I. Schubert & K. Fukui, 1999. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J* 18: 675–679.
- Jauhar, P.P., 1993. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: A.B. Damania (Ed.), *Biodiversity and wheat improvement*, pp. 103–119. John Wiley & Sons, Chichester New York Brisbane Toronto Singapore.
- Jauhar, P.P., 1995. Meiosis and fertility of F₁ hybrids between hexaploid bread wheat and decaploid tall wheatgrass (*Thinopyrum ponticum*). *Theor Appl Genet* 90: 865–871.

- Koba, T., T. Handa & T. Shimada, 1991. Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. *Theor Appl Genet* 81: 285–292.
- Kumar, A. & J.L. Bennetzen, 1999. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* 33: 479–532.
- Laurie, D.A. & M.D. Bennett, 1989. The timing of chromosome elimination wheat × maize crosses. *Genome* 32: 953–961.
- Lee, M. & R.L. Phillips, 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 413–437.
- Lee, J.-H., Y. Yen, K. Arumuganathan & P.S. Baenzinger, 1997. DNA content of wheat monosomics at intherphase estimated by flow cytometry. *Theor Appl Genet* 95: 1300–1304.
- Manzareno, S., P. Arana, M.J. Puertas, A. Houben, 2000. The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* 109: 308–317.
- Moraes-Fernandes, M.I.B. & M.H. Bodanese-Zanettini, 1987. Research on chromosome instability. *Ann Wheat Newsl* 33: 41–42.
- Pfossier, M., A. Amon, J. Lafferty, E. Heberle-Bors & T. Lelley, 1995. Gain or loss of single chromosomes in wheat-rye addition lines and in 6x triticales detected by flow cytometry. *Plant Breed* 114: 555–557.
- Sharma, H.C. & B.S. Gill, 1983. New hybrids between *Agropyron* and wheat. 2. Production, morphology and cytogenetic analysis of F₁ hybrids and backcross derivatives. *Theor Appl Genet* 66: 111–121.

Sybenga, J., 1992. Cytogenetics in Plant Breeding. Springer-Verlag, Berlin.

Vrána, J., M. Kubaláková, H. Šimková, J. Číhalíková, M.A. Lysák & J. Doležel,
2000. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum*
L.). Genetics 156: 2033–2041.

Legendas

Figura 1. a-c. Células metafásicas mostrando alterações numéricas em diferentes acessos oriundos do cruzamento *T. aestivum* × *Th. ponticum*. *a, c.* Metáfases com $2n = 53$ (*a*) e $2n = 60$ (*c*) de dois acessos em RC_2F_7 (F7-14 e F7-19, respectivamente). *b.* Metáfase de um duplo-haplóide RC_2F_5 (DH-2) com $2n = 39$. *d, e.* Telófases mitóticas mostrando a presença de cromátides retardatárias em ‘CEP 19’ e em F7-17, respectivamente. Barra em (*a*) representa 10 μ m.

Figura 2. Imunolocalização da histona H3 fosforilada mitótica em células não pré-tratadas de trigo. *a, b.* Metáfase da cultivar ‘CEP 19’, corada com DAPI (*a*) e com FITC ligado ao anticorpo anti-H3 fosforilada (*b*), mostrando a não fosforilação em cromátides com separação precoce. *c.* Cromossomos do acesso F7-19, evidenciando a presença de um telocêntrico. *d.* Cromossomos de ‘CEP 19’, mostrando um fragmento acêntrico não fosforilado. Barra em (*b*) representa 10 μ m.

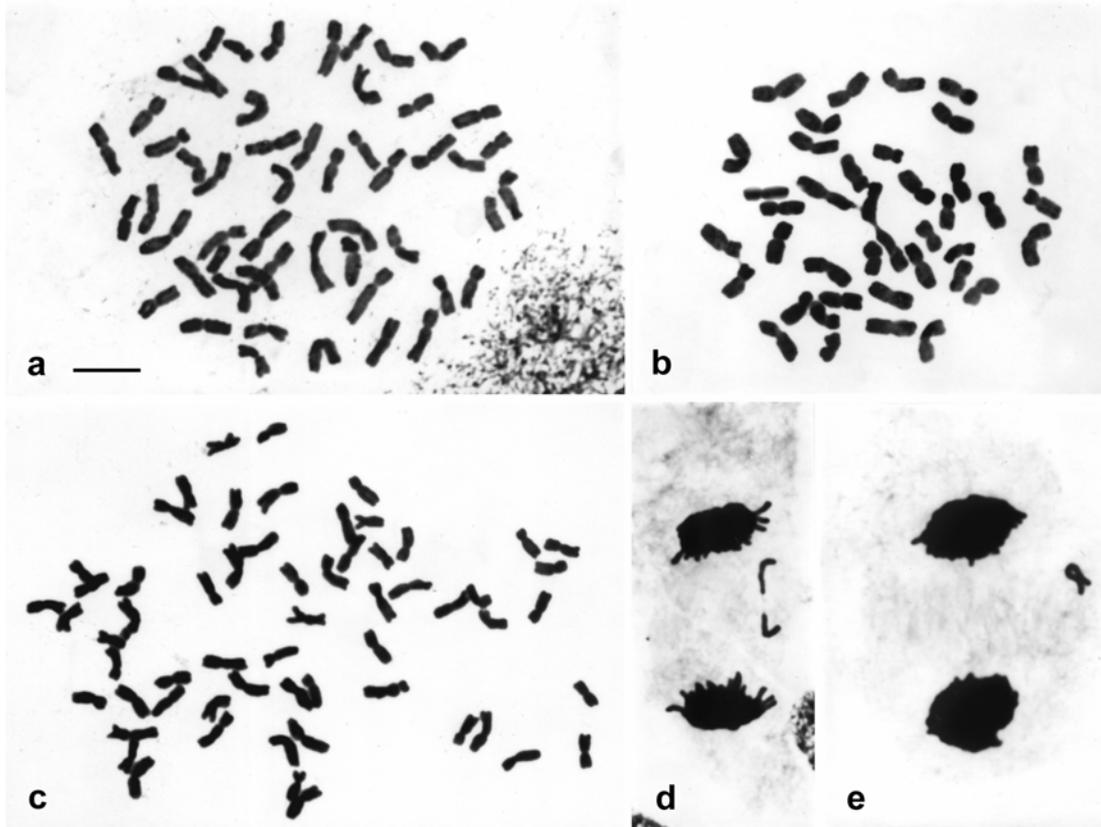


Figura 1

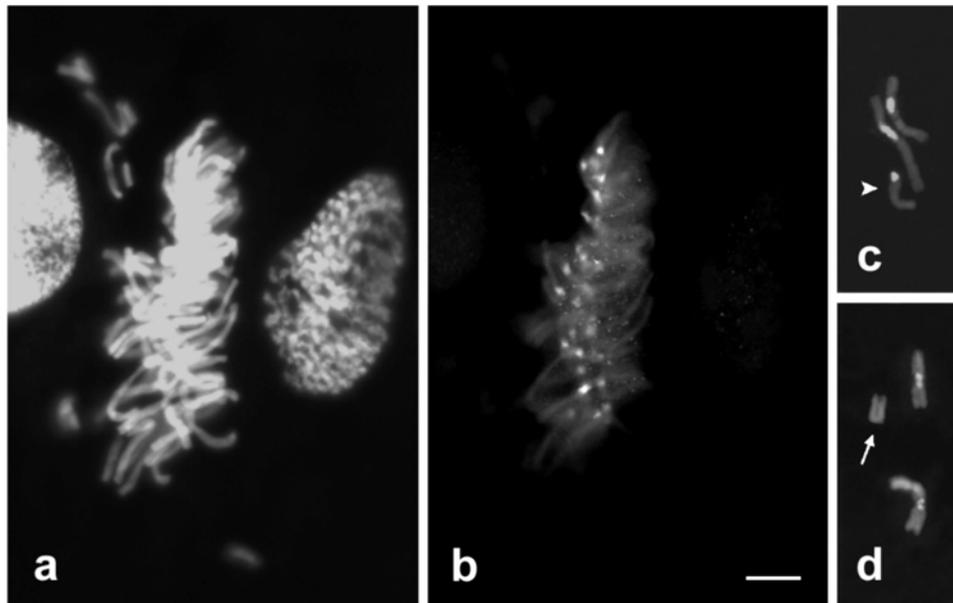


Figura 2

Tabela 1. Variação do número cromossômico e do conteúdo de DNA em acessos derivados do cruzamento *T. aestivum* × *Th. ponticum* e nas cultivares de trigo analisadas.

Acesso (número de indivíduos analisados)	Número cromossômico (2n)			Conteúdo de DNA – 4C (pg) ¹	
	Células contadas (células aneuplóides)	Mínimo – máximo	Média	Mínimo – máximo	Média ²
F7-14 (30)	100 (95)	41 – 56	50,17	61,90 – 95,94	82,46 a
F7-17 (22)	100 (95)	42 – 56	51,15	–	–
F7-19 (22)	100 (95)	39 – 60	51,37	61,11 – 97,02	84,59 a
DH-1 (26)	100 (95)	36 – 56	46,97	59,78 – 95,03	82,74 a
DH-2 (27)	100 (70)	36 – 47	40,26	56,52 – 81,15	68,50 b
DH-3 (22)	100 (92)	36 – 57	47,54	–	–
PF 839197 (8)	50 (3)	39 – 44	42,0	–	–
‘CEP 19’ (15)	50 (10)	41 – 44	42,14	69,23 – 80,59	75,51 a b
‘Chinese Spring’ (15)	50 (1)	42 – 44	42,04	64,65 – 73,76	69,26 b

¹O conteúdo de DNA nuclear (4C = 69,27 pg) descrito por Bennett & Smith (1976) para *T. aestivum* cv. ‘Chinese Spring’ foi usado como referência.

²Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (CV = 7%).

Manuscrito 2

Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum*
(Triticeae – Poaceae) using *in situ* hybridization
with different DNA sequences

Manuscrito enviado para a revista
Genetics and Molecular Biology

Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae – Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences

Ana Christina Brasileiro-Vidal¹, Angeles Cuadrado², Sandra P. Brammer³, Ana Christina A. Zanatta³, Ariano M. Prestes³, Maria Irene B. Moraes-Fernandes⁴, and Marcelo Guerra¹

¹*Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

²*Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain.*

³*Embrapa Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.*

⁴*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.*

*Running title: Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum**

Key words: Thinopyrum, silver staining, 45S and 5S rDNA, pSc119.2, pAs1

Send correspondence to Marcelo Guerra, Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: mguerra@ufpe.br

Abstract

Thinopyrum ponticum ($2n = 10x = 70$, JJJJ^sJ^s) belongs to the Triticeae tribe, and is currently used as a source of pathogen resistance genes in wheat breeding. In order to characterize its chromosomes, the number and position of 45S and 5S rDNA sites, as well as the distribution of the repetitive DNA sequences pAs1 and pSc119.2, were identified by fluorescent *in situ* hybridization. The number of nucleoli and NORs was also recorded after silver nitrate staining. Seventeen 45S and twenty 5S rDNA sites were observed in the short arms of 17 chromosomes, the 45S rDNA always being located terminally. In three other chromosomes, only the 5S rDNA site was observed. Silver staining revealed a high number of Ag-NORs (14 to 17) on metaphase chromosomes, whereas on interphase nuclei there was a large variation in number of nucleoli (one to 15), most of them (82.8%) ranging between four and nine. The pAs1 probe hybridized to the terminal region of both arms of all 70 chromosomes. In addition, a disperse labeling was observed throughout the chromosomes, except in centromeric and most pericentromeric regions. When the pSc119.2 sequence was used as a probe, terminal labeling was observed on the short arms of 17 chromosomes and on the long arms of five others. The relative position of 45S and 5S rDNA sites, together with the hybridization pattern of pAs1 and pSc119.2 probes, should allow whole chromosomes or chromosome segments of *Th. ponticum* to be identified in inbred lines of wheat \times *Th. ponticum*.

Introduction

Thinopyrum ponticum (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey, previously named *Agropyron elongatum* auct. non (Host) P. Beauv., *Elytrigia pontica* (Podp.) Holub. or *Lophopyrum ponticum* (Podp.) Á. Löve, is an important source of genes for wheat, especially for leaf and stem rust resistance (McIntosh *et al.*, 1998). Because of its decaploid nature ($2n = 10x = 70$) and chromosome pairing complexity, various genome formulas have been reported for this species (Muramatsu, 1990; Wang *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1996). More recently, Chen *et al.* (1998) suggested, by using genome *in situ* hybridization, that *Th. ponticum* consists of five closely related genomes represented by the formula JJJJ^sJ^s, and that J, J^s, E and St genomes from *Thinopyrum* species are closely related.

Due to the importance of *Th. ponticum* genes in wheat breeding, cytological markers associated with chromosomes or chromosome segments have been used in of gene introgression programs. The use of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) has made it possible to locate several specific DNA sequences throughout the chromosomes of various species of Triticeae, allowing alien chromatin to be identified in interspecific hybrids. Probes corresponding to multigenes, such as 45S and 5S rDNA, and highly repetitive DNA sequences, are the most commonly used markers of specific chromosomes or genome regions. For example, in *Triticum aestivum* L., Mukai *et al.* (1990; 1991) labeled five chromosome pairs with 45S rDNA sites (1AS, 1BS, 6BS, 5DS, 7DL) and six pairs with 5S rDNA sites (1AS, 1BS, 1DS, 5AS, 5BS e 5DS). The pAs1 probe, originally obtained from *Aegilops tauschii* Coss (D genome), allowed the D genome chromosomes (Rayburn and Gill, 1986) to be identified, along with small sites on chromosomes 1A, 4A, 1B, 3B, 6B and 7B in wheat (Mukai *et al.*, 1993). Similarly, the pSc119.2 probe from *Secale cereale* L. (R genome) distinguished all B genome chromosomes and 4A, 5A, 2D, 3D, 4D e 5D chromosomes. The simultaneous use of these two probes allowed 17 out of 21

chromosome pairs of *T. aestivum* to be identified (Mukai *et al.*, 1993). More recently, Cuadrado *et al.* (2000) characterized the seven pairs of the B genome and some chromosomes of the A and D genomes of *T. aestivum* using two simple sequence repeats (SSR), (AAC)₅ and (AAG)₅.

Besides the FISH, another procedure used to characterize chromosomes has been silver staining, which was developed to detect nucleoli in interphase cells and nucleolus organizer regions (NORs) in metaphase chromosomes (Fernandez-Gomez *et al.*, 1969; Hizume *et al.*, 1980). The activity of 45S rDNA genes is usually associated with NORs and secondary constrictions, and has been studied at cytological level by recording the number and volume of nucleoli in interphase cells and NORs in metaphase chromosomes by silver staining (Martini and Flavell, 1985; Vieira *et al.*, 1990; Lima-Brito *et al.*, 1998).

In the genus *Thinopyrum*, the localization of rDNA sites has been reported in some species. In *Th. distichum* (Thunb.) Á. Löve ($2n = 4x = 28, JJ$)⁴, two 45S rDNA sites have been located in homeologous groups 5 and 6, and two 5S rDNA sites have been found in homoeologous group 5 and in a non-defined group (Fominaya *et al.*, 1997). In *Th. elongatum* (Host) D. R. Dewey [= *Agropyron elongatum* (Host) P. Beauv., *Elytrigia elongata* (Host) Nevski, *Lophopyrum elongatum* (Host) Á. Löve] ($2n = 2x = 14, E$), the 5S rDNA sites were associated with chromosomes 1E and, possibly, 5E (Dvořák *et al.*, 1989). Similarly to related diploid species, the decaploid *Th. ponticum* has two 45S rDNA loci per monoploid genome, in all a total of 20 sites (Li and Zhang, 2002). Highly repetitive DNA sequences, such as pSc119.2 cloned from rye (Lapitan *et al.*, 1987) and pLeUCD2 of *Th. elongatum* (Zhang and Dvořák, 1990; Kim *et al.*, 1993), have been isolated and used in the characterization of *Thinopyrum* chromosomes and for the identification of introgressed alien chromatin in wheat × *Thinopyrum* hybrids. In the present study, FISH was used to

⁴ Genome designation of *Thinopyrum* species was based on Chen *et al.* (1998) and Chen *et al.* (2001).

identify the number and position of 45S and 5S rDNA sequences, as well as the distribution of the highly repetitive DNA sequences pAs1 and pSc119.2 in the *Th. ponticum* genome. To elucidate whether all 45S rDNA loci were active in this allopolyploid, the number of nucleoli and NORs was also recorded.

Material and Methods

Plant material and chromosome preparation

The clone of *Th. ponticum* used in this study was the PF Ag. el. 84001 accession, maintained under cultivation at Embrapa Trigo, Passo Fundo (Rio Grande do Sul, Brazil).

Root tips were pretreated in ice-cold water for 24 h, fixed in ethanol: acetic acid (3:1, v/v) and then stored at -20°C . The material was digested in an enzyme mixture containing 2% (w/v) cellulase (Onozuka R10) and 20% (v/v) pectinase (Sigma) for 2 to 3 h at 37°C . Afterward, each root tip was squashed in a drop of 45% acetic acid and frozen in liquid nitrogen.

DNA probes and labeling

Four DNA probes were used for FISH analysis: (1) clone pTa71, containing the repeat unit of 18S-5.8S-26S rDNA from *T. aestivum* (Gerlach and Bedbrook, 1979); (2) clone pTa794, which corresponds to the complete 5S gene unit from *T. aestivum* (Gerlach and Dyer, 1980); (3) clone pSc119.2, containing the 120-pb repeat unit of a tandemly arranged DNA family derived from *S. cereale* (McIntyre *et al.*, 1990); and (4) clone pAs1, including a 1 kb repetitive DNA sequence from *Ae. tauschii* (Rayburn and Gill, 1986). Probes were labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche), biotin-11-dUTP (Sigma) or

rhodamine-5-dUTP (Amersham) using nick translation for pTa71 or the polymerase chain reaction for pTa794, pSc119.2 and pAs1.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

FISH was performed essentially as described by Heslop-Harrison *et al.* (1991) at 85% stringency. No immunocytochemistry was necessary to detect the direct rhodamine labeling. Biotin-labeled probes were detected using avidin-rhodamine conjugate (Vector), while digoxigenin-labeled probes were detected using anti-digoxigenin-fluorescein isotiocyanate (FITC) conjugate (Roche). All preparations were counterstained with 2 $\mu\text{g/ml}$ 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in Vectashield H-1000 (Vector). Photographs were taken on Fujicolor Super HG or Kodak Ultra 400 print film, and scanned at 300 dpi. The images were optimized for best contrast and brightness with Adobe Photoshop 6.0.

Silver staining

The silver staining technique employed was that described by Vieira *et al.* (1990). After cold treatment, roots were fixed in 50% ethanol, glacial acetic acid and 37% formaldehyde (18:1:1, v/v/v) for a minimum of 4 h at room temperature and a maximum of three days at 0 to 2°C. Fixed roots were washed several times in distilled water to eliminate any residues of fixative. Once clean, they were immersed overnight in an aqueous solution of 20% AgNO_3 at 60°C. Residual silver was eliminated by washing with distilled water and the staining developed with 1% hydroquinone and 10% formaldehyde (1:1, w/v) for one to 10 min, depending on the intensity required. After a further wash with distilled water, the root tips were squashed in 45% acetic acid containing a drop of 1% carmine, which aids viewing in normal light microscopy.

The number of nucleoli was recorded in 1,064 interphase nuclei and the number of active NORs was observed in 42 metaphases. Best cells were photographed on Kodak Imagelink ASA 25 print film, and scanned at 300 dpi. The images were optimized for best contrast and brightness with Adobe Photoshop 6.0.

Results

In situ hybridization

Both simultaneous and sequential FISH with a two-by-two combination of probes were used to study the metaphase chromosomes of *Th. ponticum*. The 5S and the 45S rDNA genes were located simultaneously using pTa794 and pTa71 probes, respectively. For both sequences, minimal differences of intensities were detected between loci. Twenty 5S rDNA sites were observed at interstitial position in the short arms of 20 chromosomes. Seventeen 45S rDNA were located at a terminal position in the short arms of 17 out of the 20 chromosomes carrying the 5S rDNA, on a double labeling pattern (Figures 1a, b). Considering the number of rDNA sites, as well as the ploidy level ($2n = 10x = 70$) and the chromosome morphology of *Th. ponticum*, double labeling seemed to be restricted to chromosomes of two homoeologous groups, both submetacentrics.

The pAs1 probe produced terminal labels on both arms of all 70 chromosomes. In addition, a dispersed labeling was observed throughout the chromosomes, except for centromeric and most pericentromeric regions (Figure 1c). The pSc119.2 probe produced labeling on terminal positions of the short arms of 17 chromosomes. Two of them, with different morphologies, also showed telomeric labels on the long arm. In addition, pSc119.2 labels were observed on the long arm of three chromosomes with 45S rDNA sites (Figure 1d).

Silver staining

An attempt was made to analyze the activity of different NORs in cells undergoing interphase to metaphase. Silver staining revealed a high number of Ag-NOR sites (14 to 17). Seventeen were observed in 76% of the 46 metaphases studied (Figure 2a). However, in the 1,064 interphase nuclei studied, the number of nucleoli varied from one to 15, most (82.8%) showing four to nine nucleoli (Figure 2b).

Discussion

Ribosomal genes

The species of the Triticeae tribe vary greatly in number of 45S ribosomal DNA sites. For example, *Ae. comosa* Sibth. & Sm. ssp. *comosa* shows nine pairs of rDNA loci distributed among the seven chromosome pairs, whereas *S. cereale* has only one pair of these loci (Appels *et al.*, 1980). Nevertheless, the main 45S rDNA loci occur preferentially in the homoeologous groups 1, 5 and 6 (Lacadena *et al.*, 1988; Badaeva *et al.*, 1996). In *Th. elongatum* ($2n = 2x = 14$, E) and in *Th. distichum* ($2n = 4x = 28$, JJ), the 45S rDNA loci are located in the short arms of two chromosome pairs named as 5 and 6 (Dvořák *et al.*, 1984; Fominaya *et al.*, 1997). In the *Th. ponticum* analyzed, the 45S rDNA sites were located in a similar position in 17 chromosomes, suggesting that, except in three chromosomes, the ribosomal genes are present in two chromosome pairs of each one of the five genomes (JJJJ^sJ^s). The occurrence of these sites in 17 instead of 20 chromosomes, as observed by Li and Zhang (2002), most likely indicates a reduction of the number of repeats or a deletion of sites from this accession. A similar reduction has already been described in other polyploids (Linde-Laursen *et al.*, 1992) and it may be more frequent in

higher polyploids. In common wheat, the elimination of DNA sequences is one of the main responses to allopolyploidization, occurring after the formation of the polyploid and involving a large fraction of the genome, including 45S rDNA repetitive units (Shaked *et al.*, 2001). For example, in the chromosome 1AS of *T. monococcum* L., the number of repetitive units of 45S rDNA was largely reduced after its incorporation into the polyploid wheats (Jiang and Gill, 1994). In addition, the terminal position of this locus in *Th. ponticum* might facilitate its partial or total elimination in some sites (Pestsova *et al.*, 1998).

The number of Ag-NOR sites of *Th. ponticum* revealed after silver staining was generally similar to that of 45S rDNA labeled after FISH (17). However, the mean number of nucleoli per nucleus was much lower. This indicates that all or nearly all rDNA sites are necessary for normal cell function. At interphase, the Ag-NOR sites tend to coalesce, as suggested by Lacadena *et al.* (1988).

In Triticeae, the 5S rDNA sites consist of a 120 bp coding sequence alternating with non-transcribed spacers, which are classified into two types according to their length and sequence (Gerlach and Dyer, 1980). In most genomes the sites with short spacers are located in homeologous group 1, whereas those with long spacers are located in group 5 (Reddy and Appels, 1989; Dvořák *et al.*, 1989). In *Th. elongatum*, the presence of 5S rDNA in the short arms of chromosomes of the homeologous group 1 and probably 5 has been suggested (Scoles *et al.*, 1988; Dvořák *et al.*, 1989). In *Th. ponticum*, we found two 5S rDNA sites per haploid genome. Considering the distribution of these sites in other species, and the proximity of these sites to the 45S rDNA sites, it is tempting to conclude that these chromosomes belong to homoeologous groups 1 and 5.

In *Th. ponticum*, the 45S rDNA locus was always distally located in relation to the 5S rDNA locus. This disposition is similar to that found in homoeologous group 5 of

the D genome of *T. aestivum* (Mukai *et al.*, 1990; Mukai *et al.*, 1991), of *Ae. umbellulata* Zhuk. (Castilho and Heslop-Harrison, 1995) and of *Th. distichum* (Fominaya *et al.*, 1997). However, in homoeologous group 1 of the B genome of *T. aestivum* (Mukai *et al.*, 1990; Mukai *et al.*, 1991) and *Ae. umbellulata* (Castilho and Heslop-Harrison, 1995), these sites are located in an inverted position. In *Th. elongatum*, one pair of 45S and 5S rDNA loci are separately located in chromosomes 6E and 1E, respectively (Dvořák *et al.*, 1984; Dvořák *et al.*, 1989).

pSc119.2 and pAs1 repetitive sequences

The sequence pSc119.2 from *S. cereale* has been widely used in FISH experiments due to its high copy number and polymorphic location in many species of the Triticeae. Lapitan *et al.* (1987), studying the distribution of this sequence in three species of *Thinopyrum*, found 10 terminal and only one subterminal site in *Th. bessarabicum* (Savul.& Rayss) Á. Löve ($2n = 2x = 14$, J genome). In *Th. elongatum* ($2n = 2x = 14$, E genome), these authors found 10 terminal sites plus other sites distributed throughout the entire length of all chromosomes, except in the telomeres of one chromosome. On the other hand, in the hexaploid *Th. intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey (JJ^sSt), the pSc119.2 sequence hybridized to a few chromosomes. Similarly, in the decaploid *Th. ponticum* studied in the present work, a reduction in the number of pSc119.2 sites was found, when compared to those of the two diploid species referred to above.

The pAs1 probe has also been widely used in the Triticeae. In *T. aestivum*, the identification of all chromosomes was possible when this probe was associated with a GAA-rich satellite sequence. The authors observed 48 pAs1 bands (Pedersen and Langridge, 1997) and most large sites were located on the terminal region of D genome chromosomes, as described by Rayburn and Gill (1986). In fact, most large blocks of

tandem repetitive sequences are usually located in a similar position in all the chromosomes of a given species. It is possible that these chromosome regions favor or show greater tolerability to the presence of such tandem repetitions (Flavell, 1982). In the present work, *Th. ponticum* showed terminal bands on both arms of the 70 chromosomes. Another characteristic of this probe in *Th. ponticum* was the disperse labeling throughout all the chromosomes, except in the centromeric and most of the pericentromeric regions. This diffuse labeling in *Th. ponticum*, unlike that found in *T. aestivum*, makes this sequence an important tool for chromosome differentiation in *T. aestivum* × *Th. ponticum* hybrids.

These data show that the number and position of the sites revealed by the probes pTa 71, pTa794, pAs1 and pSc119.2 are valuable markers to characterize and identify the chromosomes of *Th. ponticum* in inbred lines of wheat × *Th. ponticum*.

Acknowledgements

This work was supported by grants and fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo). The authors are grateful to Dr. María Jesús Puertas Gallego for her critical review.

References

Appels R, Gerlach WL, Dennis ES, Swift H and Peacock WJ (1980) Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78:293-311.

- Badaeva ED, Friebe B and Gill BS (1996) Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome* 39:1150-1158.
- Castilho A and Heslop-Harrison JS (1995) Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. *Genome* 38:91-96.
- Chen Q, Conner RL, Laroche A and Thomas JB (1998) Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization. *Genome* 41:580-586.
- Chen Q, Eudes F, Conner RL, Graf R, Comeau A, Collin J, Ahmad F, Zhou R, Li H, Zhao Y and Laroche A (2001) Molecular cytogenetic analysis of a durum wheat × *Thinopyrum distichum* hybrid used as a new source of resistance to Fusarium head blight in the greenhouse. *Plant Breed.* 120:375-380.
- Cuadrado A, Schwarzacher T and Jouve N (2000) Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theor. Appl. Genet.* 101:711-717.
- Dvořák J, Lassner MW, Kota RS and Chen KC (1984) The distribution of the ribosomal RNA genes in the *Triticum speltoides* and *Elytrigia elongata* genomes. *Can. J. Genet. Cytol.* 26:628-632.
- Dvořák J, Zhang H-B, Kota RS and Lassner MW (1989) Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome* 32:1003-1016.
- Fernández-Gomez M-E, Stockert JC, Lopez-Saez JP and Gimenez-Martin G (1969) Staining plant nucleoli with Ag-NO₃ after formalin-hydroxyquinone fixation. *Stain Technol.* 44:48-49.

- Flavell R (1982) Sequence amplification, deletion and rearrangement: major sources of variation during species divergence. In: Dover GA and Flavell RB (eds) Genome Evolution. Academic Press, London, pp 301-323.
- Fominaya A, Molnar S, Kim N-S, Chen Q, Fedak G and Armstrong KC (1997) Characterization of *Thinopyrum distichum* chromosomes using double fluorescence *in situ* hybridization, RFLP analysis of 5S and 26S rRNA, and C-banding of parents and addition lines. Genome 40:689-696.
- Gerlach WL and Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Res. 7:1869-1885.
- Gerlach WL and Dyer TA (1980) Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat, which contains 5S rDNA genes. Nucleic Acids Res. 8:4851-4865.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anantawat-Jonsson K, Leitch AR, Shi M and Leitch IJ (1991) *In situ* hybridization with automated chromosomes denaturation. Technique 3:109-116.
- Hizume M, Sato S and Tanaka A (1980) A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. Stain Tech. 55:87-90.
- Jiang J and Gill BS (1994) New 18S- 26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. Chromosoma 103:179-185.
- Kim N-S, Armstrong KC, Fedak G, Fominaya A and Whelan EWP (1993) Cytological and molecular characterization of a chromosome interchange and addition lines in Cadet involving chromosome 5B of wheat and 6Ag of *Lophopyrum ponticum*. Theor. Appl. Genet. 86:827-832.
- Lacadena JR, Cermeño MC, Orallana J and Santos JL (1988) Nucleolar competition *Triticeae*. In: Brandham PE (ed) Proc. Third Kew Chrom. Conf., 1987, HMSO, London, pp 151-165.

- Lapitan NLV, Gill BS and Sears RG (1987) Genomic and phylogenetic relationships among rye and perennial species in the Triticeae. *Crop Science* 27:682-687.
- Li D and Zhang X (2002) Physical localization of the 18S-5.8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticeae): implications for concerted evolution. *Genome* 41:763-768.
- Lima-Brito J, Guedes-Pinto H and Heslop-Harrison JS (1998) The activity of nucleolar organizing chromosomes in multigenic F₁ hybrids involving wheat, triticale, and tritordeum. *Genome* 41:763-768.
- Linde-Laursen I, Isben E, Von Bothmer R and Giese H (1992) Physical localization of active and inactive rRNA gene loci in *Hordeum marinum ssp. gussoneanum* (4x) by *in situ* hybridization. *Genome* 35:1032-1036.
- Martini GM and Flavell RB (1985) The control of nucleolus volume in wheat, a genetic study at three development stages. *Heredity* 54:111-120.
- McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, Gale MD and Rogers WJ (1998) Patogenic disease/pest reaction. In: McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, Gale MD and Rogers WJ (eds) Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp., 1998, University of Saskatchewan, Saskatoon, vol. 5, pp 129-139.
- McIntyre CL, Pereira S, Moran LB and Appels R (1990) New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat. *Genome* 33:635-640.
- Mukai Y, Endo TR and Gill BS (1991) Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. *Chromosoma* 100:71-78.
- Mukai Y, Endo TR and Gill BS (1990) Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J. Hered.* 81:290-295.

- Mukai Y, Nakahara Y and Yamamoto M (1993) Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36:489-494.
- Muramatsu M (1990) Cytogenetics of decaploid *Agropyron elongatum* (*Elytrigia elongata*) ($2n = 70$). I. Frequency of decavalent formation. *Genome* 33:811-817.
- Pedersen C and Langridge P (1997) Identification of the entire chromosome complement of bread by two-colour FISH. *Genome* 40:589-593.
- Pestsova EG, Goncharov NP and Salina EA (1998) Elimination of a tandem repeat of telomeric heterochromatin during the evolution of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 97:1380-1386.
- Rayburn AL and Gill BS (1986) Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. *J. Hered.* 77:253-255.
- Reddy P and Appels R (1989) A second locus for the 5S multigene family in *Secale* L.: sequence divergence in two lineages of the family. *Genome* 32:457-467.
- Scoles GJ, Gill BS, Xin Z-Y, Clarke BC, McIntyre CL, Chapman C and Appels R (1988) Frequent duplication and deletion events in the 5S RNA genes and the associated spacer regions of the *Triticeae*. *Plant Syst. Evol.* 160:105-122.
- Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M and Levy AA (2001) Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell* 13:1749-1759.
- Vieira R, Queiroz A, Morais L, Barao A, Mello-Sampayo T and Viegas W (1990) Genetic control of 1R nucleolus organizer region expression in the presence of wheat genomes. *Genome* 33:713-718.

- Wang RR-C, Marburger JE and Hu C-J (1991) Tissue-culture-facilitated production of aneupolyhaploid *Thinopyrum ponticum* and amphidiploid *Hordeum violaceum* x *H. bogdanii* and their uses in phylogenetics studies. *Theor. Appl. Genet.* 81:151-156.
- Zhang H-B and Dvořák J (1990) Characterization and distribution of an interspersed repeated nucleotide sequence from *Lophopyrum elongatum* and mapping of a segregation-distortion factor with it. *Genome* 33:927-936.
- Zhang X, Dong Y and Wang RR-C (1996) Characterization of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* x *Thinopyrum ponticum* by *in situ* hybridization, isozyme analysis, and RAPD. *Genome* 39:1062-1071.

Legends

Figure 1 - Locating of specific sites in the chromosomes of *Thinopyrum ponticum*. **a.** Complete metaphase with $2n = 70$ DAPI stained chromosomes. **b.** The same cell showing seventeen 45S rDNA sites (red) and 20 sites of 5S rDNA (green). **c.** Reprobing of the same cell revealing the distribution of the highly repetitive DNA sequence pAs1. **d.** Partial prometaphase displaying 15 sites of 45S rDNA (red) and the terminal locating of the pSc119.2 probe (green). Bars = 10 μm .

Figure 2 – Analysis of NOR activity, using the silver-staining procedure. **a.** Partial metaphase showing the maximum number of Ag-NORs found in a single cell (17 sites). **b.** Interphase nuclei with six nucleoli. Bar = 10 μm .

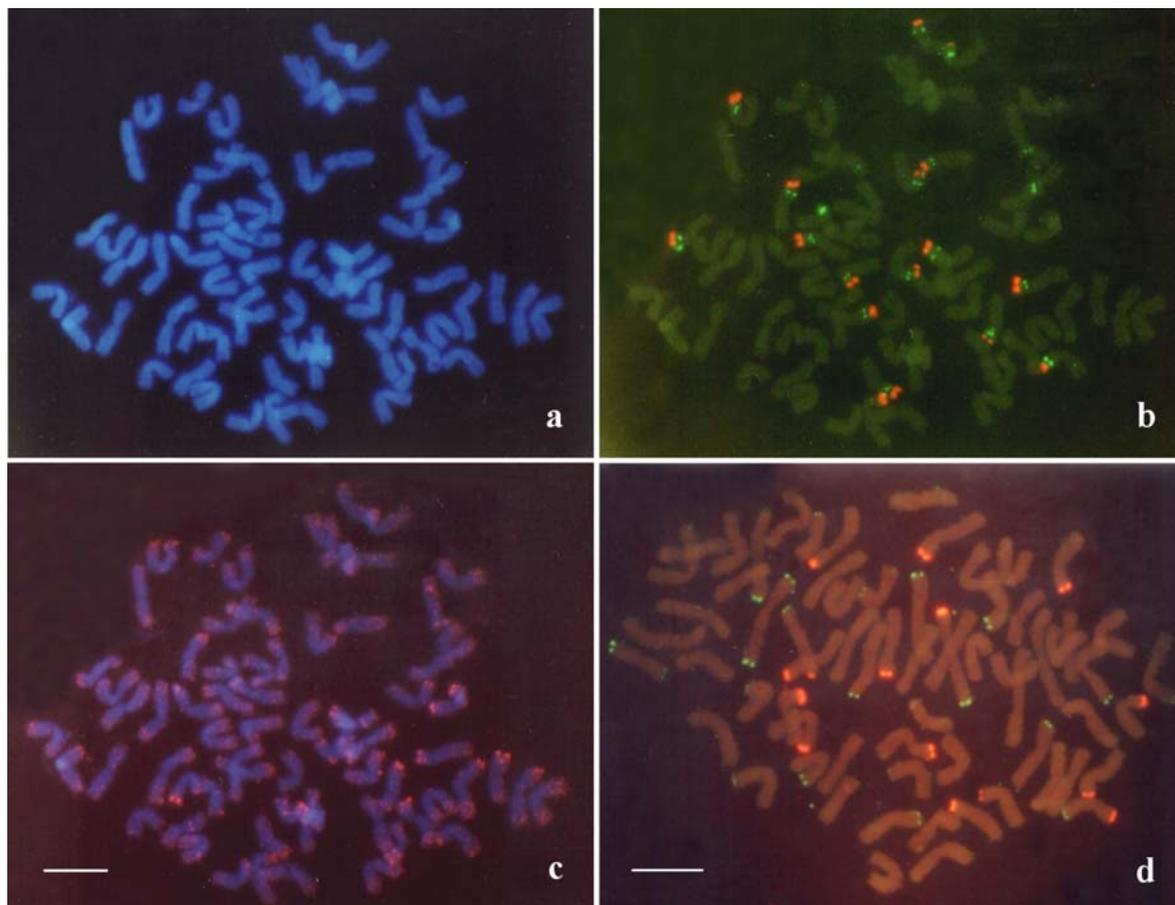


Figure 1

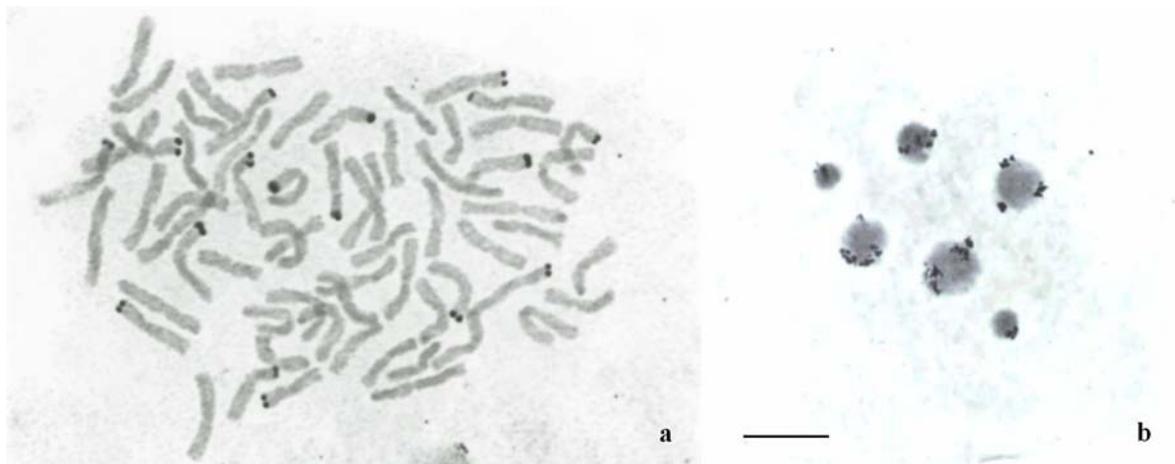


Figure 2

Manuscrito 3

Caracterização citogenética molecular dos genomas
parentais em anfidiplóides parciais derivados de
Triticum aestivum × *Thinopyrum ponticum*

Manuscrito a ser enviado para a revista
International Journal of Plant Sciences

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA MOLECULAR DOS GENOMAS
PARENTAIS EM ANFIDIPLÓIDES PARCIAIS DERIVADOS DE
Triticum aestivum × *Thinopyrum ponticum***

Ana Christina Brasileiro-Vidal¹, Angeles Cuadrado²,

Sandra Patussi Brammer³, Ana Maria Benko Iseppon⁴ e Marcelo Guerra^{1,5}

¹ Departamento de Botânica, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco (Brasil);

² Departamento de Biología Celular y Genética, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid (España);

³ Embrapa Trigo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 99001-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul (Brasil);

⁴ Departamento de Genética, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco (Brasil);

⁵ Autor para correspondência; e-mail mguerra@ufpe.br.

Shortened title: Brasileiro-Vidal et al.–FISH in wheat × *Th. ponticum* derivatives

Resumo

A técnica de hibridização *in situ* foi utilizada para caracterizar a linhagem de trigo PF 839197 e seis acessos híbridos derivados do cruzamento PF 839197 × *Thinopyrum ponticum*. Para isso, foram utilizadas as seguintes sondas: DNA genômico de centeio e de *Th. ponticum*, pTa794 e pTa71, pSc119.2 e o oligonucleotídeo sintético (AAG)₅. A linhagem PF 839197, hibridizada com as sondas pTa794, pTa71, pSc119.2 e (AAG)₅, apresentou um padrão de marcas semelhante ao da cultivar ‘Chinese Spring’, com exceção do braço 1BS, para as sondas pSc119.2 e (AAG)₅. Esse braço cromossômico apresentou um padrão de bandas típico de centeio, sugerindo a ocorrência de uma translocação 1BL.1RS, que foi confirmada por GISH, usando DNA genômico de centeio como sonda. A análise dos anfidiplóides parciais confirmou resultados anteriores, que indicavam instabilidade mitótica, tendo um acesso 2n = 42 a 2n = 45 e cinco acessos 2n = 48 a 2n = 56. No acesso com 2n = ca. 42, a GISH, utilizando DNA genômico de *Th. ponticum* como sonda, não produziu marcação. Nos outros cinco acessos a utilização dessa mesma sonda mostrou que o complemento cromossômico consiste de 36 a 42 cromossomos de trigo e de 11 a 14 cromossomos de *Th. ponticum*. Em células com 2n = 56, as sondas pTa794 e pTa71 revelaram a presença dos 12 sítios de DNAr 5S e oito sítios de DNAr 45S esperados para trigo, além de quatro cromossomos com sítios de DNAr 5S e 45S. Nestes cromossomos adicionais, o DNAr 45S era sempre distal, como descrito na literatura para *Th. ponticum*, indicando que os cromossomos de *Thinopyrum* detectados por GISH formavam dois conjuntos monoplóides. Esses resultados reforçam dados da literatura de que os cromossomos de *Th. ponticum* tendem a ser transmitidos como conjuntos monoplóides nos anfidiplóides parciais.

Palavras-chave: *Thinopyrum ponticum*, trigo, GISH, FISH, DNAr 5S e 45S, (AAG)₅

Abstract

In situ hybridization was employed to characterize the wheat line PF 839197 and six hybrid derivatives from a cross between PF 839197 and *Thinopyrum ponticum*, using the following probes: genomic DNA from rye and from *Th. ponticum*, pTa794, pTa71, pSc119.2 and the synthetic oligonucleotide (AAG)₅. After FISH, the hybridization patterns observed in the line PF 839197 were similar to the patterns previously reported to the cultivar 'Chinese Spring', except for the 1BS arm with the pSc119.2 and (AAG)₅ probes. In this arm, the probes showed a typical rye distribution, suggesting the presence of a 1BL.1RS translocation in this line. GISH using rye genomic DNA as probe confirmed this introgression. Analyses of partial amphiploids confirmed the previous results, that indicated mitotic instability, with one 2n = 42 to 2n = 45 and five accessions 2n = 48 to 2n = 56. In the hybrid derivative with 2n = ca. 42, GISH with genomic DNA from *Th. ponticum* did not hybridize in any chromosome. In the others accessions, the same probe demonstrated that each chromosome complement consists of 36 to 42 chromosomes from wheat and 11 to 14 chromosomes from *Th. ponticum*. In cells with 2n = 56, the pTa794 and pTa71 probes revealed the presence of the twelve 5S rDNA and eight 45S rDNA sites from wheat, and four extra chromosomes bearing 5S and 45S rDNA sites. In these additional chromosomes, the 45S rDNA sites were always distally located, as described in the literature for *Th. ponticum*. This indicates that *Th. ponticum* chromosomes detected by GISH belong to two monoploid sets. These results emphasize previous data that *Th. ponticum* chromosomes tend to be transmitted as monoploid sets in partial amphiploids.

Keywords: *Thinopyrum ponticum*, wheat, GISH, FISH, 5S and 45S rDNA, (AAG)₅

Introdução

Thinopyrum ponticum (Podp.) Barkworth & D. R. Dewey tem sido usada extensivamente para a transferência de genes para trigo, especialmente genes de resistência à ferrugem do colmo e da folha (McIntosh et al. 1998). É uma espécie decaplóide ($2n = 10x = 70$), constituída pelos genomas JJJ^sJ^s, sendo J e J^s proximamente relacionados (Chen et al. 1998a). Como em outras espécies da tribo Triticeae, *Th. ponticum* tem um cariótipo muito simétrico, sendo difícil a identificação de seus cromossomos individualmente. Além disso, não há na literatura, para essa espécie, um padrão de bandas C que associe seus cromossomos a cada grupo de homeologia. Recentemente, Brasileiro-Vidal et al. (em preparação), procurando caracterizar melhor o cariótipo dessa espécie, observaram a presença de 20 sítios de DNAr 5S e 17 sítios de DNAr 45S. Estes últimos estavam localizados na posição terminal dos braços curtos de 17 dos 20 cromossomos que apresentavam DNAr 5S. Baseado em seu número básico $x = 7$, natureza decaplóide e morfologia cromossômica, a dupla marcação pareceu ser restrita a cromossomos pertencentes a dois grupos de homeologia.

Em trigo, a introgressão de material genético de espécies próximas tem se tornado uma ferramenta importante no melhoramento genético. Em alguns casos, as cultivares produzidas apresentam inserções de segmentos cromossômicos oriundos de mais de uma espécie. A cultivar 'Amigo', por exemplo, possui uma translocação trigo–centeio do tipo 1AL.1RS e um segmento de *Th. ponticum* localizados no satélite do cromossomo 1B (Jiang et al. 1994).

Diversos anfidiplóides parciais de trigo \times *Thinopyrum*, com número cromossômico $2n = 8x = 56$, têm sido produzidos por retrocruzamentos do híbrido trigo \times *Thinopyrum* com trigo. Esses anfidiplóides possuem, geralmente, um conjunto cromossômico completo de trigo (42 cromossomos) e dois conjuntos monoplóides (14 cromossomos) de *Thinopyrum*, podendo haver algumas substituições de cromossomos de trigo por *Thinopyrum* ou vice-versa (Fedak et al. 2000). A composição genômica desses anfidiplóides tem sido analisada por diferentes técnicas,

destacando-se a hibridização genômica *in situ* (GISH), usada tanto em estudos de similaridade genômica como na identificação dos genomas parentais (Chen et al. 1998b; Cai et al. 2001). Os genomas J e J^s de *Th. ponticum*, por exemplo, foram diferenciados através de experimentos com GISH, mostrando que o J^s difere do J pela presença de seqüências do genoma St predominantemente nas regiões centroméricas (Chen et al. 1998a).

Outras sondas, como os oligonucleotídeos sintéticos e a seqüência repetitiva pSc119.2 obtida originalmente de centeio, também podem ser usadas na caracterização genômica de alguns híbridos interespecíficos (Cuadrado e Schwarzacher 1998). Em trigo, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), com (AAG)₅ ou com um clone rico em DNA repetitivo GAA, resulta em um padrão de marcação cromossômica semelhante às bandas N, fortemente representadas no genoma B (Pedersen e Langridge 1997; Cuadrado et al. 2000). Dessa forma, é possível identificar os sete pares do genoma B além de alguns cromossomos dos genomas A e D de trigo em híbridos intergenéricos (Cuadrado e Schwarzacher 1998).

A Embrapa Trigo (Passo Fundo, Brasil) vem desenvolvendo, desde 1988, um amplo trabalho para a introgressão de genes de *Th. ponticum* em cultivares brasileiras de trigo. Seis acessos derivados de um híbrido trigo × *Th. ponticum*, retrocruzado duas vezes e, em seguida, autofecundado por cinco ou sete gerações, foram analisados anteriormente através da contagem de número cromossômico e da medição do conteúdo de DNA, mostrando uma forte variação numérica causada, ao menos em parte, por instabilidade mitótica (Brasileiro-Vidal et al. em preparação). Cinco desses acessos apresentavam variação cromossômica intraindividual extensa, com números cromossômicos mais altos, próximos a $2n = \text{ca. } 56$, e um acesso se mostrou mais estável, apresentando $2n = 42$ cromossomos como número mais freqüente.

No presente trabalho, uma combinação das técnicas de GISH e FISH foi utilizada para caracterizar a composição genômica desses seis acessos. Adicionalmente, foi analisada a linhagem de trigo PF 839197, usada no cruzamento inicial. Essa linhagem possui como um de

seus ancestrais a cultivar ‘Alondra’, portadora de uma translocação trigo–centeio, envolvendo o braço curto do cromossomo 1 de centeio, denominada 1BL.1RS (Schlegel, 2003). Contudo, não se sabe se o braço curto de centeio foi transmitido e ainda persiste nessa linhagem.

Material e métodos

Material vegetal e preparação das lâminas

Foram analisadas a linhagem de trigo PF 839197 e seis acessos derivados do híbrido entre essa linhagem e o acesso PF Ag. el. 84001 de *Th. ponticum*. Esse híbrido foi retrocruzado duas vezes com a cultivar de trigo ‘CEP 19’ (PF 839197/PF Ag. el. 84001//2*‘CEP19’) e depois autofecundado por cinco ou sete gerações. Três desses acessos (PF 984501, PF 984504, PF 984506) se encontravam na geração RC₂F₇ (sétima geração do retrocruzamento dois) e três (PF 984901A, PF 984902, PF 984903A) eram duplo-haplóides em RC₂F₅. A duplo-haploidização foi realizada via eliminação somática, através de cruzamentos entre indivíduos da geração RC₂F₅ e plantas de milho. Esses materiais foram provenientes do programa de melhoramento realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Trigo, Passo Fundo, Brasil, e a cultivar ‘CEP 19’ apresenta a genealogia Pel 72380/‘Arthur 71’//PF 75336/3/‘Alondra SIB’/PF 72707//‘PAT 19’.

Pontas de raízes pré-tratadas com água fria (ca. 0°C) durante 24 h foram fixadas em etanol : ácido acético (3 : 1, v/v) e mantidas a -20°C. O material foi digerido em celulase 2% (p/v, Onozuka R10) e pectinase 20% (v/v, Sigma) por 1 h e 30 min a 37°C. Em seguida, cada ponta de raiz foi esmagada em uma gota de ácido acético 45%, a lamínula foi retirada em nitrogênio líquido e as lâminas foram secas ao ar.

Sondas de DNA

Foram utilizadas as seguintes sondas: o DNA genômico de *Th. ponticum*; o DNA genômico de *Secale cereale*; o clone pTa794, que corresponde à unidade do gene DNAr 5S, isolado de *Triticum aestivum* (Gerlach e Dyer 1980); o clone pTa71, que contém a unidade de repetição do gene de DNAr 18S-5.8S-26S, também de *T. aestivum* (Gerlach e Bedbrook 1979); o clone pSc119.2, contendo uma unidade de seqüência repetida em *tandem* de 120 pb oriunda de *S. cereale* (McIntyre et al. 1990), e o oligonucleotídeo sintético (AAG)₅. As sondas foram marcadas com digoxigenina-11-dUTP (Roche), biotina-11-dUTP (Sigma) ou rodamina-5-dUTP (Sigma), por *nick translation* (DNA genômico, pTa71), por *random primer* (oligonucleotídeo sintético) ou pela reação em cadeia da polimerase (pTa794 e pSc119.2) usando primers universais, por 50 s para o pareamento a 55°C. No caso da GISH, as sondas de DNA genômico de *Th. ponticum* e de *S. cereale* foram adicionadas à mistura de hibridização em proporções de 1:40 e de 1:10, respectivamente, em relação ao DNA bloqueador de trigo.

Hibridização in situ

A hibridização *in situ* seguiu o procedimento baseado em Heslop-Harrison et al. (1991) a 85% de estringência. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com anti-digoxigenina-FITC (isotiocianato de fluoresceína, Boehringer) e aquelas marcadas com biotina foram detectadas com avidina conjugada com FITC ou com rodamina (Vector). As preparações foram contra-coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a 2 µg ml⁻¹ e montadas em Vectashield H-1000. As melhores células foram capturadas em fotomicroscópio Leica DMLB equipado com câmera Cohu CCD e um microcomputador, utilizando-se o *software* Leica QWin, ou foram fotografadas com filme colorido Fuji Super G ou Kodak Ultra ASA 400, e escaneadas a 300 dpi. As imagens foram otimizadas para contraste e brilho, utilizando o Adobe Photoshop 6.0.

Resultados

A cultivar PF 839197, hibridizada com as sondas pTa794, pTa71, pSc119.2 e (AAG)₅, apresentou um padrão de marcação semelhante ao descrito para a cultivar ‘Chinese Spring’ (Mukai et al. 1990; 1991; 1993; Cuadrado et al. 2000), com exceção do braço curto do cromossomo 1B para as sondas pSc119.2 e (AAG)₅ (dados não mostrados). Para ambas as sondas, observou-se um padrão típico do braço 1RS de centeio. A sonda pSc119.2 hibridizou nesse braço em um sítio terminal e em um outro intercalar, observando-se ausência de sinais para a sonda (AAG)₅. Através de GISH, usando o DNA genômico de centeio como sonda, foi confirmada a presença de dois braços 1RS uniformemente detectados com FITC, indicativos da translocação 1BL.1RS (fig. 1A).

Na análise com GISH, utilizando como sonda o DNA genômico de *Th. ponticum* no acesso PF 984902 em RC₂F₅ com 2n = 42 a 2n = 45 não foram visualizados cromossomos nem segmentos cromossômicos de *Thinopyrum*. Por outro lado, em cinco acessos (dois RC₂F₅ e três RC₂F₇), essa mesma sonda marcou um máximo 14 de um total de até 56 cromossomos, de forma mais ou menos uniforme ao longo de todo o comprimento cromossômico (fig. 1B). Devido à instabilidade mitótica desses acessos, 59% das 44 células analisadas apresentaram um número menor de cromossomos (2n = 48 a 2n = 55) e o número de cromossomos marcados variou de 11 a 14. Nenhuma translocação trigo–*Thinopyrum* foi detectada. Em alguns indivíduos, foi realizada uma análise dos sítios de DNAr, constatando-se nas células com 2n = 56 a presença dos 12 sítios de DNAr 5S (1A, 5A, 1B, 5B, 1D e 5D) e oito de DNAr 45S (1A, 1B, 6B e 5D), esperados para trigo, além de quatro cromossomos com sítios de DNAr 5S e 45S extras (figs. 1C, D). Estes últimos encontravam-se ligados, estando o DNAr 45S na região mais distal.

Discussão

A presença do braço cromossômico 1RS de centeio em cultivares de trigo influencia significativamente a performance da cultivar, além de fornecer genes de resistência a pragas e doenças (Caver e Rayburn, 1994). Entre as diversas cultivares atuais de trigo portadoras do braço 1RS, as mais comuns são aquelas em que o braço curto de um dos cromossomos de trigo pertencentes ao grupo 1 é substituído pelo 1RS (Berzonsky e Francki, 1999). No presente estudo, utilizando como sondas o DNA genômico de centeio e as seqüências pSc119.2 e (AAG)₅, foi demonstrada a presença da translocação 1BL.1RS na linhagem PF 839197, provavelmente derivada da cultivar 'Alondra'.

Nos anfidiplóides parciais de trigo \times *Th. ponticum* analisados neste trabalho, havia sido identificada uma instabilidade mitótica, gerando números cromossômicos próximos a $2n = 42$, em um acesso, e próximos a $2n = 56$, em outros (Brasileiro-Vidal et al., em preparação). O uso do DNA genômico de *Th. ponticum* como sonda permitiu diferenciar os cromossomos dos dois genomas nesses derivados híbridos. O acesso duplo-haplóide PF 984902 tinha sido caracterizado por uma variação de números cromossômicos próximos a $2n = 42$ (Brasileiro-Vidal et al., em preparação). No presente trabalho, foi verificado que este acesso apresentou perda total de cromossomos de *Th. ponticum*. Cai et al. (1998b) também observaram que o genoma de *Th. ponticum* foi inteiramente perdido em algumas plantas em RC_1F_2 oriundas de trigo \times *Thinopyrum*. Nos indivíduos com $2n$ próximo ou igual a 56, as células com $2n = 56$ possuíam 42 cromossomos de trigo e 14 de *Thinopyrum*. Este resultado sugere que o número cromossômico zigótico desses indivíduos seria $2n = 56$ e a variação de números cromossômicos teria ocorrido por instabilidade mitótica, levando à perda de cromossomos provocada por retardo anafásico, ou, eventualmente, por distribuição desigual dos cromossomos, gerando células hipoaneuplóides e hiperaneuplóides (ver Brasileiro-Vidal et al. em preparação).

Outros anfidiplóides parciais de trigo \times *Th. ponticum* com $2n = 56$ cromossomos também são conhecidos, embora a composição genômica nem sempre seja a mesma. Na linhagem AT 3425, por exemplo, foram identificados sete pares cromossômicos de *Th. ponticum*, três pares translocados trigo–*Thinopyrum* e 18 pares de trigo (Cai et al. 1998a) e, na linhagem Agrotana, constatou-se 40 cromossomos de trigo e 16 de *Th. ponticum* (Chen et al. 1995). Por outro lado, a linhagem 784 foi semelhante às do presente trabalho, 42 cromossomos de trigo e 14 de *Th. ponticum* (Zhang et al. 1996). Chen et al. (1995) sugeriram que Agrotana pode ter sido formada a partir da união tanto de gametas reduzidos como não-reduzidos, seguido pela perda de cromossomos em gerações iniciais de retrocruzamentos e de autofecundações. De acordo com Chen et al. (1999b), os genomas das espécies doadoras em anfidiplóides parciais de trigo \times *Thinopyrum* não precisariam ser intactos, mas deveriam formar um genoma, contendo preferencialmente sete pares de cromossomos homeólogos da espécie introgridida, e funcionar como uma unidade integral em termos de estabilidade e de transmissão de cromossomos através dos gametas. Os dados do presente trabalho parecem confirmar essa conclusão, uma vez que, dos seis acessos, cinco mantiveram cerca de 14 cromossomos de *Th. ponticum* e um acesso não conservou nenhum.

Anfidiplóides parciais desse tipo, com $2n = 56$, mostram geralmente meiose regular, com frequência de formação de bivalentes alta e de multivalentes muito baixa (Fedak et al. 2000). Em Agrotana, por exemplo, observou-se a formação de oito bivalentes *Thinopyrum*–*Thinopyrum* e de 16 a 20 bivalentes trigo–trigo, não se constatando nenhum pareamento alossindético, o que garante uma alta fertilidade e estabilidade cromossômica (Chen et al. 1995).

Nas células com $2n = 56$, a detecção de quatro cromossomos com sítios de DNAr 5S e 45S a mais, em relação ao esperado para trigo, posicionados como descrito para os cromossomos de *Th. ponticum* por Brasileiro-Vidal et al. (em preparação), sugere que os 14 cromossomos de *Th. ponticum* formam dois conjuntos monoplóides, já que cada um dos dez conjuntos

cromossômicos de *Th. ponticum* contém dois cromossomos com os sítios de DNAr 5S e 45S (Brasileiro-Vidal et al. em preparação). Contudo, não foi possível definir se esses cromossomos pertencem ao genoma J ou J^s. É conhecido que anfidiplóides parciais não possuem necessariamente a mesma combinação de cromossomos da espécie introgridida, podendo, neste caso, apresentar diferentes taxas de cromossomos J e J^s. Zhang et al. (1996), por exemplo, sugeriram que, dos 14 cromossomos de *Th. ponticum* da linhagem 784, seis pares seriam do genoma J^s e um par do J, enquanto em Agrotana, Chen et al. (1998b; 1999a) identificaram oito cromossomos pertencentes ao J e oito ao J^s. Estes genomas são proximamente relacionados entre si e com o genoma St. Foi observado por GISH que o genoma J^s difere do J pela presença de seqüências do St predominantemente nas regiões centroméricas e ocasionalmente nas regiões teloméricas, enquanto o genoma J mostra sinais do St apenas nas regiões teloméricas (Chen et al. 1998a).

A presença de ca. 56 cromossomos na maioria dos acessos híbridos, dos quais 14 pertencentes a *Th. ponticum*, sugere que a estratégia de cruzamentos utilizada (hibridização, duas gerações de retrocruzamentos e cinco ou sete autofecundações), sem um acompanhamento citológico, não foi eficiente na transferência seletiva de genes de interesse ao melhoramento de trigo. Nos indivíduos com 56 cromossomos, os 14 cromossomos de *Th. ponticum* provavelmente formam sete pares de bivalentes e, neste caso, podem ser mantidos por autofecundação através de uma transmissão meiótica estável. A instabilidade mitótica desses acessos, gerando um mosaico de células com números cromossômicos diferentes de 56, parece não afetar a formação dos gametas que vão formar a geração seguinte. Uma análise meiótica desse material com GISH poderá revelar o mecanismo de manutenção desses genomas anfidiplóides na presença da instabilidade mitótica.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- Berzonsky WA, MG Francki 1999 Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: A review. *Euphytica* 108: 1–19 .
- Cai X, SS Jones, TD Murray 1998a Molecular cytogenetic characterization of *Thinopyrum* and wheat–*Thinopyrum* translocated chromosomes in a wheat–*Thinopyrum* amphiploid. *Chromosome Res* 6: 183–189.
- Cai X, TD Murray, SS Jones 1998b Identification and manipulation of *Thinopyrum ponticum* chromatin conferring resistance to *Cephalosporium* stripe disease and a perennial habit in wheat. *Proc 9th Int Wheat Genet Symp*, Saskatoon, 29–31.
- Cai X, SS Jones, TD Murray 2001 Molecular cytogenetic characterization of *Thinopyrum* genomes conferring perennial growth habit in wheat–*Thinopyrum* amphiploids. *Plant Breed* 120: 21–26.
- Caver BF, AL Rayburn 1994 Comparison of related wheat stocks possessing 1B or 1RS.1BL chromosomes: agronomic performance. *Crop Sci* 34: 1505-1510.
- Chen Q, RL Conner, A Laroche 1995 Identification of the parental chromosomes of the wheat–alien amphiploid *Agrotana* by genomic *in situ* hybridization. *Genome* 38: 1163–1169.
- Chen Q, RL Conner, A Laroche, JB Thomas 1998a Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization. *Genome* 41: 580–586.

- Chen Q, RL Conner, A Laroche, JB Thomas 1998b Molecular characterization of the genome composition of partial amphiploids derived from *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* and *Triticum aestivum* × *Thinopyrum intermedium* as sources of resistance to wheat streak mosaic virus and its vector, *Aceria tosichella*. *Theor Appl Genet* 97: 1–8.
- Chen Q, RL Conner, A Laroche, G Fedak, JB Thomas 1999a Genomic origins of *Thinopyrum* chromosomes specifying resistance to wheat streak mosaic virus and its vector, *Aceria tosichella*. *Genome* 42: 289–295.
- Chen Q, RL Conner, A Laroche, KC Armstrong, G Fedak 1999b Genomic *in situ* hybridization analysis of *Thinopyrum* chromatin in a wheat–*Th. intermedium* partial amphiploid and six derived chromosome addition lines. *Genome* 42: 1217–1223.
- Cuadrado A, T Schwarzacher 1998 The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107: 587–594.
- Cuadrado A, T Schwarzacher, N Jouve 2000 Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theor Appl Genet* 101: 711–717.
- Fedak G, Q Chen, RL Conner, A Laroche, R Petroski, KW Armstrong 2000 Characterization of wheat–*Thinopyrum* partial amphiploids by meiotic analysis and genomic *in situ* hybridization. *Genome* 43: 712–719.
- Fedak G, Q Chen, RL Conner, A Laroche, A Comeau, CA St-Pierre 2001 Characterization of wheat–*Thinopyrum* partial amphiploids for resistance to barley yellow dwarf virus. *Euphytica* 120: 373–378.
- Gerlach WL, JR Bedbrook 1979 Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res* 7: 1869–1885.
- Gerlach WL, TA Dyer 1980 Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat, which contains 5S rDNA genes. *Nucleic Acids Res* 8: 4851–4865.

- Heslop-Harrison JS, T Schwarzacher, K Anantawat-Jonsson, AR Leitch, M Shi, IJ Leitch 1991 *In situ* hybridization with automated chromosomes denaturation. *Technique* 3: 109–116.
- Jiang J, B Friebe, BS Gill 1994 Chromosome painting of Amigo wheat. *Theor Appl Genet* 89: 811–813.
- McIntosh RA, GE Hart, KM Devos, MD Gale, WJ Rogers 1998 Pathogenic disease/pest reaction. *Proc 9th Int Wheat Genet Symp, Saskatoon*, 129–139.
- McIntyre CL, S Pereira, LB Moran, Appels R 1990 New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat. *Genome* 33: 635–640.
- Mukai Y, TR Endo, BS Gill 1990 Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J Hered* 81: 290–295.
- Mukai Y, TR Endo, B S Gill 1991 Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. *Chromosoma* 100: 71–78.
- Mukai Y, Y Nakahara, M Yamamoto 1993 Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 36: 489–494.
- Pedersen C, P Langridge 1997 Identification of the entire chromosome complement of bread by two-colour FISH. *Genome* 40: 589–593.
- Schlegel, R 2003 Rye introgressions. Gatersleben: Plant Breeding Updates. Disponível em: <http://www.desicca.de/plant_breeding/Rye_introgressions/wheat-rye_translocation_II/hauptteil_wheat-rye_translocation_ii.html>. Acesso em: 01 an. 2003.
- Zhang X, Y Dong, RR–C Wang 1996 Characterization of genomes and chromosomes in partial amphiploids of the hybrid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* by *in situ* hybridization, isozyme analysis, and RAPD. *Genome* 39: 1062–1071.

Legenda da figura

Fig. 1 Hibridização *in situ* da linhagem de trigo PF 839197 e de acessos híbridos derivados do cruzamento PF 839197 × *Thinopyrum ponticum*. (A) Metáfase da linhagem PF 839197, evidenciando um braço de centeio (em verde) translocado em homozigose para o genoma de trigo. (B) Anfidiplóide parcial (PF 984506) com $2n = 56$, mostrando 14 cromossomos de *Th. ponticum* (em verde), marcados com biotina e detectados avidina conjugada com FITC. (C, D) Célula de PF 984506 com $2n = 56$, corada com DAPI (C) e a mesma célula, em (D), mostrando 16 sítios de DNAr 5S, marcados com digoxigenina (verde), e 12 sítios de DNAr 45S, marcados com rodamina (vermelho).

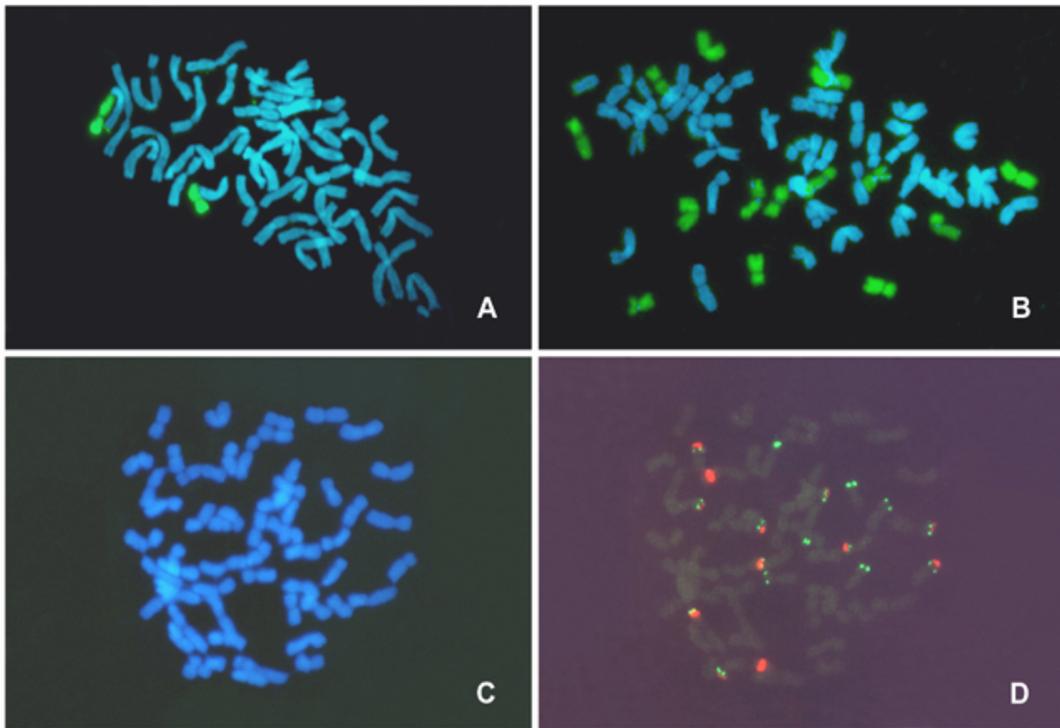


Fig. 1

6 Conclusões gerais

6 Conclusões gerais

A caracterização citogenética da linhagem de trigo PF 839197 e do acesso de *Thinopyrum ponticum* Ag. el. 84001 bem como de seis acessos híbridos derivados do cruzamento PF 839197/PF Ag. el. 84001//2*'CEP19' permitiu as seguintes conclusões:

- 1 A análise dos seis acessos híbridos, por contagem do número cromossômico e medição do conteúdo de DNA, mostrou que todos apresentam células aneuplóides.
- 2 A formação de células aneuplóides deve ter ocorrido por instabilidade mitótica, levando à perda de cromossomos, provocada por retardo anafásico ou, eventualmente, por distribuição desigual dos cromossomos gerando células hipo e hiperaneuplóides.
- 3 A instabilidade mitótica encontrada para os acessos híbridos pode ter sido herdada da cultivar 'CEP 19', usada nos retrocruzamentos, que se mostrou relativamente instável.
- 4 A análise dos cromossomos de *Th. ponticum* com as sondas pTa794, pTa71, pSc119.2 e pAs1 não permitiu uma diferenciação muito importante entre os cromossomos desse cariótipo, podendo-se distinguir basicamente os dois tipos cromossômicos que apresentaram os sítios de DNAr 5S e 45S.
- 5 Baseado no número de sítios e no tamanho e morfologia cromossômica, a dupla marcação DNAr 5S e 45S nos cromossomos de *Th. ponticum* parece ser restrita a apenas dois grupos de homeologia, provavelmente os grupos 1, 5 e/ou 6.
- 6 Todos ou quase todos os sítios Ag-RONs de *Th. ponticum* são ativados na intérfase.
- 7 A sonda pAs1 apresentou uma marcação dispersa ao longo dos cromossomos de *Th. ponticum*, com exceção das regiões centroméricas e da maioria das regiões pericentroméricas. Dessa forma, essa sonda pode ser usada para diferenciar os cromossomos de trigo, os quais ou não apresentam sinais ou apresentam marcas bem definidas.
- 8 A ordem relativa dos sítios de DNAr 5S e 45S juntamente com o padrão de hibridização das sondas pAs1 e pSc119.2 poderão ser utilizadas para a identificação de cromossomos inteiros ou de segmentos cromossômicos de *Th. ponticum* em linhas melhoradas de trigo × *Th. ponticum*.

- 9 A linhagem PF 839197 possui uma translocação envolvendo um braço cromossômico inteiro de centeio, do tipo 1BL.1RS.
- 10 Em cinco anfidiplóides parciais, as células apresentavam 42 cromossomos de trigo e 14 de *Th. ponticum*, sugerindo que esse seria o número cromossômico zigótico dessas linhagens, sendo a variação cromossômica numérica encontrada devida à instabilidade mitótica.
- 11 Nas células dos anfidiplóides parciais com $2n = 56$, o número de sítios de DNAr 5S e 45S bem como a sua posição relativa nos cromossomos sugerem que os 14 cromossomos de *Th. ponticum* aparentemente formam sete pares de bivalentes, que podem ser mantidos por autofecundação através de uma transmissão meiótica estável.
- 12 A instabilidade mitótica dessas linhagens, gerando um mosaico de células com número cromossômico diferente de 56, parece não afetar a formação dos gametas que vão formar a geração seguinte.
- 13 A presença de ca. 56 cromossomos na maioria dos acessos híbridos sugere que a estratégia de cruzamentos utilizada, sem um acompanhamento citológico, não permitiu selecionar exclusivamente os segmentos cromossômicos de interesse ao melhoramento de trigo.

Normas da Embrapa para publicação de trabalho

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A) PRAZOS

Até 15 DE JULHO: Entregar em disquete ou disponibilizar na rede a versão final do capítulo do livro a **Fátima De Marchi** com cópia para Sandra Brammer. No caso do autor principal ser funcionário da Embrapa Trigo, é **IMPRESINDÍVEL** enviar junto uma fotocópia da **aprovação do trabalho pelo Comitê Interno de Publicações**.

B) ELABORAÇÃO DO CAPÍTULO DO LIVRO

Tamanho: até 10 páginas incluindo texto, tabelas e ilustrações (gráficos, desenhos, fotografias, etc.)

Estrutura: o texto fica a critério dos autores

Primeira página deve constar: título, autor (es), texto e nota de rodapé constando a instituição dos autores e respectivo endereço

Aplicativo Word for windows

Configuração de página:

- Tamanho papel: Carta/Letter (21,59 x 27,94)
- margens:

<i>superior:</i> 5,9 cm	<i>esquerda:</i> 5,8 cm
<i>inferior:</i> 4,9 cm	<i>direita:</i> 4,9 cm

Fonte: Univers ou arial

Tamanho de letra:

- título: 16 (negrito)
- subtítulo (nome dos autores): 14 (alinhado à esquerda)
- texto: 12 (justificado)
- tabelas: 12 a 8 conforme volume de informações.

PADRONIZAÇÃO:

➤ Tabelas

- Título, sem negrito, deve ser precedido da palavra Tabela, numerada consecutivamente, com algarismo arábico, em negrito, na ordem de sua ocorrência no texto (não deve ultrapassar a largura da tabela; se for extenso e ocupar mais de uma linha, o texto deve ser justificado).
- Letras para indicação de significância estatística deverão ir após o valor (ex.: 2.523 A_{ba})

Ex.:

Tabela 1. Eficiência de irrigação, custo de aquisição e implantação, uso de energia e mão-de-obra em diferentes sistemas de irrigação.

- O título deve ser sintético, claro e conciso, seguido de ponto final. Deve constar o local de realização do experimento, quando for o caso, seguido da data.
- Os cabeçalhos em negrito, devem ser escritos no singular. Usar plural apenas quando não for possível singularizar. Grafar somente a primeira palavra com inicial maiúscula.
- Não usar traços horizontais e verticais no corpo da tabela nem fechar as laterais. Os fios horizontais só devem ser usados na base da tabela e, também, para separar o título do cabeçalho e o cabeçalho do corpo da tabela.
- Quando houver texto no corpo da tabela, deve-se encerrá-lo sem ponto.
- No corpo da tabela, nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia. A inexistência de dado numérico deve ser representada por hífen (-).
- Nas colunas de dados, as vírgulas decimais devem ficar alinhadas.
- A fonte de onde foram retirados os dados deve constar abaixo da tabela e após as notas.
- A citação bibliográfica na fonte deve obedecer às mesmas normas usadas para citação do texto.
- As fontes devem ser citadas com as demais referências bibliográficas.

➤ Figuras

- A legenda, sem negrito, deve ser precedida da palavra Fig. numerada consecutivamente, com algarismo arábico, em negrito, na ordem de sua ocorrência no texto, posicionada abaixo da figura.

Exemplo:

Fig. 1. Exemplo de legenda justificada posicionada abaixo da figura.

- Figuras já publicadas anteriormente devem conter dados sobre a fonte de onde foram extraídas.
- As fontes devem ser citadas com as demais referências bibliográficas.
- O crédito de autoria, ou seja, o nome completo do autor da foto ou do desenho, deve constar junto da figura.
- Apresentar sempre que possível na forma original ou seja foto: em papel fotográfico (caso não puder em 300 dpi); gráficos: além de inserido no texto enviar o arquivo no excel; desenho: no coreldraw 9.0 ou quando digitalizado em, no mínimo, 200 dpi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As Referências Bibliográficas devem ser normalizadas conforme ABNT (NBR 6023). Deve conter o nome de todos os autores e ser listados em ordem alfabética por sobrenome.

Citações no texto

Um autor: Minella (1999) ou (Minella, 1999)

Dois autores: Minella & Árias (2000) ou (Minella & Árias, 2000).

Três ou mais autores: Minella et al. (2001) ou (Minella et al. 2001).

Referência a trabalhos de mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidas no texto e na lista de referências por letras a, b, c ... (1995a, 1995b, 1995c).

Livro ou folheto

ÁRIAS, G. **Mejoramiento genético y producción de cebada cervecera en America del Sur**. Roma: FAO, 1995. 157 p.

Capítulo de livro

ÁRIAS, G. Selección de la cebada cervecera. In: ÁRIAS, G. **Mejoramiento genético y producción de cebada cervecera en America del Sur**. Roma: FAO, 1995. Cap.3, p. 31-71.

Boletim

COSTAMILAN, L. M. **Efetividade de genes de resistência de cevada a oídio em populações do Paraná e do Rio Grande do Sul, na safra 2000**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 24 p. (Embrapa Trigo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

Artigo de periódico

MINELLA, E.; ÁRIAS, G.; LINHARES, A. G.; SÓ E SILVA, M. Cevada BR 2: cultivar de cevada cervejeira resistente à mancha-reticular causada por *Pyrenophora teres*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2163-2168, nov. 1999.

Evento científico (anais - proceedings, resumos – abstracts)

REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA, 21., 2001, Guarapuava. **Anais e ata...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 2 v. Editado por Euclides Minella.

Trabalho em evento

MINELLA, E.; SÓ E SILVA, M.; ÁRIAS, G. Cultivar BRS 195 de cevada. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA, 21., 2001, Guarapuava. **Anais e ata...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. v. 1, p. 421-424.

Tese e dissertação

MINELLA, E. **Aluminum tolerance in barley**: inheritance, chromosome location, genetic relationship of sources of diverse origins, and breeding implications. 1989. 70 f. Thesis (Ph.D.) - Cornell University, Ithaca.

Normas da Revista Euphytica

Euphytica

International Journal of Plant Breeding
Editorial Office Euphytica
Kluwer Academic Publishers
P.O. Box 990
3300 AZ Dordrecht
The Netherlands

The author should retain a copy of the manuscript. Manuscripts should be typed double-spaced throughout on one side of DIN A4 paper (21 x 29 cm or 8.5 x 11 inch), with sufficiently wide margins (3-5 cm). All pages (including the tables, figures, legends and references) should be numbered consecutively.

The manuscript should be arranged in the following order (typed cap. + lower case):

Title page (page 1)

Title (the title should be as short as possible, but should contain adequate information regarding the contents).

Subtitle (this may be used to supplement and thereby shorten an excessively long main title).

Author's full name (if more than one, use '&' before the last name).

Affiliation(s)/Address(es).

Key words/Abstract/Abbreviations (page 2)

Key words (maximum of 6, in alphabetical order, suitable for indexing).

Abstract (brief and informative, not to exceed 250 words).

Abbreviations (arranged alphabetically, only those which are not familiar and/or commonly used).

Main text

The relative importance of headings and subheadings should be clear. The approximate location of figures and tables should be indicated in the margin. New paragraphs should be indicated by clear indentation.

The use of footnotes should be avoided. However, if essential, they should be typed on the appropriate pages, but clearly separated from the text with a line above them.

After the main text

Acknowledgements (also grants, support etc. if any) should follow the text and precede the references.

References

The literature references should be arranged alphabetically, typed double-spaced and in text referred to as:

author and year of publication, e.g.: (Dawson 1987). Citations of personal communications and unpublished data should be avoided, unless absolutely necessary. Such citations should in text appear only as: (E.D. Smith, personal communication), and not in the reference list.

Abbreviate titles of periodicals according to the style of the Bibliographic Guide for Editors and Authors (Biosis, Chemical Abstract Service and Engineering Index, Inc., 1974).

Follow the style shown below:

Periodicals

Dawson, W.O. & C. Boyd, 1987. TMV protein synthesis is not translationally regulated by heat shock. *Plant Molec Biol* 8: 145-149.

Books (edited by someone other than author of article)

Lefebvre, D.D. & J.-F. Laliberte, 1987. Mammalian metallothionein functions in plants. In: D.P.S. Verma (Ed.), *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 32-40. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Books (identical author and editor)

Bonga, J.M. & D.J. Durzan, 1987. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Tables

Each table should be typed on a separate page.

Tables should be numbered with arabic numerals, followed by the title. Horizontal rules should be indicated; vertical rules should not be used. Table-footnotes should be marked with superscript letters.

Each table should be mentioned in the text.

Tables may be edited by the publisher to permit more compact typesetting.

Figures

Each figure should be mentioned in the text.

Line drawings should be in a form suitable for reproduction without modification. Extremely small type should be avoided as figures are often reduced in size.

Photographs should be supplied as black-and-white, high-contrast glossy prints. Colour plates may be inserted at the author's own expense.

Figures as well as legends should be identified by arabic numbers. Where multi-part figures are used, each part should be clearly identified in the legend, preferably with (lower case) letters.

The top of the figure should be indicated on the back. Figures which need to be placed landscape should be avoided if possible.

Identify each illustration, on the back, by lightly writing author's name and figure number.

Nomenclature

Chemical and biochemical

Names of chemical compounds follow the Chemical Abstracts (Chemical Abstract Service, Ohio State University, Columbus) and its indexes.

Biochemical terminology, including abbreviations, and symbols, follows the recommendations of the SUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature.

Enzyme activity in units following the Enzyme Nomenclature (Academic Press, 1979).

For summaries of the abbreviations consult *Journal of Biological Chemistry*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* and the *Handbook of Biochemistry* (H.A. Sober, Chemical Rubber Company, Cleveland, latest edition).

Taxonomical

Binary nomenclature; names and genera and higher categories may be used alone.

Genetic

Applications of the terms phenotype and genotype should be in accordance with Demerec et al. (*Genetics* 54:61-74, 1966).

For summaries of the abbreviations, consult *Journal of Bacteriology*, Instructions to Authors.

Abbreviations and units

Only SI units and abbreviations should be used. Abbreviations should be explained when they first appear in the text. If a non-standard abbreviation is to be used extensively, it should be defined in full on page 2 as mentioned above. Whenever in doubt use SI (System International) units.

Format

1. We strongly prefer manuscripts typed on IBM-compatible computers, with operating system MS DOS (versions 3.2 or higher), and wordprocessing package WordPerfect (4.2 or higher).

2. We also accept files in most other wordprocessing packages, that run under MS DOS, and Apple Macintosh diskettes.

3. If this combination is not available to you, please contact us as soon as possible.

4. If you work with the Graphical User Interface Windows or on a Macintosh computer, use only regular fonts like Courier, Times, Helvetica or standard Symbol.

Do's

1. File. Identify your file clearly with a sensible name. Make absolutely sure that you send us your final version, and that the printout is identical to what you have saved on the diskette.

2. Consistency. Be absolutely consistent and check the use of punctuation, abbreviations, capitals and lower case in headings, spelling, etc. If possible, use the spelling checker on your computer.

3. Special characters. If the ASCII character set or the character set(s) of your wordprocessing package does not contain the special characters you need, key in a code between angle brackets

and use this each and every time you want the character to appear. Note: Always supply us with a list of the codes that you have used!

4.Headings. Start headings etc. flush left, with two space lines above (i.e. three Hard Returns) and one space line below (two Hard Returns). Distinguish different levels of headings and be consistent.

5.Paragraphs. Indent all paragraphs with a [TAB] code, and separate them from one another with one Hard Return.

6.Block quotations should be indented with an [Indent] code and should have one space line (i.e. two Hard Returns) above and below.

7.Figures should be submitted in camera-ready form. The position of the figure in the text should be indicated in the margins of the hard copy. Figure legends should be placed at the end of your file.

8.Tables. We prefer tables to be submitted in camera-ready form. If you also put your tables on diskette, please separate columns with [TAB] codes (not with spaces) and, consequently, adjust the tabular stops to position the columns.

9.Equations. One-line equations without fractions can be typeset from the diskette when they are keyed in as plain text. Other equations can not be used from the diskette: they will be typeset manually from the hard copy.

10.References and Notes. Strictly follow the Instructions for Authors of the journal in which the article will be published for the style of referencing and the use of notes.

Don'ts

1.Hyphenation. Do not hyphenate words at the end of a line. Use only one hyphen for words such as "well-being", and "re-do" and use two hyphens for sequences of dates and years such as "conference dates are 12--15 September, 1992", "age groups between 20--30 years are welcome", and page number indications in References, e.g. "pp. 240--243".

2.Hard Returns. Do not use Hard Returns except when absolutely necessary, such as at the end of paragraphs, headings, etc. Otherwise, let the word wrap feature of your wordprocessor do this work for you.

3.TAB feature and Spacebar. If you need more than one space between two items, e.g. when you write in columns, always use the [TAB] feature of your wordprocessing package. Use the spacebar only for separating words from one another. Do not use the spacebar to format tables, for centering or laying out texts, or for any other form of line or page formatting.

Delivering your article

1.Always supply us with both the hard-copy (printout) version of your final text and the diskette.

2.Label your diskette properly, giving exact details on operating system and software used.

3.Always retain a backup copy of your diskette.

Offprints

Fifty offprints of each article will be provided free of charge. An order form for additional offprints will be sent to the corresponding author. The corresponding author receives a copy of the issue containing her/his article free of charge.

Normas da Revista Genetics and Molecular Biology

Print ISSN 1415-4757

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope and policy

Submission of papers

Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (former the Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

No page charges are applied. For each paper 50 reprints will be supplied. No additional copies can be supplied. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The use of registered names and trademarks does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to:

Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:
 - a. A cover letter including statements that all authors approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or is not under consideration for publication elsewhere;
 - b. Three copies of the manuscript and figures.
 - c. Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
 - d. A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF. In windows platform. Images in GIF., TIFF., JPEG., Corel Draw or Excell formats should be sent in separate files. Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution. Manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names; the authors' institutional affiliation, including department, institution, and city, state or province, and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author alterations charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: citations with two authors must include both names. In citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. When citing personal communications or unpublished results, all contributors must be listed

by initials and last name ("et al" should not be used). Numbers: In the text numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; all authors up to the first six should be listed, followed by "et al" for seven or more; journal titles must be abbreviated according to Medline (link= <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>);

references should be referred to in the text by authors' surnames and date of publication.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Sample book citation:

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation

Basile R (1973) Cromossomos Politênicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhyncosciara*. *Ciênc e Cult* 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the Tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

f) Tables must each start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes, typed directly below the table, should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Three sets of illustrations of the highest quality must be provided, one original and two copies in glossy paper. If you have created figures electronically, submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author, and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2.(Submission package) Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.

i) Sequences may appear in text or in figure. DNA must be sequenced on both strands. DNA, RNA, or Protein sequences equal to or rather than 50 nucleotids must be entered into appropriate data bank and the accession number must be provided before publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full length articles. They should not be considered preliminary communications. Their format is that of full length article. The text must be kept to a minimum.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are published by invitation.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal.

4. Proofs: page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

© 2002 Sociedade Brasileira de Genética

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto SP - Brazil
Tel./Fax: (55 16) 621-8540

gmb.editor@sbg.org.br

Normas da Revista International Journal of Plant Sciences

Preparation of Manuscripts

International Journal of Plant Sciences invites papers in all areas of the plant sciences, including anatomy, development, ecology, evolution, genetics, host-pathogens interactions, molecular biology, mycology, paleobotany, phycology, and physiology. To be considered for publication, a manuscript must report unpublished original research not under consideration for publication elsewhere and is expected to present the results of a cohesive investigation. Manuscripts concerned with techniques or methods are acceptable only when accompanied by illustrative observations or quantitative data. The editors welcome manuscripts presenting evaluations and new perspectives on areas of current interest in plant biology. These manuscripts should follow the style of International Journal of Plant Sciences and are subject to both review and editing.

Submit three copies of the manuscript and a cover letter to M. Ruddat, IJPS, Erman Biology Center Room 2, 1101 E. 57th Street, Chicago, IL 60637, USA; telephone (773) 702-8292; fax (773) 702-9740; e-mail ijps@midway.uchicago.edu. Each copy of the manuscript should be complete, including copies of line figures and photographs of halftones.

Manuscripts that do not follow the International Journal of Plant Sciences style will be subject to further revision. Please consult the list of abbreviations and symbols that may be used without definition in IJPS. Manuscripts should be entirely double spaced and arranged in the following sequence:

Title Page Title; authors; affiliations; and a shortened title that does not exceed 55 characters (including names of authors) for use as a running head--all double spaced.

Abstract A concise summary of the paper, up to one double-spaced page.

Text All sections should be double spaced (i.e., 6 mm between lines); no proportional spacing; no right justification; no hyphenation at ends of lines; no italics (underscore only) or boldface.

Introduction The context for the investigation and the author's hypothesis.

Material and methods Sufficient information for replication of the results by a competent colleague.

Results Important results first; data in the form of tables and figures in numerical sequence; statistical analyses if necessary; Signs units. Please note that all literature citations and

interpretations belong in the Discussions and not in the Results. Please note also that figures and tables should be referred to parenthetically; e.g., avoid writing "Table 1 gives. . ." or "Figure 3 shows . . ."

Discussion The important results of the investigation and the pertinent literature.

Acknowledgment(s)

Literature cited Complete information, including publisher and city/country of publisher for articles cited in the Introduction, Material and Methods, and Discussion. Examples:

Journal article:

Platt-Aloia KM, WW Thomson, RE Young 1980 Ultrastructural changes in the walls of ripening avocados: transmission, scanning and freeze fracture microscopy. *Bot Gaz* 141:366-373.

Book chapter:

Evert RF, RJ Mierzwa 1986 Pathway(s) of assimilate movement from mesophyll cells to sieve tubes in the *Beta vulgaris* leaf. Pages 419-432 in J Cronshaw, RT Giaguinta, WJ Lucas, eds. *Plant biology*. Vol 1. Phloem transport. Liss, New York.

Book:

Berlyn GP, JP Miksche 1976 *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Iowa State University Press, Ames. 326 pp.

Monograph:

Fritts HC 1969 Bristlecone pine in the White Mountains of California. *Papers of the Laboratory of Tree-Ring Research*, no. 4. University of Arizona Press, Tucson.

Gentry HS 1972 The agave family in Sonora. *USDA Handbook* 399. Washington, D.C.

Thesis:

Anderson CD 1963 A study of the development of the maize mutant *Branched-Silkless (bd)*. PhD diss. Purdue University, West Lafayette, Ind.

Footnotes Typed double spaced on a separate page; numbered consecutively; one footnote should contain definitions of all abbreviations when abbreviations are numerous.

Tables Double spaced; numbered consecutively in accordance with their appearance in the text; related data or observations arranged in columns; include table title, headings, body of data, and notes numbered consecutively and keyed to specific parts of the table; each table presented on a separate page.

Figures Designed to fit the size of a page (17.5 x 23 cm, 6.75 x 9 inches) or column width (8.25 cm, 3.25 inches); letters and numerals must be large enough to accommodate reduction and be legible; photographs carefully cropped and evenly arranged in a plate to maximize space use; routing done by printer; figures numbered consecutively according to their appearance in text. *Plates should be numbered, and individual figures making up the plate should be referred to*

alphabetically. Graphs and figures should be professional quality and should not include typed entries.

Figures may be submitted electronically as .tiff or .eps files. Line art should have resolution of 800 dpi; photographs, 300 dpi. Color art must be submitted as CMYK .eps files, no preview, no color management. High-quality hard copy must accompany all electronic art submissions.

Figure legends Typed double spaced on a separate page; self-explanatory without reference to the text.

There is no fee for submitting a manuscript to *IJPS*. There are no page charges for publishing a manuscript in *IJPS*. Authors of especially long or heavily illustrated manuscripts may be asked to make a contribution toward the cost of publishing theory manuscripts; however, the contribution can be waived at the editors' discretion.

All manuscripts are reviewed by expert ad hoc reviewers. For most manuscripts, the results of the review and editorial decisions regarding publication will be available in 6 weeks. Manuscripts that are accepted pending revision are accompanied by a separate checklist that explains needed revision; manuscripts should be revised in 4 weeks.

Color reproduction Questions on procedures and costs should be directed to the *IJPS* office.

Cover photos are chosen by the editors from the contents of the issue; authors are invited to submit a figure or diagram for consideration when the manuscript is submitted.