



**LAIANE CORSINI ROCHA**

**“Sítios frágeis” espontâneos e induzidos nos  
cromossomos de espécies do complexo *Lolium-  
Festuca***

**LAVRAS-MG**

**2015**

**LAIANE CORSINI ROCHA**

**“Sítios frágeis” espontâneos e induzidos nos cromossomos de espécies do  
complexo *Lolium-Festuca***

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

Orientadora

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

Co-orientadora

Dra. Andréa Mittelman

**LAVRAS-MG**

**2015**

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

Rocha, Laiane Corsini.

“Sítios frágeis” espontâneos e induzidos nos cromossomos de  
espécies do complexo *Lolium-Festuca* / Laiane Corsini Rocha. –  
Lavras : UFLA, 2015.

86 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. rDNA 45S. 2. Gramíneas forrageiras. 3. Estabilidade  
genômica. 4. Quebras cromossômicas. 5. Raio-X. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

**LAIANE CORSINI ROCHA**

**“Sítios frágeis” espontâneos e induzidos nos cromossomos de espécies do  
complexo *Lolium-Festuca***

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

APROVADA em 18 de Agosto de 2015.

Prof. Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira	UFLA
Profa. Dra. Giovana Augusta Torres	UFLA
Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos	UFJF

Orientador

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

Co-orientador

Dra. Andrea Mittelmann

**LAVRAS-MG**

**2015**

*Aos carríssimos orientadores: Vânia e Andreas*

OFEREÇO

*Aos meus amados pais, Maria e Luiz, que me criaram e me  
preparam para a vida com tanto amor e dedicação, sendo para mim os  
maiores exemplos de vida, de esforço.*

*Ao meu companheiro Luiz Carlos que há doze anos me acompanha,  
me traz alegrias e não mede esforços para me ajudar no que quer que seja.*

*Ao meu irmão Marcelo e minha cunhada Alessandra que me deram  
dois anjos, Giovana e Luiz Felipe, que tornam os meus dias mais suaves e  
divertidos.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida para realização desse trabalho.

Ao CNPq e a Capes, pela concessão das bolsas de estudos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Vânia Helena Techio, pela dedicação, por confiar em mim e no meu trabalho e abrir as portas de uma parte da minha vida que jamais pensei que iria viver, meu intercâmbio. Isso me fez crescer profissionalmente e pessoalmente. Serei grata eternamente. Você tem sido mais do que minha orientadora.

Às minhas meninas, Raphaela, Gabrielle e Isabela, minhas fiéis escudeiras. Por toda dedicação ao trabalho e também pela amizade.

À minha homóloga, minha amiga Fernandinha, pela parceria, pela força e dedicação.

Aos Professores Lisete, Giovana, Larissa e Welison e também as pós-doutorandas Roselaine e Kátia, pelas contribuições, por todo o conhecimento compartilhado e pela gentileza de sempre.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos.

A todas (os) as (os) amigas (os) do Laboratório de Citogenética da UFLA pelo convívio harmonioso, pelo apoio em todos os momentos dessa jornada. Aqui, agradeço em especial à Raquel e Natália, por toda troca de experiência, pela ajuda e pela sincera amizade.

À banca, por ter aceito o convite e pelas valiosas contribuições.

À Embrapa Gado de Leite/Clima Temperado, especialmente a co-orientadora Andréa Mittelman, pelas valiosas contribuições, pela oportunidade de bolsa sanduíche e por ter concedido material genético para a realização deste trabalho.

Ao IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) e ao grupo de pesquisa “Chromosome structure and function”,

pela oportunidade de desenvolver minhas pesquisas, pela excelente recepção, contribuições e pelo convívio. Em especial agradeço as queridas Katrin e Oda, que foram verdadeiros anjos no meu caminho. Também agradeço à Maja e Jörg, por toda ajuda com as pesquisas e pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Ao Andreas, meu orientador na Alemanha, uma pessoa incrível, centrada, mas também muito divertida. Agradeço por toda paciência, atenção e pelos ensinamentos.

Aos queridos amigos brasileiros que fiz na Alemanha, Tiago e André, pela amizade e pela ajuda no laboratório e Ana e Ricardo, por todo apoio, passeios e maravilhosos almoços.

À Gaby, por dividir comigo alguns meses na Alemanha. Pelas viagens, almoços, jantares, dias no laboratório, enfim por toda a parceria.

Aos meus amigos da Botânica, em especial Raquel, Nayara, Márcio, João Paulo, Marinês, Jean Marcel por tornarem os almoços e os finais de semana mais alegres.

Aos meus pais Luiz e Maria, pela dedicação, pelos conselhos, pelo incentivo e pelo amor incondicional.

Ao meu companheiro Luiz Carlos, por toda dedicação, apoio, paciência, otimismo, alegria, amizade e amor. Eu te amo muito!

E a todos que contribuíram de alguma forma, para a realização de mais uma etapa da minha vida.

Enfim, agradeço à vida. Pelos caminhos traçados pelo acaso, que me permitiram conhecer lugares e pessoas maravilhosas e também a lidar com as frustrações e os medos.

“Saia da sua zona de conforto: a vida é bem mais interessante do que você imagina! Quem leva uma vida certinha, segura e previsível nunca poderá saber se é uma pessoa extraordinária e espetacular! Em algum lugar alguma coisa fará você passar por um teste para o qual não estava preparado e que não gostaria de enfrentar. A vida é assim e não tem como optar somente pela calma. Na turbulência pode estar uma nova razão de viver!”

*Autor desconhecido*

## RESUMO

Os sítios frágeis são considerados regiões fracas do genoma e podem ser propensos a sofrer lesões ou quebras cromossômicas sendo relacionados à instabilidade no genoma de humanos, outros mamíferos, peixe e leveduras. Em plantas, esses sítios têm sido descritos em algumas espécies de gramíneas como por exemplo no gênero *Lolium*, ocorrendo nos sítios de rDNA 45S. Contudo, as consequências dos sítios frágeis para o genoma de plantas ainda não são bem conhecidas. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar a estabilidade do genoma das espécies do complexo *Lolium-Festuca* com expressão espontânea de SFs e mediante a indução de quebras cromossômicas por irradiação ionizante e verificar se o genoma se recupera dessas quebras induzidas através da síntese de novos telômeros. Para verificar se havia instabilidade foram analisados o ciclo celular, a quantidade de DNA por citometria de fluxo, a formação de novos centrômeros através de imunolocalização e a existência de fibras de cromatina conectando o cromossomo e o fragmento através do uso da técnica de YOYO e FISH com sondas de rDNA 45S na espécies do complexo *Lolium-Festuca*. Para verificar as quebras cromossômicas induzidas por raio-X foi utilizada a técnica de FISH com sondas de rDNA 45S e telomérica e quantificadas as anormalidades cromossômicas. Os resultados mostraram que as regiões fragilizadas nos sítios de rDNA 45S não apresentam atividade neocentromérica apresentam fibras de cromatina finas e longas, não visíveis com coloração DAPI, conectando os fragmentos acêntricos aos cromossomos de origem, não promovendo a instabilidade no genoma dessas espécies. O mesmo foi observado para a espécie de *F. arundinaceae* híbridos *Festulolium*. Os sítios frágeis não representam regiões propícias à quebras após a irradiação com raio-X e não foi detectada a formação de novos telômeros durante o período de avaliação das c-metáfases.

Palavras-chave: rDNA 45S. Gramíneas forrageiras. Estabilidade genômica. Quebras cromossômicas. Raio-X.

## ABSTRACT

The fragile sites (FSs) are considered weak regions of the genome and may be prone to form lesions or chromosomal breaks in addition to being related to instability in the human genome, other animals, fish, and yeast. In plants, these sites have been described in some species of grasses such as the genus *Lolium*, taking place in the sites of 45S rDNA. However, the consequences of fragile sites in the genome of plants are not well-known. Thus, the aims of this study were to evaluate if there is instability in the genome of species of *Lolium-Festuca* complex with spontaneous expression of FSs and through the induction of chromosomal breaks by ionizing radiation and also to check if the genome is recovering from these induced breaks through the synthesis of new telomere. The results showed that the weakened regions in 45S rDNA sites does not present neocentromeric activity, but showed thin and long chromatin fibers, not visible with DAPI staining, connecting the acentric chromosome fragments to chromosome region containing the centromere, not promoting instability in the genome of these species. The same was observed for the species of *F. arundinaceae* Festulolium hybrids. Fragile sites are not regions prone to breaks after irradiation with X-ray and there was no formation of new telomeres during the evaluation of c-metaphase.

Keywords: 45S rDNA. Forage grasses. Genomic stability. *Lolium-Festuca* complex. Chromosome breakage. X-ray

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1 Importância agronômica e melhoramento do complexo <i>Lolium-Festuca</i></b> .....	12
<b>2.2 Características citogenéticas gerais de <i>Lolium</i> e <i>Festuca</i></b> .....	15
<b>2.3 Bases moleculares e epigenéticas dos sítios frágeis</b> .....	17
<b>2.4 Sítios frágeis em <i>Lolium</i></b> .....	22
<b>2.5 Genes ribossomais x instabilidade genômica</b> .....	27
<b>2.6. Quebras cromossômicas espontâneas e induzidas e seus mecanismos de reparo</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>SEGUNDA PARTE: ARTIGOS</b> .....	43
<b>ARTIGO 1 - Decondensation of chromosomal 45S rDNA sites in <i>Lolium</i> and <i>Festuca</i> genotypes does not result in karyotype instability</b> .....	43
<b>ARTIGO 2 - Sítios frágeis rDNA 45S de <i>Lolium multiflorum</i> não constituem <i>hotspots</i> para quebras cromossômicas induzidas por raio-X</b> .....	65

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Em *Lolium multiflorum* Lam. e *Lolium perenne* L., os sítios de rDNA 45S apresentam um comportamento peculiar devido à expressão de sítios frágeis (SFs), os quais são caracterizados como regiões cromossômicas propícias a formação de lesões ou quebras cromossômicas. Em humanos, os SFs são bem estudados e ocorrem de forma espontânea ou induzida promovendo a formação de lesões ou quebras em diferentes regiões do cromossomo, sem relatos para os sítios de rDNA, sendo alguns desses relacionados à doenças como o câncer (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001; YUDKIN et al., 2014).

Os SFs em *L. multiflorum* e *L. perenne* ocorrem em posições aleatórias dentro dos sítios de rDNA 45S e entre os cromossomos que possuem estes sítios, gerando sinais FISH 45S variáveis em tamanho e número, que estão comumente associados à quebras cromossômicas e geração de fragmentos nessas espécies (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2008, 2009; ROCHA et al., 2015). Quebras na dupla fita de DNA (QDFs) podem levar à ruptura dos cromossomos resultando em rearranjos cromossômicos e na perda de DNA devido à eliminação de fragmentos, o que pode representar risco à estabilidade do genoma (GOSPODINOV; HERCEG, 2013).

O uso de bandamento Ag-NOR mostrou que os sítios de rDNA 45S de *Lolium* lesionados ou quebrados, devido a fragilidade, apresentam uma ou as duas partes com atividade transcricional, mas relataram que, de forma geral, os sítios de rDNA 45S fragilizados são ativos transcricionalmente (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2012; ROCHA et al., 2015).

A co-localização dos SFs com o sítio de rDNA 45S também foi relatada em milho transgênico e em *Phleum echinatum* Host. uma gramínea do Mediterrâneo (GRABOWSKA-JOACHIMIAK et al., 2015). Waminal et al. (2013) atribuiu a expressão de SFs em milho transgênico ao evento da transgenia e observou que eles são herdáveis em cruzamentos com milho normal. Neste mesmo estudo, os autores relataram que os SFs 45S em *Phleum echinatum* estão envolvidos com rearranjos cromossômicos que propiciaram a diferenciação cariotípica dessa espécie dentro do gênero *Phleum*. Assim, essa fragilidade constitui um mecanismo potencial de especiação, pois os SFs são considerados como regiões fracas do genoma e susceptíveis à quebras e a rearranjos cromossômicos (BROWN; O'NEILL, 2010; DURKIN; GLOVER, 2007; RUIZ-HERRERA; ROBINSON, 2007).

No entanto, a formação de fragmentos cromossômicos resultantes de quebras na dupla fita de DNA também pode resultar na instabilidade do genoma, devido a perda de informação genética ou gerar rearranjos potencialmente desfavoráveis (AGUILERA; GARCIA-MUSE, 2013).

Nesse contexto, a fragilidade desses sítios necessita ser melhor estudada, visando entender os seus mecanismos de expressão e as consequências da sua ocorrência no genoma. Para *L. multiflorum* e *L. perenne*, as causas e efeitos dos SFs no rDNA 45S sobre a estabilidade do genoma ainda são pouco conhecidas. As plantas dessas espécies, mesmo possuindo expressão dos SFs, apresentam desenvolvimento normal e altas taxas de fertilidade (BUSTAMANTE et al., 2014; NUNES et al., 2012; ROCHA et al., 2015). Outro aspecto interessante a ser investigado é se os SFs ocorrem em espécies próximas como *Festuca* (POLOK, 2007) e na combinação entre essas espécies, no híbrido *Festulolium* (HUMPHREYS, 2004; KOPECKÝ; LUKASZEWSKI; DOLEZEL, 2008).

Como os SFs 45S são considerados regiões fracas do genoma, acredita-se que constituam *hotspots* para a formação de fragmentos cromossômicos quando submetidos a indução de quebras no DNA. Uma

possível forma de compreender se há envolvimento entre esses sítios e a ocorrência de quebras cromossômicas consiste na indução de quebras por meio de irradiação ionizante. Essa técnica permite, ainda, observar se os mecanismos de reparo de quebras atuam de forma eficiente e como o genoma se recupera ao longo do tempo (BERARDINELLI et al., 2013; FRIEBE et al., 2001; LAVELLE; FORAY, 2014; SLIJEPCEVIC; BRYANT, 1998).

O objetivo desse trabalho foi, portanto, avaliar a estabilidade do genoma das espécies do complexo *Lolium-Festuca* com expressão espontânea de SFs e mediante a indução de quebras cromossômicas por irradiação ionizante.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância agronômica e melhoramento do complexo *Lolium-Festuca***

O gênero *Lolium* L. (família Poaceae Barnhart., Tribo Poeae Brown.), é composto de gramíneas forrageiras nativas da bacia do Mediterrâneo (Europa, Ásia Temperada e Norte da África). Essas gramíneas se dispersaram para o norte da Europa, América do Norte e, posteriormente, a maioria das espécies alcançou todas as regiões temperadas do mundo (TERREL, 1968).

As espécies *Lolium perenne* ( $2n=2x=14$ ) e *Lolium multiflorum* ( $2n=2x=14$ ), também chamados de azevéns, são utilizadas como gramíneas forrageiras em muitas regiões de clima frio, sendo a base alimentar de ruminantes por serem altamente nutritivas, se estabelecerem rapidamente, apresentarem longo período vegetativo (HANNAWAY et al., 2014; POLOK, 2007). O alto teor de proteína bruta disponível durante o período vegetativo possibilita que ambas as espécies sejam utilizadas como alimento

alternativo na bovinocultura, garantindo a autossuficiência e a sustentabilidade do agronegócio em regiões que sofrem com a estacionalidade de suas forrageiras nativas em várias partes do mundo (YAMADA et al., 2005).

O gênero *Festuca* L. (família Poaceae Barnhart., Tribo Poaeae Brown.) compreende cerca de 100 espécies de ampla distribuição geográfica envolvendo a Europa, África do Norte-Oeste e regiões temperadas da Ásia (MALIK; THOMAS, 1966).Dentre as espécies deste gênero, *Festuca arundinacea* ( $2n=6x=42$ ) e *Festuca pratensis* ( $2n=2x=14$ ) são uma das mais importantes e foram introduzidas na América do Norte onde são cultivadas comercialmente (CERNOCH; NAŠINEC; ŠRAMEK, 2003; KOPECKÝ; LUKASZEWSKI; DOLEZEL, 2008).Embora *Festuca* seja proximamente aparentado ao *Lolium*,suas plantas apresentam menor valor nutritivo e digestibilidade. No entanto, as espécies de *Festuca* são melhor adaptadas e tolerantes a estresses abióticos, apresentando tolerância à seca por possuírem raízes profundas e ao congelamento durante o rigoroso inverno das regiões temperadas,proporcionando uma maior tolerância às variações climáticas do que as espécies de *Lolium* (HUMPHREYS, 2004; JAUHAR, 1993).

Mundialmente, o melhoramento genético envolvendo as espécies de *Lolium* nas últimas décadas direcionou seus esforços para a obtenção de híbridos intergenéricos pelo cruzamento com espécies de *Festuca*, buscando desenvolver genótipos resistentes ao estresse abiótico causado pelo congelamento e a seca no período de inverno intenso em países do hemisfério norte (HUMPHREYS, 2004; KOSMALA et al., 2007). Os híbridos interespecíficos resultantes do cruzamento de espécies de *Festuca* e *Lolium*, denominados *Festulolium*,possuem muitas características complementares e apresentam bom desempenho agrônômico e valor adaptativo considerável no melhoramento de gramíneas forrageiras (KOPECKÝ et al., 2006). Atualmente, praticamente todas as pesquisas são

realizadas com o intuito de entender a combinação dos dois gêneros e aprimorar os ganhos genéticos com *Festulolium*.

Os melhoristas de plantas têm reconhecido as vantagens em combinar características como o rápido estabelecimento, a boa produção, a boa aceitação animal e a alta digestibilidade das espécies de *Lolium* com a persistência e a tolerância a baixos níveis de nutrientes e estresses abióticos como frio e seca, relatada para as espécies de *Festuca* (BREESE; LEWIS; EVANS, 1981; KLEIJER, 1984; THOMAS; MORGAN; HUMPHREYS, 2003).

As primeiras cultivares de *Festulolium* foram desenvolvidas no Institute of Grassland and Environmental Research (IGER), Aberystwyth, Reino Unido, há mais de 30 anos. Tratam-se de híbridos resultantes dos cruzamentos de *L. perenne* x *F. pratensis* (cultivar Prior) e *L. multiflorum* x *F. pratensis* (cultivar Elmet). Devido ao sucesso obtido após o lançamento dessas cultivares, subsequentemente foram desenvolvidas outras cultivares de *Festulolium* em todo mundo, principalmente na Europa Central (FOJTÍK, 1994).

As espécies dos gêneros *Lolium* e *Festuca* hibridizam na natureza, mas alguns dos seus híbridos são estéreis devido ao pareamento cromossômico irregular na meiose e diferente ploidia dos pais, que resulta em produtos meióticos estéreis. Da mesma forma, apenas plantas estéreis são produzidas experimentalmente após o cruzamento de espécies diploides de *Lolium* e *Festuca* (JAUHAR, 1975). Essa limitação pode ser contornada por meio da duplicação cromossômica utilizando-se, por exemplo, bloqueadores mitóticos.

A facilidade em produzir híbridos intergenéricos entre *Festuca* e *Lolium* e o sucesso comercial das cultivares *Festulolium* estimularam as pesquisas relacionadas à estrutura e comportamento dos genomas envolvidos. Estudos neste sentido foram possíveis devido ao progresso da citogenética molecular, capaz de identificar os genomas parentais nos

híbridos e seu comportamento, incluindo pareamento meiótico, recombinação, eliminação e identificação de cada cromossomo (KOPECKÝ; LUKASZEWSKI; DOLEZEL, 2008).

## 2.2 Características citogenéticas gerais de *Lolium* e *Festuca*

O gênero *Lolium* é constituído por oito espécies diploides com  $2n=2x=14$  e algumas cultivares poliploides obtidas pela indução da duplicação cromossômica (POLOK, 2007). As espécies do gênero *Lolium* são distribuídas em duas seções estabelecidas de acordo com o modo de reprodução (TERREL, 1968). A primeira seção inclui quatro espécies autógamas (*L. loliaceum*, *L. persicum*, *L. remotum* e *L. temulentum*) e a segunda é composta por três espécies alógamas (*L. perenne*, *L. rigidum* e *L. multiflorum*) (BENNETT; HAYWARD; MARSHALL, 2002; INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2012; JENKIN, 1959; LOSS, 1993). A exceção é *L. canariense*, endêmica das Ilhas Canárias, que apresenta modo de reprodução intermediário (POLOK, 2007).

*Festuca* é um gênero grande e diverso, compreendendo aproximadamente 450 espécies (CLAYTON; RENVOIZE, 1986; WATSON; DALLWITZ, 1992) divididas em nove subgêneros: *Hesperochloa*, *Xanthochloa*, *Drymanthele*, *Schedonorus*, *Subulatae*, *Subuliflorae*, *Obtusae*, *Festuca* e *Helleria* (CLAYTON; RENVOIZE, 1986). O nível de ploidia em *Festuca* varia de diploide com  $2n=2x=14$  (*F. pratensis*, por exemplo), tetraploides com  $2n=4x=28$  (*F. glausensis*), hexaploides com  $2n=6x=42$  (*F. arundinacea*), octaploides com  $2n=8x=56$  (*F. arundinacea* var. *atlantigena*), decaploides com  $2n=10x=70$  (*F. arundinacea* var. *letourneuxiana*) até dodecaploides com  $2n=12x=84$  (*F. summilusitana*) (KOPECKÝ; LUKASZEWSKI; DOLEZEL, 2008).

Malik e Thomas (1966) estão entre os primeiros autores a descrever o cariótipo de *Lolium* e *Festuca*. Em *Lolium*, incluindo *L. multiflorum* e *L.*

*perenne*, os autores identificaram três pares de cromossomos submetacêntricos com constrições secundárias (regiões organizadoras do nucléolo, RONS) localizadas próximas às regiões teloméricas, um grande par metacêntrico e três pares menores submetacêntricos (MALIK; THOMAS, 1966). Thomas et al. (1996) confirmaram a presença de RONS nos três pares cromossômicos de *L. multiflorum* após hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com a sonda de rDNA 45S. Esses autores também detectaram um sétimo sinal de rDNA 45S em *L. perenne*. Esse sítio é co-localizado com a banda C posicionado na região proximal do braço longo do cromossomo 5 (THOMAS, 1981; THOMAS et al., 1996).

Diferentemente da similaridade cariotípica descrita para várias espécies de *Lolium*, as espécies de *Festuca* apresentam maior variação cariotípica. A análise do cariótipo de 12 espécies desse gênero após coloração com orceína, identificou quatro pares de cromossomos com constrições secundárias em *F. pratensis* e seis pares em *F. glaucescens* (MALIK; THOMAS, 1966). Entretanto, número diferentes de sítios de rDNA 45S foram detectados com FISH nestas e outras espécies de *Festuca*. Segundo Thomas et al. (1997) *F. pratensis* possui dois pares de sítios 18s-5.8s-26s, *F. glaucescens* três pares, *F. mairei* quatro sítios em cromossomos B e *F. arundinacea* e *F. gigantea* possuem 2 pares.

Para *Lolium*, Carnide e Orellana (1986) e Carnide, Orellana e Ribeiro (1986) observaram seis bandas Ag-NOR intersticiais e demonstraram, por meio de coloração com nitrato de prata, a natureza das constrições secundárias como organizadores nucleolares funcionalmente ativos.

Os cromossomos mitóticos de espécies de *Lolium* e *Festuca* são similares em tamanho, sendo que no híbrido resultante do cruzamento entre esses gêneros não é possível distinguir facilmente os cromossomos parentais usando técnicas de coloração convencionais. Em estudo realizado por Schifino e Winge (1983) com *L. multiflorum* foi observada a presença de satélite no segundo par cromossômico e o comprimento total do

complemento atingiu 27,21 $\mu$ m. Mais recentemente, Kopecký et al. (2010) avaliaram a cv. Prolog de *L. multiflorum* e observaram que o comprimento dos cromossomos variou de 3,37 $\mu$ m para o cromossomo 1 a 5,33 $\mu$ m para o cromossomo 4, sendo que o comprimento total do lote haploide foi de 30,62 $\mu$ m. Em *L. perenne* o comprimento do lote haploide foi de 28,12 $\mu$ m, no qual o maior cromossomo contribui com 4,93 $\mu$ m e o menor com 3,24 $\mu$ m. O conjunto cromossômico dessa espécie é composto por cinco cromossomos metacêntricos e dois submetacêntricos (ROCHA et al., 2015).

A similaridade no tamanho dos cromossomos dos dois gêneros estudados corresponde à similaridade na quantidade de DNA nuclear. Por meio da citometria de fluxo foi verificada que a quantidade média de DNA nuclear para as cultivares diploides de *L. multiflorum*, *L. perenne* e *F. pratensis* é de 5,25pg, 5,36pg e 6,49pg, respectivamente, e para as cultivares tetraploides dessas espécies, é de 10,99pg, 11,19pg e 13,01pg, respectivamente (KOPECKÝ et al., 2010).

### **2.3 Bases moleculares e epigenéticas dos sítios frágeis**

Os SFs são regiões cromossômicas propensas a sofrer estreitamento ou constrição e formar lesões ou mesmo quebras em uma ou em ambas as cromátides, fenômeno amplamente relatado em cromossomos humanos e resultando em inibição no processo replicativo ou transcricional (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001).

O termo sítio frágil foi cunhado em 1970 com a descoberta de recorrente quebras no braço longo do cromossomo 16 em humanos relacionado com a inativação do gene FMR-1 que resulta em retardo mental. Essa descoberta acidental abriu portas para análises generalizadas dos SFs e com isso, mais de 100 sítios foram identificados em cromossomos humanos até a primeira década do século XXI. Os SFs normalmente são estáveis em culturas de células, porém formam lesões e quebras em cromossomos

metafásicos sob certas condições de cultivo ou induzidos com agentes químicos específicos (DURKIN; GLOVER, 2007).

Em humanos, os sítios frágeis são classificados como raros ou comuns, dependendo de sua ocorrência na população e modo de indução (GLOVER, 2006; HUEBNER; CROCE, 2001).

Os sítios raros estão presentes em menos de 2,5% da população humana e são resultantes de mutações que levam a expansões e instabilidade de micro ou mini-satélites ricos em A-T (DURKIN; GLOVER, 2007; GLOVER, 2006; HUEBNER; CROCE, 2001). A base molecular de sítios frágeis raros está associada também com repetições expandidas CGG capazes de adotar estruturas incomuns de DNA B que podem perturbar a replicação do DNA (SAMADASHWILY; RACA; MIRKIN, 1997; USDIN; WOODFORD, 1995) e a maioria destes sítios é induzida por deficiência de folato (WANG; GRIFFITH, 1996).

Diferente dos sítios raros, os sítios comuns (CFS) são vistos em todos os seres humanos e são geralmente estáveis em células somáticas (GLOVER, 2006; HUEBNER; CROCE, 2001). Os sítios frágeis comuns são encontrados em todos os indivíduos da população (DURKIN; GLOVER, 2007) e são conservados entre as espécies (GLOVER et al., 1998; RUIZ-HERRERA et al., 2004). CFS podem ser induzidos por estresse durante a replicação do DNA, tais como tratamentos com anficolina (APH), um inibidor de polimerase alfa, delta e épsilon (YUNIS; SORENG; BOWE, 1987). Dessa forma, os CFS são considerados os sítios mais sensíveis ao estresse replicativo no genoma (DEBATISSE; EL ACHKAR; DUTRILLAUX, 2006; DURKIN; GLOVER, 2007). Os CFS são regiões ricas em dinucleotídeos A-T com co-ocorrência em genes com grande número de sequências, apresentam replicação tardia ou incompleta, baixa densidade de origens de replicação e sequências propensas a formar as estruturas secundárias, também chamadas de lesões ou gaps, histonas hipocetiladas e cromatina condensada (HELMRICH; BALLARINO;

TORA, 2011;JIANG et al., 2009; LETESSIER et al., 2011;OZERI-GALAI et al., 2011; SCHWARTZ; ZLOTORYNSKI; KEREM, 2006;SMITH et al., 2006). A maioria dos CFS são locais de rearranjos e de integração de DNA exógeno(SCHWARTZ; ZLOTORYNSKI; KEREM, 2006).

Recentemente Barlow et al. (2013) descreveram uma nova classe de sítios frágeis que foram denominados EFRS (Sítios frágeis de replicação precoce). Os EFRS estão relacionados ao linfoma de células B e outros tipos de cânceres, tendo como particularidade a alteração no número de cópias. Esses são contrastantes aos sítios frágeis comuns (CFS), pois apresentam replicação precoce, configuração de cromatina aberta, sequências ricas em dinucleotídeos C-G, maior densidade de origens de replicação e estão relacionados a clusters de genes e regiões com alta atividade transcricional, sendo esse um dos fatores que contribuem para a formação de quebras nos sítios.

Apesar de contrastantes, CFS e EFRS são responsivos ao estresse replicativo através da inibição de proteínas do complexo ATR, estresse oncogênico e deficiência na recombinação homóloga (BARLOW et al., 2013).

Existem algumas hipóteses para explicar as causas que levam à expressão dos sítios frágeis em humanos, como as metilações no DNA, metilação e acetilação de histonas e ou possíveis falhas nos mecanismo de reparo durante a replicação do DNA (COFFEE et al., 2002; WANG, 2006).

A estagnação da replicação pode levar ao colapso no garfo de replicação e resultar na formação de DNA com quebras em duplas fitas (DSBs) (LUNDIN et al., 2002; SAINTIGNY et al., 2001) sendo um dos eventos mais comprometedores à integridade do genoma. Falhas no reparo de DSBs poderiam levar à morte celular ou a rearranjos cromossômicos (KHANNA; JACKSON, 2001). Dessa forma, redes complexas de resposta aos danos para detectar e reparar lesões de síntese evoluíram nos organismos. A presença de DSBs é reconhecida por sensores que

transmitem o sinal para uma série de efetores a jusante e ativam uma cascata de reações e induzem o reparo do DNA (JACKSON, 2002; KHANNA; JACKSON, 2001).

O estresse replicativo leva a formação de focos para Rad51 e quebra na dupla fita do DNA através de duas vias de reparo que atuam ligando as extremidades do DNA, a recombinação homóloga (HR) ou recombinação não homóloga (NHR). Essas vias são essenciais para estabilidade cromossômica em locais de síntese e estabilidade dos sítios fragilizados (JACKSON, 2002).

Debatisse, El Achkar e Dutrillaux (2006) induziram a expressão de sítios em cromossomos humanos com anficolina (APH) e observaram que a grande maioria dos CFS estão na interface entre bandas G e R, que se replicam em diferentes momentos ou mais lentamente durante a fase S. Segundo Zlotorynski et al. (2003) as sequências flexíveis são compostas de interrompidas sequências de dinucleotídeos AT que têm o potencial para formar estruturas secundárias e, portanto, podem afetar a replicação tanto em sítios raros como comuns. Essas sequências também são semelhantes aos minissatélites que fundamentam a fragilidade dos locais frágeis raros FRA16B e FRA10B.

A replicação diferencial nessas regiões de interface entre bandas G e R resulta em uma condensação diferencial nos cromossomos formando as lesões, onde também pode haver uma depleção de coesinas (DEBATISSE; EL ACHKAR; DUTRILLAUX, 2006). A depleção da coesina SMC1 em sítios instáveis FRA3B foi relatada por Musio et al. (2005) e segundo Kobayashi (2011) a presença de coesinas é importante para permitir o reparo de quebras no DNA, pois sua presença impede uma separação prematura das cromátides irmãs, permitindo que ocorra a recombinação entre as próprias cromátides irmãs ou não irmãs religando as extremidades quebradas.

Segundo El Achkar et al. (2005) a cromatina dos CFS pode ser a última região cromossômica a se condensar. Assim, até que se conclua a

replicação, essas regiões fragilizadas permanecem incompetentes para que ocorra a condensação impedindo a célula de entrar em mitose (DEBATISSE; EL ACHKAR; DUTRILLAUX, 2006). Dessa forma, a atuação de checkpoints é crucial para manter a estabilidade dos sítios fragilizados (GLOVER et al., 2005). Na expressão de sítios frágeis comuns (CFS) além da descrição de falhas/retardos no processo replicativo ocorrem falhas no sistema ATR que repara os danos antes que a célula avance para a mitose (CASPER et al., 2002).

Em humanos, uma das causas da fragilidade está ligada à presença de longas sequências repetidas de trinucleotídeos CCG que impedem o empacotamento correto do DNA, dificultando o enovelamento dos nucleossomos (WANG; GRIFFITH, 1996). Em muitos casos, a expressão do X frágil em humanos está diretamente ligada ao tamanho das repetições CCG e ao grau de metilação em ilhas CpG (JONES et al., 1995). Vários sítios frágeis sensíveis a folato são causados por uma expansão e subsequente metilação de sequências repetitivas CGG (SARAFIDOU et al., 2004).

Chan et al. (2009) realizaram um estudo com fibroblastos tratados com anficolina e observaram que no ponto onde houve a paralisação da replicação se formaram pontes ultrafinas na anáfase (UFBs). Em ambas as extremidades dessas pontes haviam marcas de FANDC2, uma proteína responsável por reparar o DNA danificado e, nas fibras de DNA que formavam a ponte eles verificaram que ainda estava ocorrendo o processo replicativo, fato evidenciado pela presença de helicases.

Nesse mesmo estudo foi evidenciada a co-localização de marcas FANDC2, proteínas de reparo do DNA, com sítios de rDNA 45S desde a prometáfase até a anáfase tardia de fibroblastos, o que mostrou que o mecanismo de reparo encontram-se ativo mesmo durante a segregação. O interessante é que apenas 10% das marcas FANDC2 vistas na metáfase estavam presentes na anáfase, o que ocorreu até mesmo nas células do

tratamento controle. Isso sugere que o recrutando FANCD2 é eficiente para reparar a estrutura do DNA durante as fases iniciais da divisão celular ou logo após o início da anáfase. Assim, a presença de reparo durante a divisão celular poderia ser um potencial mecanismo de reparo que permitiria a manutenção dos sítios fragilizados, concluindo a replicação que não foi finalizada na interfase, uma das causas da expressão da fragilidade.

Buscando averiguar a relação entre as alterações epigenéticas e a expressão de sítios frágeis em plantas, Huang et al. (2012) testaram actinomicina D (ActD, inibidor de transcrição), e amphotericina B (APH, inibidor de transcrição) em gramíneas como milho, arroz, cevada e sorgo e observaram que a ActD promoveu quebras e lesões nos sítios de rDNA 45S dessas gramíneas. Análises específicas realizadas em milho mostraram que nos sítios 45S houve diminuição de histonas H3K9ac, H3K9me2, consistente com a descondensação, hipometilação de sequências C-G e presença de histonas  $\gamma$ H2AX, uma variante da histona H2A fosforilada e serve como uma marca para detectar quebras dupla fita do DNA.

#### **2.4 Sítios frágeis em *Lolium***

Por meio de FISH, foi construído o mapa físico dos genes de rDNA 18S, 5.8S, 26S e 5S nos cromossomos de sete taxa do gênero *Lolium*. Os sítios 18S, 5.8S, 26S foram localizados em dois pares de cromossomos nas espécies autógamas (*L. temulentum*, *L. remotum*, *L. persicum*, *L. rigidum* e *L. rigidum* var. *rotbolloides*). Nas alógamas, seis sítios foram observados em *L. multiflorum*, sete em *L. perenne* e nove em *L. rigidum* var. *rigidum*, todos localizados na região intersticial do braço cromossômico. Em todas as taxa, foram identificados dois sítios de rDNA 5S. Nas alógamas, esses sítios estavam localizados nas adjacências dos sítios 18S, 5.8S, 26S do cromossomo 2. Em *L. multiflorum* e *L. perenne*, esse sítio foi mapeado no braço curto do cromossomo 3, que contém no braço longo o sítio 18S, 5.8S,

26S e a constrição secundária, e em *L. rigidum* var. *rigidum* ele foi encontrado em ambas as posições em diferentes células (ROCHA et al., 2015; THOMAS et al., 1996).

Ksiazczyk, Taciak e Zwierzykowski (2010) observaram os sítios de rDNA de cultivares diploides e tetraploides de *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* e dos híbridos Festuloliuns resultantes do cruzamento. Esses autores encontraram variações no número e localização dos sítios de rDNA 45S nas cultivares de *L. perenne*, nos sítios 5S das cultivares de *Festuca*. Essas e estas variações foram mantidas nos híbridos, sendo mais expressiva nos sítios 45S. O estudo anterior de Lideikytëet al. (2008) mostrou resultados semelhantes para *L. perenne* e para duas cultivares de *L. multiflorum*.

Durante a construção do mapa físico dos cromossomos de *L. perenne*, Huang et al. (2008) observaram que algumas células meristemáticas apresentavam maior número de cromossomos que o esperado para a espécie. Os sinais 45S detectados pela FISH eram variáveis em número (14 a 20) e localização, sendo intersticiais e terminais (teloméricos). Em alguns dos sítios 45S era possível observar falhas ou possíveis quebras que ocorriam em uma ou em ambas as cromátides irmãs dividindo o sinal 45S em dois, formando os sinais terminais no cromossomo e nos fragmentos cromossômicos gerados. Segundo os mesmos autores esse comportamento é resultante da expressão de sítios frágeis. Essas são regiões cromossômicas propensas a sofrer estreitamento ou constrição e formar lesões ou mesmo quebras em uma ou em ambas as cromátides, fenômeno amplamente relatado em cromossomos humanos (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001).

A expressão de fragilidade cromossômica exclusivamente nos sítios de rDNA 45S de *L. perenne* relatada por Huang et al. (2008) causou a ruptura total ou parcial dos cromossomos e gerou os fragmentos, que resultaram na contagem equivocada do número cromossômico e do número de sinais 45S. O mesmo foi observado por Bustamante et al. (2014), que relataram a variabilidade para o sítio de rDNA 45S e a ocorrência de sítios

frágeis em genótipos diploides e tetraploides e de uma progênie resultante do cruzamento entre genótipos de *L. multiflorum* e por Rocha et al. (2015) em cultivares diploides e tetraploides de *L. perenne*. Nesse último estudo, a fragmentação dos cromossomos também foi confirmada pela ausência de sequências teloméricas no local da quebra no cromossomo, marcando apenas uma das extremidades do fragmento.

Bustamante et al. (2014) e Huang et al. (2008) descreveram que, em algumas lesões, as extremidades do fragmento e o cromossomo estavam ligados por um filamento de cromatina detectado na técnica de FISH. A análise dessas lesões por meio da técnica de AFM (Microscopia de força atômica) por Huang et al. (2009) mostrou que esses filamentos apresentam cerca de 60 nm, mas que a espessura ao longo de fibras de DNA não é uniforme, o que indicou que dentro destes sítios existem diferentes graus de compactação do DNA. Os autores sugeriram que as falhas no complexo de enovelamento das fibras de cromatina dos sítios frágeis de rDNA 45S são as responsáveis pela formação de quebras/lesões *in vitro* em *Lolium*.

Rocha et al. (2015) observaram que tanto na cultivar diploide quanto na tetraploide de *L. perenne*, as bandas CMA<sup>+</sup> estavam co-localizadas com os sítios 45S independentemente se eles expressavam ou não a fragilidade, indicando que estes locais são ricos em nucleotídeos C-G. Segundo Winterfeld e Röser (2007), as bandas CMA<sup>+</sup> são correspondentes aos pares de bases que compõem tanto os sítios de rDNA quanto os espaçadores intergênicos contidos nos mesmos.

Huang et al. (2008) relataram que não foi possível saber se existia preferencialmente cromossomos detentores dos sítios de rDNA 45S mais propensos à ruptura e qual era o comportamento das quebras em cromossomos homólogos devido à difícil identificação ou discriminação dos cromossomos de *L. perenne*. Rocha et al. (2015) marcaram também os genes 5S sintênicos aos 45S no cromossomo 3 de *L. perenne*, podendo observar que as quebras/lesões ocorreram de forma aleatória nos cromossomos

homólogos desse par tanto em plantas diploides quanto em tetraplóides. Os autores demonstraram, dessa forma, que provavelmente não existe uma relação ou um padrão da expressão dos sítios frágeis entre cromossomos homólogos.

Os sítios 45S das espécies *L. perenne* e *L. multiflorum* lesionados ou quebrados são, na maioria das vezes, transcricionalmente ativos e apresentam bandas Ag-NOR mais intensas que os sítios íntegros ativos (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2012; ROCHA et al., 2015). No entanto, esses cromossomos lesionados ou quebrados nem sempre apresentam ambos os lados dos sítios de rDNA 45S ativos, não sendo possível descrever um padrão de ativação nos sítios frágeis (ROCHA et al., 2015).

Os genótipos de *L. perenne* analisados por Rocha et al. (2015) apresentaram menor número de nucléolos em relação ao número de bandas Ag-NOR nos cromossomos, porém os resultados não são diferentes dos obtidos por Carnide e Orellana (1986) que analisaram o número de nucléolos em várias plantas de *L. perenne* em relação a expressão de sítios frágeis.

Duplos sinais de rDNA 45S foram detectados em um mesmo cromossomo em vários genótipos de *L. multiflorum* analisados por Bustamante et al. (2014) e em um genótipo de *L. perenne* nos estudos de Rocha et al. (2015). Os sítios estavam localizados em braços cromossômicos diferentes e não apresentaram um padrão de expressão dos sítios frágeis e de atividade transcricional.

A análise dos cromossomos em pró-metáfases e metáfases das plantas diploides e tetraploides de *L. perenne* realizadas por Rocha et al. (2015) mostrou que o grau de compactação da cromatina pode influenciar na frequência com que as quebras ou lesões ocorrem ou são visualizadas. De modo geral, observou-se, inclusive dentro de um mesmo meristema, que os cromossomos menos compactados apresentam maior número de quebras e lesões em relação às metáfases com cromossomos mais condensados. Os

autores sugeriram que durante a compactação, o adensamento da estrutura do DNA pelas proteínas histônicas e não-histônicas poderia contribuir para manter unidos o fragmento e o cromossomo, ou ainda modificações epigenéticas poderiam reverter a descondensação observada nos locais de fragilidade.

Poucos são os trabalhos sobre os sítios frágeis em plantas e a grande maioria são descritos com espécies do gênero *Lolium*, mais especificamente *L. perenne* e *L. multiflorum*, onde a expressão ocorre naturalmente (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2008, 2009; ROCHA et al., 2015). Os recentes trabalhos realizados por Waminalet al. (2013) em milho transgênico e por Grabowska-Joachimiak et al. (2015) na gramínea *Phleum echinatum* Host. mostraram a expressão do fenômeno também nos sítios de rDNA 45S, abrindo novas perspectivas sobre os estudos de sítios frágeis em plantas.

Nesse trabalho, Waminalet al. (2013) realizavam o monitoramento de milho geneticamente modificado ‘GM sample 3’ e observaram que cerca 95% das células em interfase e 93% das células em metáfase apresentaram mais de dois sítios de rDNA 45S. No milho não modificado ‘Mibaekchal’ a mesma avaliação demonstrou que apenas cerca de 5% e 7% apresentavam mais de dois sinais de rDNA 45S, respectivamente em interfase e metáfase. Os sinais 45S adicionais no milho ‘GM sample 3’ eram decorrentes da expressão de sítios frágeis e uma análise minuciosa mostrou que muitos dos sítios fragilizados de ‘GM sample 3’ estavam divididos em três partes e essas estavam conectadas por uma fina fibra de cromatina, indicando uma dessincronia/paralisação e condensação desigual do bloco de rDNA.

O mesmo estudo demonstrou através do cruzamento do milho ‘GM sample3’ x ‘Mibaekchal’ que a expressão dos SFs é herdável. A geração F1 apresentou apenas um dos homólogos com sítios de rDNA 45S intacto, esse provavelmente correspondente ao genótipo Mibaekchal indicando a herança de mecanismos epigenéticos associados a expressão dos SFs.

O número cromossômico reduzido em *P. echinatum*, em comparação com as demais espécies do gênero, foi relacionado com a ocorrência de SFs 45S nos cromossomos do par 3 dessa espécie que resultaram em rearranjos cromossômicos (GRABOWSKA-JOACHIMIAK et al., 2015).

## 2.5 Genes ribossomais x instabilidade genômica

Os genes que codificam o RNA ribossômico (rDNA) são os genes mais abundantes e conservados no genoma dos eucariotos. Esses formam blocos repetidos em tandem, que podem totalizar centenas de cópias (KOBAYASHI, 2008, 2011).

Considerados uns dos mais importantes genes house-keeping, os genes ribossomais são responsáveis por produzir aproximadamente 50% do total de proteínas de uma célula, cerca de 80% do total de RNA em levedura e pela manutenção da produção de todas as demais proteínas necessárias à célula. Para compensar essa demanda as células necessitam de centenas de cópias dos genes de rDNA organizados em clusters (KOBAYASHI, 2011). Em humanos são cerca de 700 cópias distribuídas em 5 pares de cromossomos (SAKAI et al., 1995), enquanto as plantas geralmente tem maior número de cópias, cerca de 4 a 10 vezes mais que em animais e totalizando cerca de 10% do genoma (GUERRA, 2012; KOBAYASHI, 2011).

Por serem sequências altamente repetitivas e altamente ativas transcricionalmente, os genes ribossomais são alguns dos locais mais frágeis dos cromossomos e propensos a formar constrições secundárias. Essas constrições podem se tornar *hotspots* para eventos de recombinação, translocação e ampliação do número de sequências (KOBAYASHI, 2011; SAMADASHWILY; RACA; MIRKIN, 1997). No entanto, a instabilidade nos rDNAs diferentemente das demais sequências repetitivas presentes no genoma como microssatélites, tendem a não alterar o número de cópias e a

não provocar mudanças irreversíveis no genoma. Isso é possível devido a presença de um sistema dedicado a realizar a manutenção do número de cópias nos genes de rDNA permitindo a estabilidade, embora com pequenas flutuações (KOBAYASHI, 2011). Esse sistema se baseia tanto na amplificação/expansão quanto na deleção para manter o número de cópias (GATCHEL; ZOGHBI, 2005; KOVTUN; MCMURRAY, 2008).

A manutenção do número de sequência dos rDNAs é importante não só para a síntese de subunidades ribossômicas. Kobayashi (2011) ao estudar mutantes de levedura com diferentes números de cópias de rDNA observou que quanto menor o número de cópias, maior é a proporção de cópias ativas transcricionalmente e maior a sensibilidade dessas sequências a danos no DNA provocados por raios UV. Além disso, Kobayashi (2011) relatou que o número de repetições determina a sensibilidade aos danos no DNA e que apesar de nem todas as cópias de rDNA serem transcritas, um elevado número de cópias é necessário para a manutenção do cluster gênico. Outra hipótese relatada no trabalho é que a transcrição esteja relacionada com o defeito ou ausência da reparação, pois todas as cópias foram intensamente transcritas na cepa com o mais baixo número de cópias.

O trabalho de Kobayashi (2011) deixou claro que um maior número de cópias de rDNA que o necessário para síntese de ribossomos está relacionado à manutenção da própria sequência em leveduras. Esse fenômeno também pode estar relacionado ao elevado número de cópias em plantas.

A falha no mecanismo de regulação do número de sequências nos sítios de rDNA poderia estar relacionado de alguma forma a expressão dos sítios frágeis nas espécies de *Lolium*. Como já descrito por Barlow et al. (2013) em humanos os EFRS (Sítios frágeis de replicação precoce) tem como particularidade a alteração no número de cópias e estão relacionados a genes com alta atividade transcricional e apresentam deficiência no

mecanismo de reparo de quebras na dupla fita de DNA (DSBs), como por exemplo na recombinação homóloga.

No entanto, deve-se levar em consideração que os genótipos de *Lolium* que apresentam os sítios frágeis não demonstraram a presença de micronúcleos na análise do ciclo celular, indicando que os fragmentos cromossômicos não são perdidos ao longo da divisão (dados não publicados). Dessa forma, os sítios frágeis são aparentemente estáveis, ou seja, não deletérios ao genoma. Possíveis falhas nos *checkpoints* na intérfase podem ter ocorrido permitindo o início da divisão sem a completa replicação do DNA das espécies de *Lolium*. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que proteínas de reparo estejam atuando nos sítios frágeis dos genes ribossômicos 45S durante as fases da divisão celular, garantindo a estabilidade ou manutenção dos sítios e justificando a não formação dos micronúcleos. Como já descrito anteriormente por Chan et al. (2009), é possível que mecanismos de reparo do DNA ocorram durante as fases iniciais do ciclo celular até a anáfase, compensando as falhas dos checkpoints da replicação na interfase.

## **2.6. Quebras cromossômicas espontâneas e induzidas e seus mecanismos de reparo**

Quebras na dupla fita de DNA (QDFs) se formam como resultado de exposição exagerada de agentes exógenos tais como radiação, certos químicos e também por processo endógenos, nos quais as quebras podem ocorrer espontaneamente durante a replicação do DNA, levadas por perturbações na forquilha de replicação (CANNAN; PEDERSON, 2015; KUZMINOV, 2001).

A ocorrência de QDFs pode ativar mecanismos de reparo tais como a recombinação homóloga (RH) ou a recombinação não homóloga (RNH) para promover a estabilidade do genoma religando as extremidades das fitas

de DNA (JACKSON, 2002; LAMB; SHAKIROV; SHIPPEN, 2012; LANGERAK; RUSSELL, 2011; LYSÁK; SCHUBERT, 2013). Quando esses mecanismos não corrigem as QDFs, ocorre a ruptura dos cromossomos que podem posteriormente resultar em rearranjos, alterando a estrutura dos cromossomos de formas potencialmente desfavoráveis. As alterações estruturais compreendem as deleções e rearranjos tais como inversões, inserções, trocas recíprocas simétricas e assimétricas em consequência da falta de reparo ou reparo errôneo nos pontos de quebras no DNA (SCHUBERT et al., 2004; WALTERWORTH et al., 2011). As QDFs podem, também, promover a perda de DNA devido à eliminação de fragmentos cromossômicos ao longo do ciclo celular, o que pode representar risco à estabilidade do genoma (GOSPODINOV; HERCEG, 2013).

O entendimento das consequências dessas quebras, bem como da atuação dos seus mecanismos de reparo podem ser elucidados com base em estudos envolvendo a indução de quebras (MANOVA; STOILOV, 2003; TSUJIMOTO et al., 1999). Uma das formas de induzi-las é através da exposição à radiação ionizante, cujas partículas altamente energizadas colidem com as moléculas de água próximas à cadeia de DNA criando radicais OH livres que, por sua vez, reagem com o DNA gerando quebras na fita simples (BALASUBRAMANIAN; POGOZELSKI; TULLIUS, 1998; CANNAN; PEDERSON, 2015). A radiação ionizante do tipo  $x$  e  $\gamma$  e a irradiação UV causam a formação de fragmentos acêntricos e cêntricos, tendo sido utilizadas por diversos autores visando entender como funcionam os mecanismos de reparo do DNA e quais são as consequências das alterações provocadas no genoma (BERARDINELLI et al., 2013; FRIEBE et al., 2001; LAVELLE; FORAY, 2014; SLIJEPCEVIC; BRYANT, 1998).

Alguns autores têm demonstrado que a distribuição dos pontos de quebras cromossômicas, mesmo quando induzidas, não é aleatória e que as regiões heterocromáticas, formadas de DNA altamente repetitivo, representam *hotspots* para aberrações (SCHUBERT et al., 1994, 2004).

Manova e Stoilov (2003) afirmaram que regiões gênicas, por sua vez, tendem a ser reparadas de forma eficiente por meio de recombinação homóloga.

Apesar dos mecanismos de RH ou a RNH serem os mais atuantes no reparo de QDFs, alternativamente o reparo pode se dar pela adição de sequências teloméricas nos locais de quebra do DNA, através da formação de novos telômeros, também conhecido como neotelômeros através do mecanismo denominado *de novo* telomérico ou *healing chromosome* (MELEK; SHIPPEN, 1996; MURNANE, 2012; RIBEYRE; SHORE, 2013; SLJEPCEVIC; BRYANT, 1998). O reparo de quebras no DNA através da atividade *de novo* telomérica é mais favorável em sequências repetitivas constituídas de nucleotídeos G, pois elas servem de substrato para que a telomerase inicie a adição de sequências teloméricas (BOSE et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

AGUILERA, A.; GARCIA-MUSE, T. Causes of genome instability. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 47, p. 1-32, 2013.

BALASUBRAMANIAN, B.; POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 17, p. 9738-9743, 1998.

BARLOW, J. H. et al. Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. **Cell**, Cambridge, v. 152, n. 3, p. 620-632, Jan. 2013.

BENNETT, S. J.; HAYWARD, M. D.; MARSHALL, D. F. Electrophoretic variation as a measure of species differentiation between four species of the genus *Lolium*. **Genetic Resources Crop Evolution**, Wageningen, v. 49, n. 1, p. 59-66, 2002.

BERARDINELLI, F. et al. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts. **Environmental and molecular mutagenesis**, Hoboken, v. 54, n. 3, p. 172-179, 2013.

BOSE, P. et al. Tandem repeats and G-rich sequences are enriched at human CNV breakpoints. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101607>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BREESE, E. L.; LEWIS, E. J.; EVANS, G. M. Interspecific hybrids and polyploidy. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London v. 292, n. 1062, p. 487-497, 1981.

BROWN, J. D.; O'NEILL, R. J. Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 11, p. 291-316, 2010.

BUSTAMANTE, F. O. et al. Distribution of rDNA in diploid and poliploid *Lolium multiflorum* Lam. reveals fragile sites in 45S rDNA region. **Crop Science**, Madison, v. 54, n. 9, p. 1-9, Mar. 2014.

CANNAN, W. J.; PEDERSON, D. S. Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 231, n. 1, p. 3-14, 2015.

CARNIDE, V.; ORELLANA, J. Analysis of nucleolar organizer regions by silver staining in two *Lolium* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, n. 2, p. 503-507, Apr. 1986.

CARNIDE, V.; ORELLANA, J.; RIBEIRO, M. A. M. V. Nucleolar organiser activity in *Lolium* and *Festuca*: I., *Lolium multiflorum*, *Festuca arundinacea* and *Lolium-Festuca* Hybrids. **Heredity**, Cary, v. 56, n. 3, p. 311-317, June 1986.

CASPER, A. M. et al. ATR regulates fragile site stability. **Cell**, Cambridge, v. 111, n. 6, p. 779-89, Dec. 2002.

CERNOCH, V.; NAŠINEC, I.; ŠRAMEK, P. Share of grasslands on landscape forming in the Czech Republic. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, Praha, v. 39, p. 158-162, Sept. 2003. Issue special.

CHAN, K. L. et al. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. **Nature Cell Biology**, London, v. 11, n. 6, p. 753-761, 2009.

CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. Genera Graminum. **Grasses of the World. Kew Bulletin**, Kew, v. 13, p. 1-389, 1986.

COFFEE, B. et al. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile X syndrome. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 71, n. 4, p. 923-932, Oct. 2002.

DEBATISSE, M.; EL ACHKAR, E.; DUTRILLAUX, B. Common fragile sites nested at the interfaces of early and late-replicating chromosome bands. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p. 578-581, 2006.

DURKIN, S. G.; GLOVER, T. W. Chromosome fragile sites. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 41, p. 169-192, 2007.

EL ACHKAR, E. et al. Premature condensation induces breaks at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 102, n. 50, p. 18069-18074, July 2005.

FOJTÍK, A. Methods of grass improvement used at the Plant Breeding Station Hladké Zivotice. **Genetica Polonica**, Warszawa, n. 35, p. 25-31, 1994.

FRIEBE, B. et al. Chromosome healing by addition of telomeric repeats in wheat occurs during the first mitotic divisions of the sporophyte and is a gradual process. **Chromosome Research**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 137-146, 2001.

GATCHEL, J. R.; ZOGHBI, H. Y. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n. 10, p. 743-755, Oct. 2005.

GLOVER, T. W. Common fragile sites. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 4-12, 2006.

GLOVER, T. W. et al. Mechanisms of common fragile site instability. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 2, p. R197-205, Oct. 2005. Supplement.

GLOVER, T. W. et al. The murine *Fhit* gene is highly similar to its human orthologue and maps to a common fragile site region. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 58, n. 15, p. 3409-3414, Aug. 1998.

GOSPODINOV, A.; HERCEG, Z. Chromatin structure in double strand break repair. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 12, n. 10, p. 800-810, 2013.

GRABOWSKA-JOACHIMIAK, A. et al. Karyotype structure and chromosome fragility in the grass *Phleum echinatum* Host. **Protoplasma**, Sachsenplatz, v. 252, n. 1, p. 301-306, 2015.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems**, Abingdon, v. 146, n. 3, p. 703-710, Aug. 2012.

HANNAWAY, D. et al. **Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)**. Disponível em:  
<<http://cropandsoil.oregonstate.edu/News/Publicat/Hannaway/PerRye/complete.html>>. Acesso em: 19 mar. 2014.

HELMRICH, A.; BALLARINO, M.; TORA, L. Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 44, n. 6, p. 966-977, Dec. 2011.

HUANG, J. et al. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. 1-7, 2008.

HUANG, J. et al. Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 4, Apr. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0035139>>. Acesso em: 15 jun. 2012.

HUANG, J. et al. Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. **Protoplasma**, Sachsenplatz, v. 236, n. 1/4, p. 59-65, July 2009.

HUEBNER, K.; CROCE, C. M. FRA3B and other common fragile sites: the weakest links. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 1, n. 3, p. 214-221, Dec. 2001.

HUMPHREYS, M. W. **Development of a novel grass with environmental stress tolerance and high forage quality through intergeneric hybridization between *Lolium* and *Festuca***. Tokyo: National Agriculture and Bio-oriented Research Organization, 2004. 15 p.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM.2010. Disponível em: <<http://www.itis.gov>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

JACKSON, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 23, n. 5, p.687-696, Jan. 2002.

JAUHAR, P. P. Chromosome relationship between *Lolium* and *Festuca*. **Chromosoma**, Berlin, v. 52, p. 103-121, 1975.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics of the *Festuca-Lolium* complex**: relevance to breeding. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 255 p.

JENKIN, T. J. The ryegrasses (*Lolium* L.). In: ROEMER, T. H.; RUDORF, W. (Ed.). **Handbuch der Pflanzenzuchtung**. Berlin: P. Parey, 1959. p. 435-452.

JIANG, Y. et al. Common fragile sites are characterized by histone hypoacetylation. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 18, n. 23, p. 4501-4512, Aug. 2009.

JONES, C. et al. Association of a chromosome deletion syndrome with a fragile site within the proto-oncogene CBL2. **Nature**, London, v. 376, p. 145-149, July 1995.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, New York, v. 27, n. 3, p. 247-254, Mar. 2001.

KLEIJER, G. Cytogenetic studies of crosses between *Lolium multiflorum* Lam. and *Festuca arundinacea* Schreb: the parents and the F1 hybrids. **Zeitschrift Pflanzenzüchtg**, Berlin, v. 93, p. 1-92, 1984.

KOBAYASHI, T. A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus-rDNA instability maintains genome integrity. **BioEssays**, Cambridge, v. 30, n. 3, p. 267-272, Mar. 2008.

KOBAYASHI, T. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 68, n. 8, p. 1395-1403, Jan. 2011.

KOPECKÝ, D. et al. Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 113, n. 4, p. 731-742, Aug. 2006.

KOPECKÝ, D. et al. Physical distribution of homoeologous recombination in individual chromosomes of *Festuca pratensis* in *Lolium multiflorum*. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 129, n. 1/3, p. 162-172, July 2010.

KOPECKÝ, D.; LUKASZEWSKI, A. J.; DOLEZEL, J. Cytogenetics of Festulolium (*Festuca* × *Lolium* hybrids). In: PUERTAS, M. J.; NARANJO, T. (Ed.). **Reviews in plant cytogenetics**. Switzerland: Karger, 2008. p. 370-383.

KOSMALA, A. et al. Introgression mapping of genes for winter hardiness and frost tolerance from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 98, n. 4, p. 311-316, July/Aug. 2007.

KOVTUN, I. V.; MCMURRAY, C. T. Features of trinucleotide repeat instability *in vivo*. **Cell Research**, Shanghai, v. 18, n. 1, p. 198-213, Jan. 2008.

KSIAZCZYK, T.; TACIAK, M.; ZWIERZYKOWSKI, Z. Variability of ribosomal DNA sites in *Festuca pratensis*, *Lolium perenne*, and their intergeneric hybrids, revealed by FISH and GISH. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 51, n. 4, p. 449-460, 2010.

KUZMINOV, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 8241-8246, 2001.

LAMB, J. C.; SHAKIROV, E. V.; SHIPPEN, D. E. Plant telomeres. In: \_\_\_\_\_. **Plant cytogenetics**. New York: Springer, 2012. p. 143-191.

LANGERAK, P.; RUSSELL, P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 366, n. 1584, p. 3562-3571, 2011.

LAVELLE, C.; FORAY, N. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 49, p. 84-97, Apr. 2014.

LETESSIER, A. et al. Cell-typespecific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. **Nature**, London, v. 470, n. 7332, p. 120-123, Jan. 2011.

LIDEIKYTĖ, L. et al. FISH assessment of ribosomal DNA sites in the chromosome sets of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*. **Agriculture**, London, n. 265, p. 116-124, 2008.

LOSS, B. P. Allozyme variation within and between populations in *Lolium* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 188, n. 1/2, p. 101-113, 1993.

LUNDIN, C. et al. Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. **Molecular Cell Biology**, London, v. 22, n. 16, p. 5869-5878, Aug. 2002.

LYSÁK, M. A.; SCHUBERT, I. **Mechanisms of chromosome rearrangements**. Vienna: Springer, 2013. 147 p.

MALIK, C. P.; THOMAS, P. T. Karyotypic studies in some *Lolium* and *Festuca* species. **Caryologia**, Firenze, v. 19, p. 167-196, 1966.

MANOVA, V. I.; STOILOV, L. M. Induction and recovery of double-strand breaks in barley ribosomal DNA. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 2, n. 9, p. 983-990, 2003.

MELEK, M.; SHIPPEN, D. E. Chromosome healing: spontaneous and programmed *de novo* telomere formation by telomerase. **Bioessays**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 301-308, 1996.

MURNANE, J. P. Telomere dysfunction and chromosome instability. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 730, n. 1/2, p. 28-36, 2012.

MUSIO, A. et al. SMC1 involvement in fragile site expression. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 525-533, Jan. 2005.

NUNES, R. C. et al. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180-188, mar./abr. 2012.

OZERI-GALAI, E. et al. Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 43, n. 1, p. 122-131, July 2011.

POLOK, K. **Molecular evolution of the genus *Lolium* sp.** Olsztyn: Studio Poligrafii Komputerowej, 2007. 320 p.

RIBEYRE, C.; SHORE, D. Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. **Chromosoma**, Berlin, v. 122, n. 3, p. 159-173, 2013.

RICHARDS, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. **Trends in Genetics**, London, v. 17, n. 6, p. 339-345, June 2001.

ROCHA, L. C. et al. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, Sachsenplatz, v. 252, n. 2, p. 451-460, 2015.

RUIZ-HERRERA, A.; ROBINSON, T. J. Afrotherian fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genomic assemblies. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 7, n. 199, p. 1-15, 2007.

RUIZ-HERRERA, A. et al. Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in Papionini (Primates) species and humans. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 683-690, Oct. 2004.

SAINTIGNY, Y. et al. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. **The Embo Journal**, Oxford, v. 20, n. 14, p. 3861-3870, July 2001.

SAKAI, M. et al. Human ribosomal RNA gene cluster: identification of the proximal end containing a novel tandem repeat sequence. **Genomics**, Boston, v. 26, n. 3, p. 521-526, Oct. 1995.

SAMADASHWILY, G. M.; RACA, G.; MIRKIN, S. M. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. **Nature Genetics**, New York, v. 17, n. 3, p. 298-304, Nov. 1997.

SARAFIDOU, T. et al. Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10AC1, encoding a nuclear protein. **Genomics**, Boston, v. 84, n. 1, p. 69-81, July 2004.

SCHIFINO, M. T.; WINGE, H. Karyotypes and nuclear DNA content of species of the *Briza* complex and some other genera of Poaceae (Gramineae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 245-259, 1983.

SCHUBERT, I. et al. DNA damage processing and aberration formation in plants. **Cytogenetics and Genome Research**, Würzburg, v. 104, n. 1/4, p. 104-108, Jan. 2004.

SCHUBERT, I. et al. Sequence organization and the mechanism of interstitial deletion clustering in a plant genome (*Vicia faba*). **Mutation Research**, Amsterdam, v. 325, n. 1, p. 1-5, Sept. 1994.

SCHWARTZ, M.; ZLOTORYNSKI, E.; KEREM, B. The molecular basis of common and rare fragile sites. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 13-26, Jan. 2006.

SLIJEPCEVIC, P.; BRYANT, P. E. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of radiation-induced chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 73, n. 1, p. 1-13, 1998.

SMITH, D. I. et al. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 48-57, Jan. 2006.

TERREL, E. E. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. **USDA Technical Bulletins**, Washington, n. 1392, p. 1-65, 1968.

THOMAS, H. M. The Giemsa C-band karyotypes of six *Lolium* species. **Heredity**, Edinburgh, v. 46, p. 263-267, 1981.

THOMAS, H. M. et al. Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 486-490, Nov. 1996.

THOMAS, H. M. et al. Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by *in situ* hybridization. **Genome**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 406-410, Feb. 1997.

THOMAS, H. M.; MORGAN, W. G.; HUMPHREYS, M. W. Designing grasses with a future: combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. **Euphytica**, Wageningen, v. 133, n. 1, p. 19-26, July 2003.

TSUJIMOTO, H. et al. *De novo* synthesis of telomere sequences at the healed breakpoints of wheat deletion chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 262, n. 4/5, p. 851-856, 1999.

USDIN, K.; WOODFORD, K. J. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis *in vitro*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 20, p. 4202-4209, Sept. 1995.

WAMINAL, N. E. et al. Randomly Detected Genetically Modified (GM) Maize (*Zea mays* L.) near a Transport Route Revealed a Fragile 45S rDNA Phenotype. **Plos One**, San Francisco, v. 8, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074060>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

WANG, Y. Chromatin structure of human chromosomal fragile sites. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 70-78, 2006.

WANG, Y.; GRIFFITH, J. Methylation of expanded CCG triplet repeat DNA from fragile X syndrome patients enhances nucleosome exclusion. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 38, p. 22937-22940, Sept. 1996.

WATERWORTH, W. M. et al. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. **New Phytologist**, Cambridge, v. 192, n. 4, p. 805-822, 2011.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The grass genera of the world**. Cambridge: Cambridge University, 1992. 1036 p.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. Disposition of ribosomal DNAs in the chromosomes of perennial oats (Poaceae: Aveneae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, n. 2, p. 193-210, 2007.

YAMADA, T. et al. Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca*. **Grass Species Complex Grassland Science**, Basel, v. 51, n. 2, p. 89-106, 2005.

YUDKIN, D. et al. Chromosome fragility and the abnormal replication of the *FMR1* locus in Fragile X syndrome. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 2940-2952, Jan. 2014.

YUNIS, J. J.; SORENG, A. L.; BOWE, A. E. Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. **Oncogene**, Basingstoke, v. 1, p. 59-69, 1987.

ZLOTORYNSKI, E. et al. Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 23, n. 20, p. 7143-7151, Oct. 2003.

**SEGUNDA PARTE: ARTIGOS**

**ARTIGO 1 - Decondensation of chromosomal 45S rDNA sites in *Lolium*  
and *Festuca* genotypes does not result in karyotype instability**

**Abstract**

Fragile sites (FSs) in plants have been described for species like *Lolium* and other grasses. Whereas in humans, FSs were shown to be involved in genome instabilities, but consequences of FSs expression in plants are not known yet. To evaluate whether FSs cause karyotype instabilities, we assessed the frequency of micronuclei and lagging chromosomes in meristematic cells, the stability of the DNA content and the occurrence of neocentromeres in the presumed chromosomal fragments of *Lolium perenne*, *L. multiflorum*, *Festuca arrundinacea* and two *Festulolium* hybrids. The cell cycle analysis along with flow cytometric genome size measurements showed high stability in all evaluated genomes. Neocentromeric activity was neither observed in the presumed fragments nor in any other chromosomal region. FISH with a 45S rDNA probe in combination with YOYO staining of metaphasic chromosomes showed that many extended NOR-regions form very thin YOYO-positive chromatin fibers connecting the acentric 'fragment' with the centromere containing chromosome region. The obtained data indicate that the expression of FSs does not result in genome instabilities or neocentromere formation. The FSs-containing 45S rDNA carrying chromatin fibers undergo a cell cycle and gene activity dependent dynamic decondensation process.

**Keywords:** Fragile sites, forage grass, chromatin fiber, genomic stability, DNA content, *Lolium-Festuca* complex

## Introduction

Chromosomal fragile sites (FSs) are specific heritable regions on chromosomes that frequently form gaps or constrictions and may tend to break. Under normal conditions, most common FSs are not especially prone to spontaneous breaks (Richards 2001; Glover 2006). FSs are widely described for humans and other mammalian chromosomes and are involved in the occurrence of diseases, including several types of cancer (Sutherland 1979; Ruiz-Herrera et al. 2006; Yudkin et al. 2014). FSs are also described for yeasts (Freudenreich et al. 1998; Song et al. 2014) and fish (Singh and Barman 2013). More recently FSs have been associated with the nucleolus organizing region (NOR) of mitotic chromosomes in different *Lolium* species (Huang et al. 2008; Bustamante et al. 2014; Rocha et al. 2015), maize (Waminal et al. 2013) and *Phleum echinatum* (Grabowska-Joachimiak et al. 2015). In *P. echinatum*, FSs are involved in chromosomal rearrangements resulting in a karyotype which differs from other representatives of the genus *Phleum*.

As consequences of FSs in *Lolium*, changes in number, position and activity of 45S rDNA sites and polymorphisms in size and number of nucleoli have been reported (Huang et al. 2008; Bustamante et al. 2014; Rocha et al. 2015). In addition, the absence of telomeric sequences at the end of broken fragments carrying the 45S rDNA was described for *L. perenne*. Furthermore, randomization of breaks and lesions among homologous chromosomes were reported (Rocha et al. 2015).

Little is known about the cause of the fragility of the 45S rDNA sites, but chromosomal rearrangements mediated by the fragility of these sites could result in karyotypic changes, as described for the fish species *Channa punctatus* (Singh and Barman 2013). In *Neurospora*, the presence of ectopic rDNA created a new site of chromosome breakage (Butler 1992). However, it is still not clear if the fragility of the 45S rDNA site observed in

*Lolium* species could be considered as a hotspot for karyotype evolution, as reported for FSs of other species (Ruiz-Herrera et al. 2006; Ruiz-Herrera and Robinson 2007; Zhang et al. 1992).

Formation of FSs, particularly if they result in chromosome fragmentation, may lead to genome instabilities due to the loss of genetic information or promote chromosomal rearrangements that might be unfavorable for the organism (Van Gent et al. 2001; Longhese et al. 2006; Aguilera et al. 2013). On the other hand, FSs could also be a positive evolutionary factor as these regions are able to promote recombination events and cytogenetic changes (Ruiz-Herrera and Robinson 2007; Brown and O'neil 2010).

To evaluate whether the fragility at the NOR region reported in *Lolium* could cause karyotype instabilities, we evaluated the frequency of micronuclei and lagging chromosomes in meristematic cells as well as the occurrence of neocentromeres associated chromosome fragments carrying 45S rDNA and also we checked occurrence of SFs in *Festuca arundinacea* and Festulolium hybrids.

## **Material and Methods**

### **Plant material and identification of micronuclei and lagging anaphase chromosomes**

The assessments were conducted with *Lolium perenne* (cv. Ellet, diploid), *Lolium multiflorum* (cv. Ponteio,  $2n=2x=14$ ), *Festuca arundinacea* (cv. Rizomat,  $2n=6x=42$ ) and two Festulolium hybrids: Estero 1885 (*L. multiflorum* ssp. italicum x *F. arundinacea*,  $2n=3x=28$ ); and Estero 2185 (*L. perenne* x *F. arundinacea*,  $2n=3x=28$ ). The material was germinated on wet filter paper at room temperature and further cultivated under greenhouse conditions.

Young roots of *L. perenne*, *L. multiflorum* and *F. arundinacea* were fixed in Carnoy's solution (ethanol: acetic acid (3:1)) to evaluate the cell cycle. Meristems were prepared in 45% acetic acid applying the squash method after maceration in 0.1% (w/v) cytohelicase, 0.1% (w/v) pectolyase and 0.7% cellulase in 10 mM citrate buffer (pH 4.6) at 37°C for 40 min. Samples were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Roots of the same species also were pre-treated with ice cold water for 24 hours to compare with roots fixed directly in Carnoy's solution. To determine the number of micronuclei and lagging anaphase chromosomes, 5,000 meristematic cells were assessed for each treatment.

#### **Indirect immunolabelling and fluorescence *in situ* hybridization**

Roots were treated in ice cold water for 24 hours and fixed for 35 min in 4% paraformaldehyde (pH 7.8) in 1x Phosphate Buffered Saline (PBS). Mitotic chromosome spreads were prepared using the dropping method as described by Houben et al. (2007).

For immunolabelling (Houben et al. 2007) the following dilutions of primary antibodies were used: 1:4000 of a rabbit anti-grass CENH3 (Sanei et al. 2011), 1:50 of a monoclonal rat anti-H3S28ph (Sigma, #149908) and 1:200 of a monoclonal mouse anti-H3S10ph (Abcam, ab14955). A Cy3-conjugated anti-rabbit IgG (Dianova) and a fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse and anti-rat Alexa 488 antibody (Molecular Probes), each at a 1:300 dilution and 1:200, respectively, were used as secondary antibodies.

After recording the immunofluorescence signals, specimens were hybridized with 45S rDNA sequences (pTa71 from *Triticum aestivum* L.) directly labelled with Texas Red™ (red) by nick translation to detect the nucleolus organizing region (NOR). For this, the specimens were washed twice for 5 min in 2X saline sodium citrate buffer (SSC), treated with 0.1%

pepsin in 1N HCl for 6 min at 37°C and washed twice in 2X SSC for 5 min each. Post-fixation was performed for 10 min in 2.5% (w/v) formaldehyde in 2X SSC (pH 8.0). Thereafter, the slides were washed in 2X SSC three times for 5 min, dehydrated in an ethanol series and air dried. The probe was denatured at 75°C for 5 min and then kept on ice to prevent renaturation. Slides were denatured on a hot plate at 85 °C for 2 min. Hybridization took place at 37°C for about 16 hours.

Afterwards, the slides were stained with YOYO (Invitrogen) for better visualization of thin chromatin fibers. For this, 100 µL of YOYO solution (5 µL YOYO in PBS [1 µL YOYO-1 + 99 µL 1X PBS] + 95 µL 1X TRIS-NaCl-blocking buffer (TNB)) was applied per sample, covered with a cover slip and incubated at 37°C for 30min. Then, the samples were washed 3 times in 1x PBS, 5 min. each, dried and mounted in Vectashield. Alternatively the slides were stained with 1 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in Vectashield. Wide-field fluorescence microscopic images were recorded with an Olympus BX61 microscope (Olympus; <http://www.olympus.com>) equipped with an ORCA-ER CCD camera (Hamamatsu; <http://www.hamamatsu.com>). Grey scale images were pseudo-colored and merged using Adobe Photoshop. Measurements were carried out using the image tool UTHSCSA 3:00 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio).

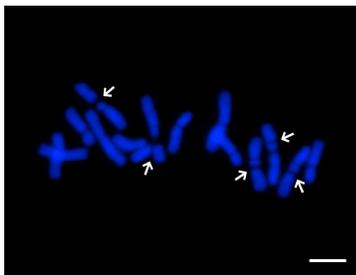
### **Flow cytometric genome size measurements**

For genome size estimations, nuclei of young leaf tissue were isolated in nuclei isolation buffer (Galbraith et al. 1983) supplemented with propidium iodide (50 µg/ml) and DNase-free RNase (50 µg/ml) as described (Dolezelet al. 2007). *Pisum sativum* 'Viktoria, KifejtőBorsó' (Genebank Gatersleben accession number: PIS 630; 2C = 9.09 pg; Dolezel et al. 2007) was used as an internal reference standard. Samples were measured on a

FACStar<sup>PLUS</sup> cell sorter (BD Biosciences, San José, CA, USA) equipped with an argon ion laser INNOVA 90C (Coherent, Palo Alto, CA, USA). Approximately 10.000 particles per sample were analyzed using the software CELL Quest ver. 3.3 (BD Biosciences). The absolute DNA content of the samples was calculated based on the values of the G<sub>1</sub> peak means. Four independent isolations were analyzed per species.

## Results

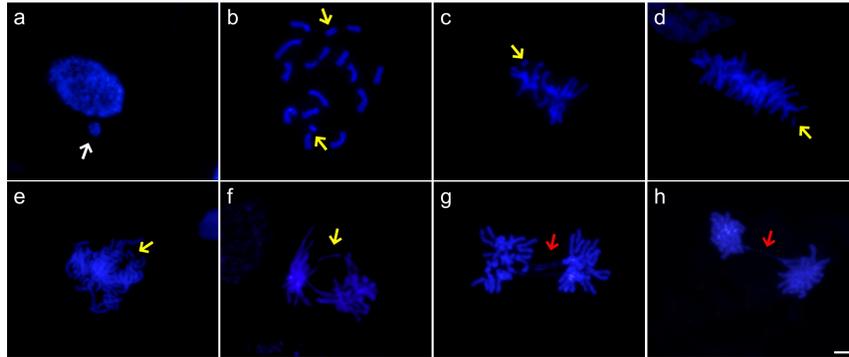
Analysis of DAPI-stained metaphases revealed fragile sites (FSs) in *L. multiflorum*, *L. perenne*, *F. arundinacea* and the corresponding Festulolium hybrids (Fig. 1; Fig. 2; Online resource 2a; Online resource 3a; Online resource 4a and Online resource 5a and d). The FSs were either detectable as gaps in the DAPI staining along the chromosomes (Fig. 1) or as chromosomal fragments (Fig. 2c, d and e; Online resource 3a and Online resource 4a).



**Fig 1.** Metaphase of *Lolium multiflorum* with fragile sites (white arrows). Chromosomes are stained with DAPI. Bar: 5µm

To quantify the occurrence of chromosome fragments and micronuclei we analyzed cells of *L. perenne*, *L. multiflorum*, and *F. arundinacea* at different stages of the cell cycle with and without cold treatment. At interphase less than 1% of the cells showed micronuclei in untreated and cold-treated roots (Table 1; Fig. 2a). However, at metaphase ‘chromosomal fragments’ were found in 16.8 % and 14.9 % of metaphases of untreated (Fig. 2c; Table 1) and 35.6 % and 30.1 % of treated roots (Fig. 1; Fig. 2b; Table 1) in *L. multiflorum* and *L. perenne*, respectively. In

contrast, only 2.0 % of metaphase cells of untreated and 2.7% of metaphase cells of treated roots revealed fragments in *F. arundinacea* (Fig. 2d and e; Table 1).



**Fig 2.** Chromosomes at different stages of the cell cycle. (a) Interphase of *L. multiflorum* with a micronucleus; (b) Arrested metaphase of *L. perenne*; (c) Metaphase of *L. multiflorum*; (d) Metaphase of *F. arundinacea*; (e) Arrested metaphase of *F. arundinacea*; (f) Anaphase of *L. multiflorum* with a chromosomal fragment; (g) Anaphase of *L. multiflorum* with multiple bridges; (h) Anaphase of *L. perenne* with a single bridge. White arrow indicates a micronucleus; Yellow arrows indicate chromosome fragments; Red arrows indicate chromosome bridges. Bar: 5 $\mu$ m

The percentage of anaphases with multiple or single bridges ranged from 18 to 26.4 % in *L. multiflorum* and *L. perenne* irrespective of the treatment (Table 1; Fig. 2f and g) and was severely lower in *F. arundinacea* (11.5% in untreated and 8.0% in treated roots) (Table 1). The highest frequency of chromosomal fragments at anaphase was found in untreated roots cells of *L. multiflorum* (8.0 %) (Fig. 2h), whereas in all other samples fragments were rarely detected (Table 1).

**Table 1.** Cell-cycle analyses of 5000 cells each of *L. multiflorum* (Lm), *L. perenne* (Lp) and *F. arundinacea* (Fa).

	<i>L. multiflorum</i>		<i>L. perenne</i>		<i>F. arundinacea</i>	
	Untreated	Cold treatment	Untreated	Cold treatment	Untreated	Cold treatment
<b>Interphase</b>	<b>4623 (92.5)</b>	<b>4517 (90.3)</b>	<b>4300 (86.0)</b>	<b>4459 (89.2)</b>	<b>4564 (91.3)</b>	<b>4622 (92.4)</b>
Normal	4618 (92.4)	4509 (90.2)	4295 (85.9)	4451 (89.0)	4534 (90.7)	4609 (92.2)
Micronuclei	5 (0.1)	8 (0.16)	5 (0.1)	8 (0.16)	30 (0.6)	13 (0.26)
<b>Prophase</b>	<b>170 (3.4)</b>	<b>295 (5.9)</b>	<b>409 (8.2)</b>	<b>341 (6.8)</b>	<b>136 (2.7)</b>	<b>164 (3.3)</b>
<b>Metaphase</b>	<b>95 (1.9)</b>	<b>146 (2.9)</b>	<b>134 (2.7)</b>	<b>136 (2.7)</b>	<b>152 (3.0)</b>	<b>188 (3.8)</b>
Normal	79 (1.6)	94 (1.9)	114 (2.3)	95 (1.9)	149 (3)	183 (3.6)
Fragments	16 (0.3)	52 (1.0)	20 (0.4)	41 (0.8)	3 (0.06)	5 (0.1)
<b>Anaphase</b>	<b>87 (1.7)</b>	<b>33 (0.7)</b>	<b>147 (2.9)</b>	<b>61 (1.2)</b>	<b>131 (2.6)</b>	<b>25 (0.5)</b>
Normal	57 (1.1)	27 (0.5)	118 (2.4)	49 (0.9)	114 (2.3)	23 (0.4)
Brigde	23 (0.4)	6 (0.1)	27 (0.5)	11 (0.2)	15 (0.3)	2 (0.04)
Fragments	7 (0.14)	0 (0)	2 (0.04)	1 (0.02)	2 (0.04)	0 (0)
<b>Telophase</b>	<b>25 (0.5)</b>	<b>9 (0.2)</b>	<b>10 (0.2)</b>	<b>3 (0.1)</b>	<b>17 (0.4)</b>	<b>1 (0.02)</b>

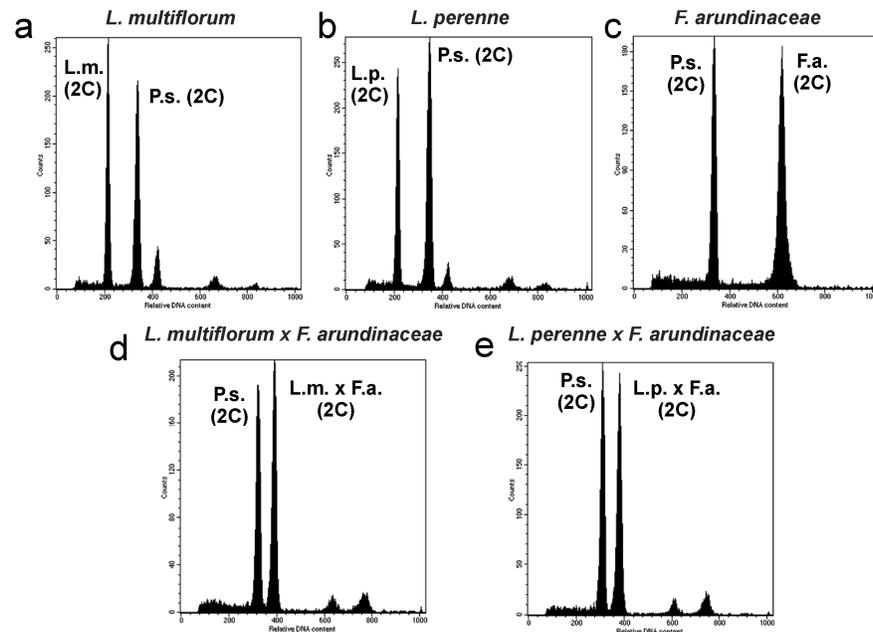
Flow cytometric measurements resulted in estimated genome sizes of  $5.65 \pm 0.08$  pg /2C for *L. multiflorum*,  $5.62 \pm 0.03$  pg/2C for *L. perenne*,  $16.83 \pm 0.55$  pg/2C for *F. arundinacea*,  $10.83 \pm 0.24$  pg/2C for *Festulolium* 1885 and  $11.05 \pm 0.22$  pg /2C for *Festulolium* 2185. In all cases the histograms showed distinct and sharp peaks with a low coefficients of variation (below 3%, Fig. 3). Chromosome countings and FISH with 45S rDNA probes or immunolabelling with (peri-) centromeric antibodies confirmed the stability of the karyotype and the absence of aneuploidies (Fig. 5b; Online resource 1a-d; Online resource 2a-d; Online resource 3a and b; Online resource 4a-d).

**Table 2.** Genome size estimations (2C) of *L. multiflorum*, *L. perenne*, *F. arundinacea* and Festulolium.

Species/hybrids	Mean DNA contents (pg)	Coefficient of variation (CV)	DNA content reported
<i>L. multiflorum</i> 2x	5.65 ± 0.08	2.43 ± 0.12	5.44 <sup>(1)</sup>
<i>L. perenne</i> 2x	5.62 ± 0.03	2.55 ± 0.16	5.60 <sup>(2)</sup>
<i>F. arundinacea</i> 6x	16.83 ± 0.55	2.67 ± 0.12	17.22 <sup>(1)</sup>
<i>Festulolium</i> 1885 (Fa x Lm) 3x	10.83 ± 0.24	2.54 ± 0.23	11.24*
<i>Festulolium</i> 2185 (Fa x Lp) 3x	11.05 ± 0.22	2.61 ± 0.15	11.22*

<sup>(1)</sup> Šmarda et al. 2008<sup>(2)</sup> Wang et al. 2009

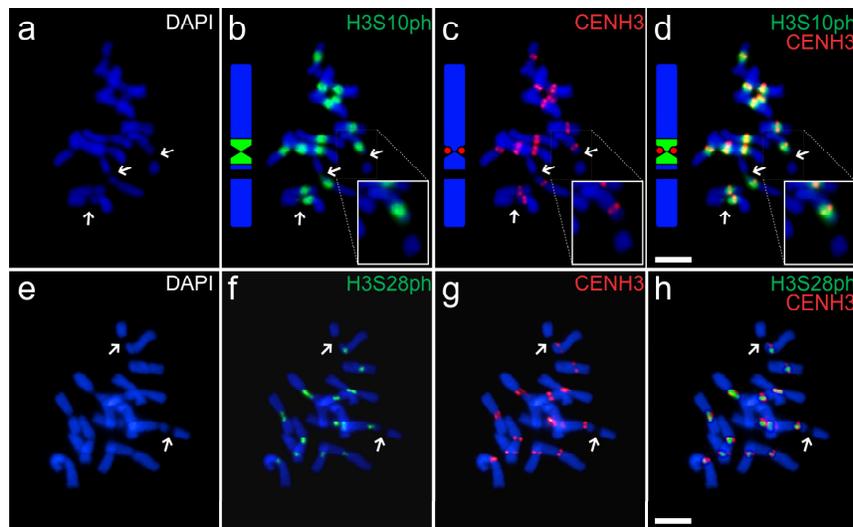
\* value of DNA expected

**Fig 3.** Flow cytometric histograms obtained from leaf nuclei of *L. multiflorum* (L.m.), *L. perenne* (L.p.), *F. arundinacea* (F.a.), Festulolium (L.m. x F.a. and L.p. x F.a.). *Pisum sativum* (P.s.) was used as internal reference standard

Furthermore, the immunostaining experiments using antibodies recognizing centromeric (CENH3) and pericentromeric (H3S28ph and H3S10ph) chromatin showed that no additional (peri-)centromeric signals

were found neither on intact nor on fragile chromosomes of *L. multiflorum* (Fig. 4a-d and e-h) indicating that there is no neocentromeric activity on the ‘chromosome fragments’. Similarly, no neocentromeric activity was found on ‘chromosomal fragments’ of *L. perenne*, *F. arundinacea* and Festulolium (Online resources 1; Online resources 2; Online resources 3 and Online resources 4b).

A combination of immunolabelling using the (peri-)centromeric antibodies and FISH with a 45SrDNA probe confirmed that the FSs expression occurs exclusively at NOR-regions in *F. arundinacea* (Online resource 2d) and Festulolium hybrids (Online resource 4d and Online resource 5b and e).



**Fig 4.** Immunolocalization of CENH3, H3S10ph and H3S28ph in *L. multiflorum*. (a-d) CENH3 and H3S10ph. (e-h) CENH3 and H3S28ph. Arrows indicate FSs. Inserts in b, c and d show magnifications of a ‘fragmented chromosome’. Note the absence of centromeric and pericentromeric signals in the smaller distal ‘chromosomal fragment’. White arrows indicate the FSs. Bars: 5μm

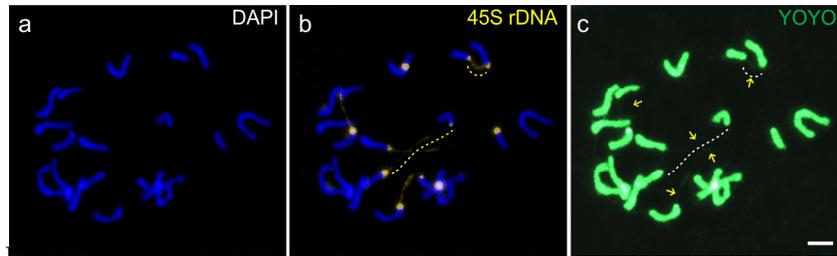


Fig 5. Metaphase of *L. multiflorum* after FISH with a 45S rDNA probe and YOYO staining. (a) DAPI staining (b) 45S rDNA FISH, the yellow dotted lines indicate stretched chromatin fibers with very weak hybridization signals. (c) YOYO staining, yellow arrows and white dotted lines indicate chromatin fibers weakly stained with YOYO. Bar: 5 $\mu$ m

Applying YOYO staining and FISH with a 45S rDNA probe on metaphases showing chromosome fragmentation revealed that the acentric chromosomal fragments are connected with the centromere-containing chromosome region through a long and thin chromatin fiber only weakly detectable by the 45S FISH signal and the YOYO staining (Fig. 5a-c; Online resource 2a-e; Online resource 5 a-c and d-f). The length of the chromatin fibers ranged from 5.8 to 19.9  $\mu$ m (Fig. 5b and c).

## Discussion

The occurrence of fragile sites (FSs) in *Lolium* species is in agreement with reports from Huang et al. (2008), Bustamante et al. (2014) and Rocha et al. (2015) who previously reported the expression of FSs in several diploid, triploid and tetraploid cultivars of *Lolium* species. However, in *Festuca* and *Festulolium* hybrids FSs have not been described so far.

Although the FSs are detectable at the 45S rDNA sites of *Lolium* species and *F. arundinacea*, the frequency of observed abnormalities throughout the cell cycle is quite low.

Especially the low number of micronuclei does not indicate severe genome instabilities. The observed small differences in the frequencies of abnormalities between treated and untreated cells might be explained by

difficulties to identify the chromosomal fragments in metaphase plates of untreated root cells. It also indicates that the FSs expressed independent of block treatment with ice cold water.

The estimated genome sizes were in close accordance to values described before for *Lolium* and *F. arundinacea* (reference values of DNA content on table 2), and those expected for Festulolium (Table 2). The stability and the low coefficients of variation of the genome size measurements in concordance with stable chromosome counts, indicate no reasons to assume severe genome size instabilities. This is further supported by the low number of observed micronuclei in interphase cells although chromosome fragments in metaphases and bridges in anaphases were frequently detected. However, none of these phenomena lead to loss of genetic material, supporting the stability of the evaluated genomes.

The genetic stability observed in *Lolium*, *Festuca* and Festulolium hybrids, might be explained by the formation of neocentromeres at the 'chromosomal fragments' what would allow the formation of new kinetochore assembly sites and a normal segregation of the fragments (Hall et al. 2004; Marshall et al. 2008; Burrack and Berman 2012). However, immunostaining experiments did not confirm neocentromere formation.

The observed genetic stability can instead be explained by chromatin fibers at NOR-region connecting the acentric fragments with the chromosomal regions containing the centromeres. In this case, FSs expression does not result in chromosome fragmentation, since both parts are not completely separated. Previous studies showed that the fiber chromatin at NOR-region were not found in all chromosomes with FSs in *Lolium* (Huang et al, 2008; Bustamante et al., 2014), even when the FSs at the 45S rDNA loci were observed by atomic force microscopy (AFM) (Huang et al. 2009).

The chromatin fibers evidenced by AFM and deconvolution at FSs of *Lolium* had a thickness of about 60 nm, composed of just two 30-nm

single fibers of chromatin. As the thickness throughout DNA fibers was not uniform, different levels of DNA packing are likely and indicate different degrees of chromatin folding at different locations within the 45S rDNA regions (Huang et al. 2009). The authors suggested failures in the folding of 45S rDNA containing chromatin as the reason for the FSs observed in *Lolium*.

In humans, transcriptionally highly active genic regions with reduced DNA condensation and sequences rich in CG dinucleotides and CCG trinucleotides probably preventing a correct packing of the DNA are related to FSs expression (Wang and Griffith 1996; Barlow et al. 2013). Also in *Lolium* the fragile sites are correlated with the transcriptionally highly active and extended NOR-regions which show intense Ag-NOR staining and CMA bands indicating CG-rich sequences (Huang et al. 2012; Bustamante et al. 2014; Rocha et al. 2015). Thus, high levels of transcription might explain the spontaneous formation of 45S rDNA lesions in *Lolium* (Huang et al. 2012).

Although chromatin fibers have not been observed in all FSs of *Lolium*, no loss of chromosome fragments occurs. Thus, it is likely that these FSs are efficiently condensed during subsequent stages of the cell cycle. Rocha et al. (2015) observed a decreased number of FSs in metaphases with higher compaction levels in *L. perenne*, indicating progressing chromatin condensation in these regions towards the cell division.

Other studies were published involving species not related to *Lolium* genus, describing the occurrence of FSs in transgenic maize (Waminal et al. 2013) and *Phleum echinatum* (Grabowska-Joachimciak et al. 2015). Therefore, we suggest that the chromatin fiber at the 45S rDNA sites previously reported as a FS can be a particular behavior of some kinds of grasses (*Lolium*, *Festuca*, *Festulolium* hybrids and *Phleum*), since it not occurs spontaneously in others grass species. However, Huang et al. (2012) identified the 45S rDNA loci as replication and transcription-dependent

fragile sites in plants after the use of inhibitors of replication (actinomycin D) and transcription (Aphidicolin) in barley, sorghum and maize. In the presence of ActD, NOR-region exhibited a dramatic change in chromatin condensation towards open chromatin and accumulation of incomplete transcripts of the 5' external transcribed spacer (5'ETS) at fragile point, accompanied by decreased levels of DNA methylation and H3K9ac, H3K9me2 and increased levels of histone acetylation and H3K4me2, suggesting that these epigenetic alterations are associated with the failure of the 45S rDNA condensation. These data might provide a link between 45S rDNA transcription and chromatin-packaging defects and open the door for further identification of the molecular mechanisms involved.

### **Conclusions**

In summary, we demonstrate that FSs in *Lolium*, *F. arundinacea* and in the corresponding hybrid Festulium do not result in detectable karyotypic changes or DNA loss. FSs expression in these species is likely related to a gene activity dependent decondensation of the 45S rDNA containing chromatin within the NOR regions.

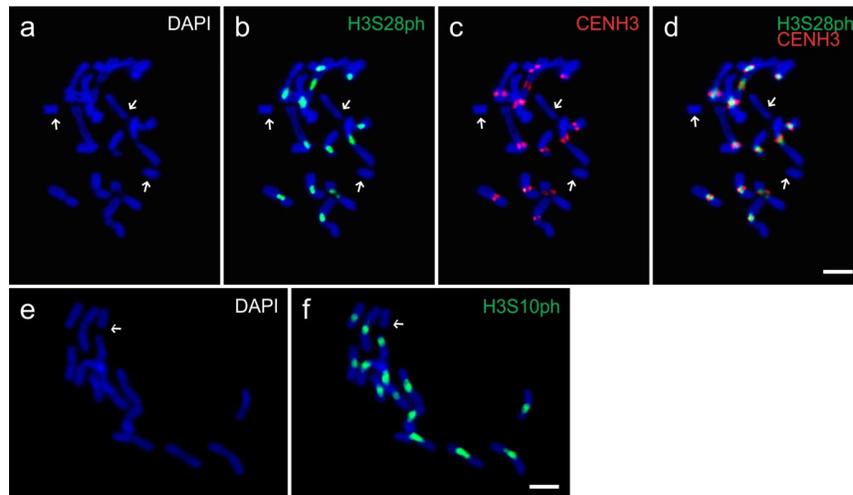
### **Acknowledgments**

The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development—CNPq, Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais—FAPEMIG, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—CAPES for the financial support to research and scholarship; and the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK).

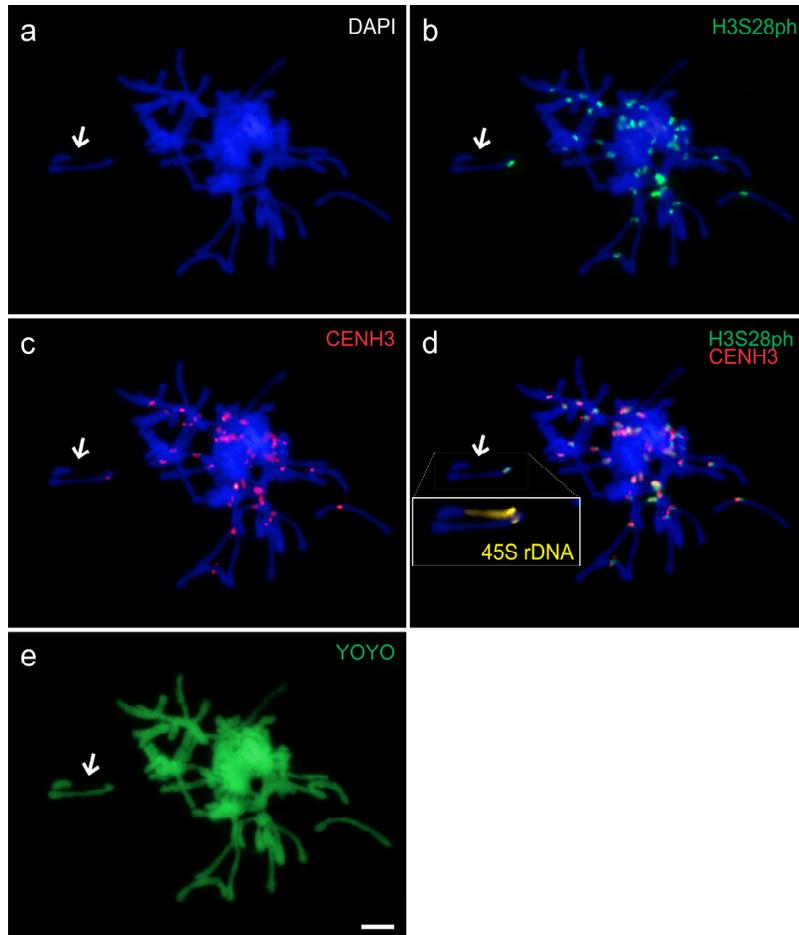
**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Considerações:** Esta é a versão preliminar submetida à revista Protoplasma que pode estar sujeita à alterações que venham a ser solicitadas pelo conselho editorial da revista.

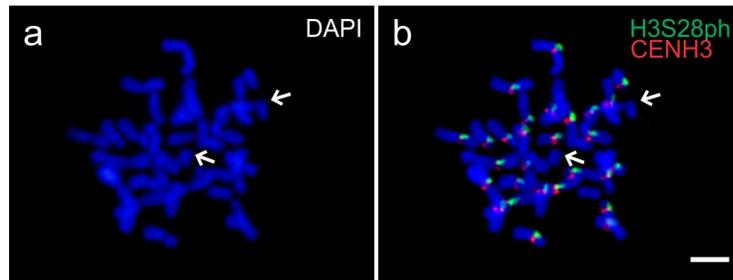
### Online resources



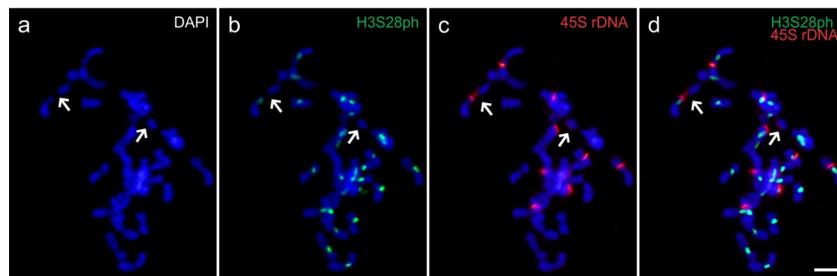
**Online resource 1:** Metaphase of *L. perenne* after immunostaining with antibodies recognizing CENH3, H3S28ph and H3S10ph. (a-d) CENH3 and H3S28ph. (e and f) H3S10ph. The white arrows indicate FISH signals and 'chromosome fragments'. Bars: 5 $\mu$ m



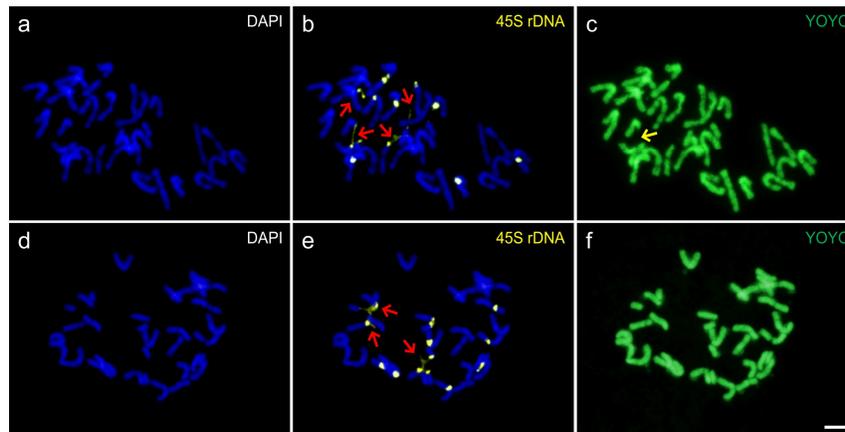
**Online resource 2:** Immunolocalization chromosomes of *F. arundinacea* after immunostaining with antibodies against CENH3 and H3S28ph, FISH with a 45S rDNA probe and YOYO staining. The white arrow indicates the chromatin fiber of a FS with an extended NOR-region. Bar: 5 $\mu$ m



**Online resource 3:** Metaphase of *Festulolium* 1885 after immunostaining with antibodies against CENH3 and H3S28ph. The white arrows indicate FSs and fragments. Bar: 5 $\mu$ m



**Online resource 4:** Metaphase of *Festulolium* 2185 after immunostaining with antibodies against H3S10ph and FISH with a 45S rDNA probe. The white arrows indicate FSs and fragments. Bar: 5 $\mu$ m



**Online resource 5:** Metaphases of *Festulolium* cultivars after FISH with a 45S rDNA probe and YOYO staining. a-c cultivar 2185. d-f cultivar 1885. The red arrows indicate 45S rDNA sites with extended NOR-regions which are only occasionally stainable with YOYO (yellow arrow). Bars 5 $\mu$ m

## References

- Aguilera A, Garcia-Muse T (2013) Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* 47:1-32. doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133232
- Barlow JH, Faryabi RB, Callen E, Wong N, Malhowski A, Chen HT, Gutierrez-Cruz G, Sun H, McKinnon P, Wright G, Casellas R, Robbani DF, Staudt L, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A (2013) Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. *Cell* 152:620-632. doi:10.1016/j.cell.2013.01.006
- Brown JD, O'Neill RJ (2010) Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:291-316. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141554
- Burrack LS, Berman J (2012) Neocentromeres and epigenetically inherited features of centromeres. *Chromosome res*, 20:607-619. doi: 10.1007/s10577-012-9296-x
- Bustamante FO, Rocha LC, Torres GA, Davide LC, Mittelman A, Techio VH (2014) Distribution of rDNA in Diploid and Polyploid *Lolium multiflorum* Lam. and Fragile Sites in 45S rDNA Regions. *Crop Sci* 54:1-9. doi: 10.2135/cropsci2013.05.0325
- Butler DK (1992) Ribosomal DNA is a site of chromosome breakage in aneuploid strains of *Neurospora*. *Genetics* 131:581-592.
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* 2:2233-2244. doi:10.1038/nprot.2007.310
- Freudenreich CH, Kantrow SM, Zakian VA (1998) Expansion and length-dependent fragility of CTG repeats in yeast. *Science* 279:853-856. doi: 10.1126/science.279.5352.853
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049-1051. doi: 10.1126/science.220.4601.1049
- Glover TW (2006) Common fragile sites. *Cancer Lett* 232:4-12. doi:10.1016/j.canlet.2005.08.032
- Grabowska-Joachimiak A, Kula A, Gernand-Kliefoth D, Joachimiak AJ (2015) Karyotype structure and chromosome fragility in the grass *Phleum echinatum* Host. *Protoplasma* 252:301-6. doi 10.1007/s00709-014-0681-5

Hall AE, Keith KC, Hall SE, Copenhaver GP, Preuss D (2004) The rapidly evolving field of plant centromeres. *Curr Opin Plant Biol* 7:108-114. doi:10.1016/j.pbi.2004.01.008

Houben A, Schroeder-Reiter E, Nagaki K, Nasuda S, Wanner G, Murata M, et al (2007) CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma* 116:275-283. Doi: 10.1007/s00412-007-0102-z

Huang J, Ma L, Yang F, Fei S-z, Li L (2008) 45S rDNA Regions Are Chromosome Fragile Sites Expressed as Gaps In Vitro on Metaphase Chromosomes of Root-Tip Meristematic Cells in *Lolium* spp. *PLoS ONE* 3:e2167. doi:10.1371/journal.pone.0002167

Huang J, Ma L, Sundararajan S, Fei S-z, Li L (2009) Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. *Protoplasma* 236:59-65. *Protoplasma* 236:59-65. doi: 10.1007/s00709-009-0051-x

Huang M, Li H, Zhang L, Gao F, Wang P, Hu Y, Yan S, Zhao L, Zhang Q, Tan J, Liu X, He S, Li L (2012) Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. *PLoS One* 7:e35139. doi:10.1371/journal.pone.0035139

Longhese MP, Mantiero D, Clerici M (2006) The cellular response to chromosome breakage. *Mol Microbiol* 60:1099-1108. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05186.x

Marshall OJ, Chueh AC, Wong LH, Choo K A (2008) Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution. *The American Journal of Human Genet*, 82(2), 261-282. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.11.009

Richards RI (2001) Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends in Genetics* 17:339-345. doi:10.1016/S0168-9525(01)02303-4

Rocha LC, de Oliveira Bustamante F, Silveira RA, Torres GA, Mittelmann A, Techio VH (2015) Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. *Protoplasma* 252:451-460. doi:10.1007/s00709-014-0690-4

Ruiz-Herrera A, Castresana J, Robinson TJ (2006) Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? *Genome Biol*

7:R115. doi:10.1186/gb-2006-7-12-r115

Ruiz-Herrera A, Robinson TJ (2007) Chromosomal instability in *Afrotheria*: fragile sites, evolutionary breakpoints and phylogenetic inference from genome sequence assemblies. *BMC EvolBiol*7:199. doi:10.1186/1471-2148-7-199

Sanei M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A (2011) Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. *Proc Natl AcadSci*108:E498-505

Singh M, Barman AS (2013) Chromosome breakages associated with 45S ribosomal DNA sequences in spotted snakehead fish *Channa punctatus*. *Mol Biol Rep* 40:723-729. doi 10.1007/s11033-012-2112-z

Song W, Dominska M, Greenwell PW, Petes TD (2014) Genome-wide high-resolution mapping of chromosome fragile sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl AcadSci U S A* 111(21):E2210-8. doi: 10.1073/pnas.1406847111

Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes II (1979) Distribution, phenotypic effects, and cytogenetics. *Am J Hum Genet*31:136-148

Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*2:196-206. doi:10.1038/35056049

Wang Y, Bigelow CA, Jiang Y (2009) Ploidy level and DNA content of perennial ryegrass germplasm as determined by flow cytometry. *HortScience*44:2049-2052

Waminal NE, Ryu KH, Choi SH, Kim HH (2015) Randomly detected genetically modified (GM) maize (*Zea mays* L.) near a transport route revealed a fragile 45S rDNA phenotype. *PLoS One* 8:e74060

Wang YH, Griffith J (1996) Methylation of expanded CCG triplet repeat DNA from fragile X syndrome patients enhances nucleosome exclusion. *J BiolChem* 271:22937-22940

Yudkin D, Hayward BE, Aladjem MI, Kumari D, Usdin K (2014) Chromosome fragility and the abnormal replication of the FMR1 locus in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 10.1093/hmg/ddu006

Zhang N, Threadgill DW, Womack JE (1992) Synteny mapping in the bovine: genes from human chromosome 4. *Genomics* 14:131-136. doi:10.1016/S0888-7543(05)80295-2

Šmarda P, Bureš P, Horová L, Foggi B, Rossi G (2008) Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany* 101:421-433.

**ARTIGO 2 - Sítios frágeis rDNA 45S de *Lolium multiflorum* não constituem *hotspots* para quebras cromossômicas induzidas por raio-X**

## RESUMO

Os sítios de rDNA 45S de *Lolium multiflorum* constituem regiões que apresentam alta descompactação do DNA em cromossomos metafásicos, formando regiões fracamente coradas com DAPI. Essas regiões são denominadas sítios frágeis (SFs), já amplamente estudada em humanos. Considerados como as regiões mais fracas do genoma, os SFs podem ser propensos à formação de fragmentos e rearranjos cromossômicos, exceto se mecanismos de reparo, tais como a formação de neotelômeros ou recombinação homóloga e não-homóloga, atuem no local de quebra do DNA. Assim, o objetivo desse estudo foi verificar se esses sítios constituem *hotspots* para a ocorrência de quebras induzidas por raios-X e se são regiões favoráveis à síntese de novos telômeros, tendo como modelo comparativo *Hordeum vulgare*. Para isso, plântulas de *L. multiflorum* e *H. vulgare* foram irradiadas com 20 e 50Gy de raio-X e avaliadas um dia após a irradiação, para verificar a presença de quebras cromossômicas e subsequentemente em intervalos de sete dias, por um período de 28 dias, utilizando FISH (Hibridização *in situ* fluorescente) com sondas de rDNA 45S e telomérica. As plantas de *H. vulgare* não sobreviveram após alguns dias da irradiação devido a alta taxa de anormalidades cromossômicas observadas nas análises de um dia. *L. multiflorum* também apresentou anormalidades nos dias subsequentes à exposição, mas ao longo dos 28 dias de avaliação apresentou redução na taxa de danos cromossômicos. As quebras cromossômicas induzidas não ocorreram preferencialmente nos sítios de rDNA 45S de *L. multiflorum* e a formação de novos telômeros não foi detectada até 28 dias após a exposição à irradiação.

### ABSTRACT

Sites of rDNA 45S of *Lolium multiflorum* are regions with an increased DNA unpacking in metaphase chromosomes, constituting regions slightly stained with DAPI. These regions are denominated fragile sites (FSs) and they have been widely studied in humans. Considered to be the most fragile regions in the genome, the FSs might be prone to the formation of chromosome fragments and rearrangements, unless repairing mechanisms such as the de novo telomere formation or the homologous and non-homologous end joining recombination play a role at the break site of the DNA. Thus, this study aimed at investigating if such sites are hotspots for the occurrence of breakages induced by X-ray and if they are regions favorable to the synthesis of new telomeres, using *Hordeum vulgare* as a comparative model. In this regard, *L. multiflorum* and *H. vulgare* seedlings were irradiated with 20 and 50Gy X-ray and evaluated one day following the irradiation in order to investigate the presence of chromosome breakages and thereafter at seven-day intervals for a 28-day period, using FISH (fluorescence *in situ* hybridization) with 45S rDNA and telomeric probes. *H. vulgare* plants did not survive after a few days of irradiation due to the increased rate of chromosomal abnormalities observed in the analysis of one day. *L. multiflorum* also exhibited abnormalities in the days following the exposure, yet over the 28-day trial it had a decrease in the chromosomal damage rate. The chromosomal breakages induced have not occurred preferably in the rDNA 45S sites of *L. multiflorum* and the formation of de novo telomere has not been detected up to 28 days after the exposure to the irradiation.

## INTRODUÇÃO

Quebras na dupla fita de DNA (QDFs) podem levar à ruptura dos cromossomos resultando em rearranjos cromossômicos e na perda de DNA devido à eliminação de fragmentos, o que pode representar risco à estabilidade do genoma (GOSPODINOV; HERCEG, 2013). Entretanto, muitos dos danos pré-clastogênicos, podem ser corretamente reparados por diferentes mecanismos (SCHUBERT et al., 2004). O entendimento das consequências dessas quebras, bem como da atuação dos mecanismos de reparo celular podem ser elucidados com base em estudos envolvendo a indução de quebras no DNA (MANOVA; STOILOV, 2003; TSUJIMOTO et al., 1999).

Uma das formas de induzi-las é através da exposição à radiação ionizante, cujas partículas altamente energizadas colidem com as moléculas de água próximas à cadeia de DNA criando radicais OH livres que, por sua vez, reagem com o DNA gerando quebras na fita simples (BALASUBRAMANIAN; POGOZELSKI; TULLIUS, 1998; CANNAN; PEDERSON, 2015). A radiação ionizante tem sido utilizada por diversos autores visando entender como funcionam os mecanismos de reparo do DNA e quais são as consequências das alterações provocadas no genoma (BERARDINELLI et al., 2013; FRIEBE et al., 2001; LAVELLE; FORAY, 2014; SLIJEPCEVIC; BRYANT, 1998).

A ocorrência de QDFs pode ativar mecanismos de reparo tais como a recombinação homóloga (RH) ou a recombinação não homóloga (RNH) para promover a estabilidade do genoma religando as extremidades das fitas de DNA (JACKSON, 2002; LAMB; SHAKIROV; SHIPPEN, 2012; LANGERAK; RUSSELL, 2011; LYSÁK; SCHUBERT, 2013). Alternativamente, as QDFs podem ser reparadas pela adição de sequências teloméricas nos locais de quebra do DNA, através da formação de novos

telômeros, fenômeno conhecido como *de novo* telomérico ou *healing chromosome* (MELEK; SHIPPEN, 1996; MURNANE 2012; RIBEYRE; SHORE, 2013; SLIJEPCEVIC; BRYANT, 1998). O reparo de quebras no DNA através da atividade neotelomérica é mais favorável em sequências repetitivas constituídas de nucleotídeos G, pois elas servem de substrato para que a telomerase inicie a adição de sequências teloméricas (BOSE et al., 2014). Em plantas, Tsujimoto et al. (1999) relataram que sequências teloméricas foram adicionadas à dinucleotídeos GG em linhas de deleção do cromossomo 1B no rDNA 45S de *Triticum aestivum*.

Alguns autores tem demonstrado que a distribuição dos pontos de quebras cromossômicas não é aleatória e que as regiões heterocromáticas, formadas de DNA altamente repetitivo, representam *hotspots* para aberrações (SCHUBERT et al., 1994, 2004). Em *Lolium multiflorum* e *L. perenne*, estudos demonstraram que os sítios de rDNA 45S, ricos em nucleotídeosCG, são locais do genoma com expressão de sítios frágeis (SFs) que promovem quebras e geração de fragmentos (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2008, 2009; ROCHA et al., 2015). Entretanto, ROCHA et al. (artigo 1), mostraram que essas regiões se caracterizam por uma alta descompactação da cromatina que resulta na aparente segmentação do cromossomo na região 45S, sem haver ruptura completa e perda de DNA. A forma como os SFs se expressam e como mantêm a sua estabilidade ainda é motivo de estudos nas espécies de *Lolium*.

O estudo do comportamento dos SFs frente ao efeito da irradiação ionizante em conjunto com a localização dos sítios de rDNA 45S, via FISH, são estratégias que podem ser usadas para melhor entendimento do envolvimento dessa sequências na formação de quebras cromossômica e da da recuperação do genoma ao longo do tempo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi verificar se os sítios de rDNA 45S em *Lolium*, caracterizados como sítios frágeis, constituem *hotspots* para quebras cromossômicas induzidas por irradiação ionizante seguidas da formação de fragmentos

cromossômicos e se estes são alvos do mecanismo de reparo via adição de sequências teloméricas favorecendo a síntese de novos telômeros. Para tanto, metáfases de células meristemáticas de *L. multiflorum* expostas a raio-x foram avaliadas e as regiões de rDNA 45S marcadas com FISH para que o comportamento dos SFs e a eficiência de recuperação do genoma fossem observados, tendo *Hordeum vulgare* como modelo comparativo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *Lolium multiflorum* (cv. Barjumbo;  $2n=4x=28$ ), *Hordeum vulgare* tetraploide (cv. MBE 13128a40;  $2n=4x=26$ ) foram germinadas em placa de Petri com papel filtro, em temperatura ambiente. Durante a germinação, as sementes de *H.vulgare* foram mantidas protegidas da luz. Após o desenvolvimento, as plântulas foram irradiadas com raio-X (20Gy e 50Gy) no Institute for Breeding Research and Horticultural Crops, Quedlimburg, Alemanha. As raízes foram coletadas 1 e 7 dias após a irradiação para verificar a ocorrência de quebras cromossômicas. As lâminas foram preparadas conforme descrito abaixo.

Posteriormente, 50 plantas de *L. multiflorum* e *H. vulgare* de cada dosagem de irradiação foram cultivadas em casa de vegetação e as raízes foram coletadas 14, 21 e 28 dias após a exposição ao raio-X. As raízes coletadas foram pré-tratadas em água gelada por 24h e fixadas em Carnoy (3 álcool etílico:1 ácido acético). As lâminas foram confeccionadas usando a técnica de gotejamento. Para isso, o material fixado foi lavado, por duas vezes, em água destilada e, uma vez, em tampão citrato pH 6,0. A digestão enzimática foi feita com 0,1% de citohelicase e pectoliase e 0,7% de celulase, diluídas no mesmo tampão de lavagem. Esse último procedimento foi realizado em estufa, a 37°C, por 1h e interrompido com duas lavagens de 5 minutos em tampão citrato gelado.

A FISH foi realizada de acordo com Ma et al. (2010) usando sequências de rDNA 45S (pTa71 de *Triticum aestivum* L.) marcada com

Alexa Fluor 488 e sequências teloméricas (Ara-telo TAMRA de *Arabidopsis thaliana*) marcada com Atto-550 11-dUTP. Para isso, as lâminas foram lavadas em SSC 2X (Solução salina citrato) por 5 minutos cada e pós-fixadas em paraformaldeído 2,5% em SSC 2X (pH 8,0) por 10 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas novamente em SSC 2X, por três vezes, de 5 minutos, desidratadas em série alcoólica e secas. As sondas foram desnaturadas a 75°C, por 5 minutos, e mantidas em gelo para prevenir a renaturação. A desnaturação das lâminas foi feita em placa aquecedora a 85°C, por 1 minuto e 40 segundos. A hibridização se deu a 37°C por cerca de 16 h. No segundo dia, o banho de estringência foi feito a 58°C, por 20 minutos e as lâminas foram montadas em vectashield com DAPI.

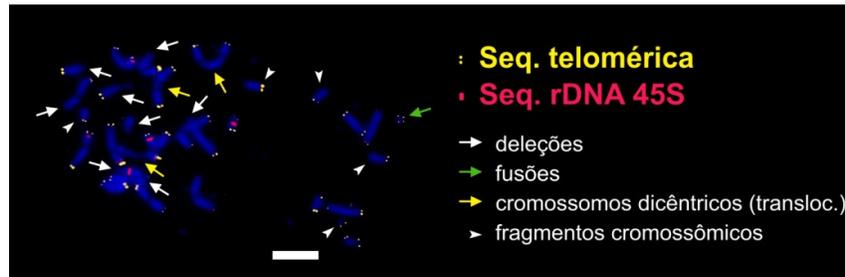
As imagens foram digitalizadas usando o microscópio Olympus BX61 (Olympus; <http://www.olympus.com>) equipado com câmera ORCA-ER CCD (Hamamatsu; <http://www.hamamatsu.com>). Imagens com escala de cinza foram pseudo-coradas utilizando-se o software de imagens Adobe Photoshop.

Nas melhores metáfases de *L. multiflorum* e *H. vulgare* foram quantificados cromossomos com deleção em uma ou ambas as extremidades devido a ausência de sinal teloméricos, fragmentos cromossômicos com ausência de sinal telomérico em uma ou ambas as extremidades e translocações cromossômicas. Para averiguar a formação de neotelômeros foram avaliados cromossomos com deleção e fragmentos cromossômicos. Adicionalmente, foram quantificados 400 células interfásicas, em cada tempo após a irradiação, visando analisar o número de micronúcleos. As análises cromossômicas em *Hordeum vulgare* foram usadas para fins de comparação dos efeitos da irradiação com *L. multiflorum*.

## RESULTADOS

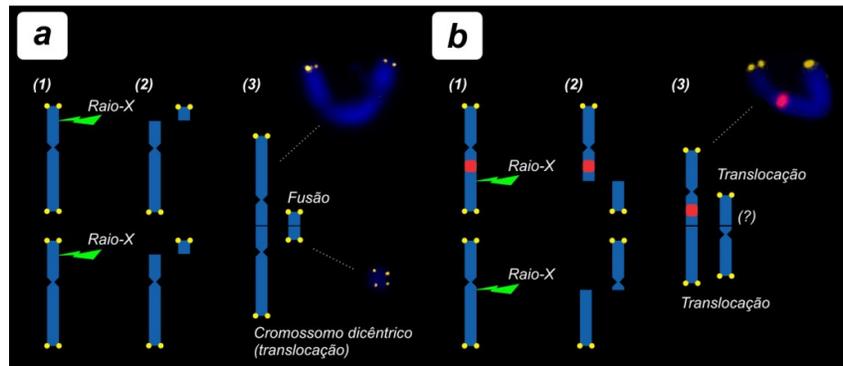
A irradiação com a dosagem de 50Gy promoveu quebras cromossômicas em ambas espécies (Figura 1 e 3A) que foram observadas

logo 1 dia após a exposição. O mesmo não ocorreu com a dosagem com 20Gy de raio-x, pois os cromossomos de *Lolium* permaneceram íntegros.



**Figura 1.** Metáfase de *H. vulgare* tetraploide obtida 1 dia após a irradiação com dosagem de 50Gy de raio-X. Barra 10 $\mu$ m.

Alterações como deleções, fissões-fusões e translocações ocorreram em ambas as espécies (Figura 1, 2 e 3A e Tabela 1). As translocações geraram cromossomos com dupla constrição (cromossomos dicêntricos) sem marcas de rDNA 45S e fragmentos acêntricos, os quais sofreram fusão. Estes fragmentos, após fusão, foram observados com ambas extremidades marcadas com a sonda telomérica (Figura 2A). Os cromossomos com morfologia e posição de rDNA 45S não usual para *L. multiflorum* também se formaram como consequência das translocações (Figura 2B). No entanto, o número de translocações e deleções foi mais pronunciado em *H. vulgare* (Figura 1 e Tabela 1). A maior frequência de micronúcleos, no primeiro dia após a exposição, foi observada para *L. multiflorum* (7%) em relação a *H. vulgare* (3,75%) (Tabela 1).



**Figura 2.** A – Quebras induzidas por irradiação que resultaram em translocação, fusão e formação de cromossomo dicêntrico e fragmento acêntrico em cromossomos de *H. vulgare*. B - Quebras cromossômicas seguida de translocações envolvendo cromossomos com sítios de rDNA 45S (vermelho) de *L. multiflorum*. (1) Ação do raio-X, (2) quebras cromossômicas e (3) Fusão e translocação.

Em ambas as espécies, as quebras cromossômicas aconteceram em regiões intersticiais e subterminais, gerando fragmentos de tamanhos diferentes acompanhados ou não de sequências teloméricas na região terminal (Figura 1 e 3A). Nas metáfases de *L. multiflorum* foram observados, no máximo, dois fragmentos gerados por quebras nos sítios de rDNA 45S (Figura 3A), enquanto em *H. vulgare* não foram observadas quebras nessa região em nenhuma das metáfases analisadas (Figura 1).

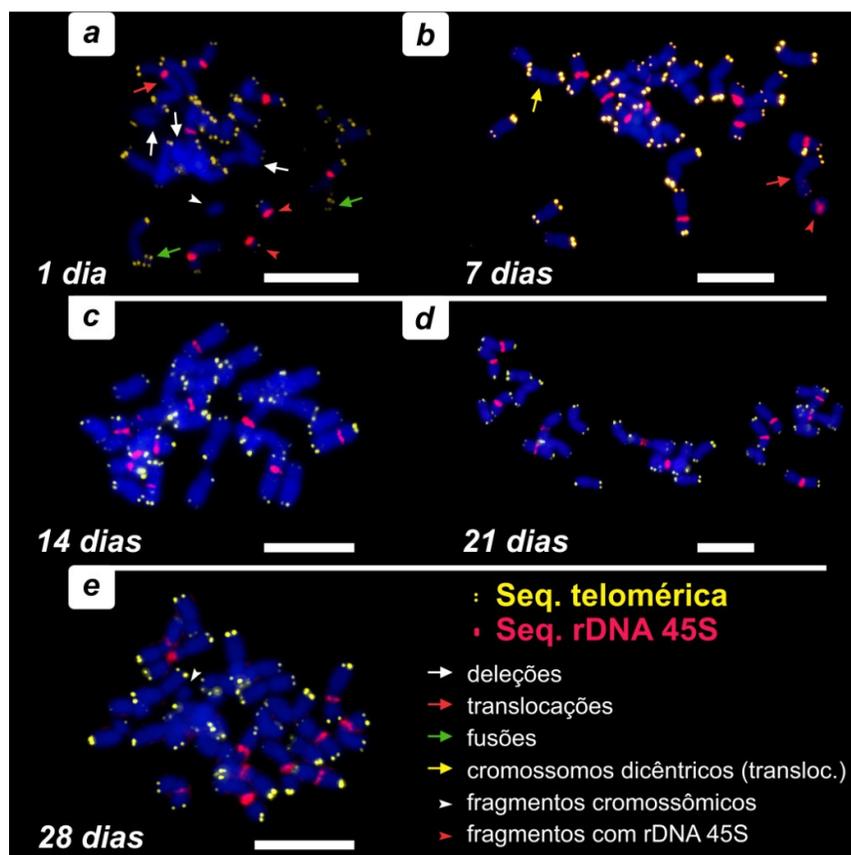
**Tabela 1.** Número mínimo e máximo de anormalidades cromossômicas, média de cada anormalidade por metáfase observada e porcentagem de micronúcleos (MNs) em 400 células interfásicas de *L. multiflorum* e *H. vulgare* 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a irradiação com 50 Gy de raio-X.

<b>Espécie/ tempo pós irradiação</b>	<b>Deleções</b>	<b>Translocações</b>	<b>Fusões</b>	<b>Fragmentos</b>	<b>MNs %</b>
<b><i>H. vulgare</i></b>					
<b>1 dia (6) *</b>	3 a 8	0 a 5	0 a 2	0 a 5	3,75
<i>média</i>	6,83	1,5	0,66	2,84	
<b><i>L. multiflorum</i></b>					
<b>1 dia (5) *</b>	1 a 5	0 a 1	0 a 2	1 a 5	7
<i>média</i>	2,6	0,2	1	3	
<b>7 dias (8)</b>	0 a 1	0 a 2	0	0 a 1	4
<i>média</i>	0,25	0,38	0	0,38	
<b>14 dias (5) *</b>	0	0	0	0	0,75
<i>média</i>	0	0	0	0	
<b>21 dias (7) *</b>	0	0	0	0	1,75
<i>média</i>	0	0	0	0	
<b>28 dias (7) *</b>	0 a 1	0 a 1	0	0 a 1	0,25
<i>média</i>	0,57	0,57	0	0,57	

\* Número de metáfases observadas entre parenteses.

Durante os 28 dias de avaliação, a taxa de sobrevivência de *L. multiflorum* foi de, aproximadamente, 100% e apenas pequenas diferenças no desenvolvimento entre elas foram observadas. Entretanto, nenhuma das plantas de *H. vulgare* sobreviveu após uma semana da irradiação com 50Gy.

Em *L. multiflorum*, houve redução do número de anormalidades cromossômicas e na porcentagem de MNs nas análises feitas a partir do sétimo dia após a exposição (Tabela 1). No primeiro dia após a irradiação, as metáfases apresentaram de três a cinco fragmentos, vários cromossomos com deleção terminal ou subterminal e fragmentos acêntricos (Figura 3 A). Aos sete dias, apenas três das oito metáfases apresentaram um fragmento cada e as demais anormalidades cromossômicas também ocorreram em menor frequência, juntamente com a porcentagem de micronúcleos que decresceu de 7% para 4% (Figura 3 B e Tabela 1).



**Figura 3.** Metáfases de *L. multiflorum* irradiado com 50Gy de raio-X observadas 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a exposição. Barra 10 $\mu$ m

Após 14 e 21 dias da exposição, não foram observadas deleções, translocações e fragmentos e a porcentagem de MNs foi menor do que a observada no sétimo dia (Figura 3C e D, Tabela 1). No 28<sup>o</sup> dia, a porcentagem de micronúcleos reduziu para 0,25% e foram observados poucas deleções, translocações e fragmentos (Figura 3E e Tabela 1). A atividade neotelomérica em *L. multiflorum* não foi detectada nas análises realizadas até o 28<sup>o</sup> dia.

## DISCUSSÃO

A irradiação ionizante foi mais deletéria para o genoma de *H. vulgare* do que para *L. multiflorum*. Isso foi evidenciado pelo maior número de anormalidades cromossômicas e pela morte das plantas de *H. vulgare* expostas a irradiação.

As anormalidades observadas em *H. vulgare*, avaliado 1 dia após a exposição a 50Gy de irradiação, foram caracterizadas principalmente por deleções e rearranjos cromossômicos, como translocações e fusões. Tais anormalidades podem ter contribuído para a letalidade nessa condição, uma vez que têm o potencial de inibir o crescimento vegetal e causar a perda de viabilidade celular (WATERWORTH et al., 2011).

Os cromossomos dicêntricos, oriundos das translocações, observados em *H. vulgare* contribuíram para a instabilidade genômica. Segundo Murnane (2012), cromossomos dicêntricos se quebram durante a divisão e formam extremidades desprotegidas que são susceptíveis a novos eventos de fusão. A recorrência desses eventos pode gerar sucessivos ciclos de quebra-fusão-ponte, resultando em extensivos rearranjos no genoma incluindo translocações não recíprocas, deleções e aneuploidias. Esses eventos podem explicar a menor frequência de micronúcleos para *H. vulgare* em relação a *L. multiflorum*, uma vez que o material genético estava primariamente envolvido nos rearranjos.

A redução no número de anormalidades e micronúcleos observados no sétimo dia após a irradiação em *L. multiflorum* indica que apenas as células normais ou com baixa taxa de anormalidades foram mantidas e sofreram mitose. As células com graves danos cromossômicos, tais como translocações e deleções, possivelmente foram eliminadas. Esta estratégia de acionamento da apoptose em células danificadas tem sido considerado um mecanismo que impede a transmissão de erros genéticos para células filhas. A morte celular não se dá somente pela inativação do genoma, mas preferencialmente é baseada na ativação de um complexo de enzimas que

resultam na apoptose, autofagia devido à incapacidade de reparo do DNA resultando na eliminação da célula em um tecido (ROOS; KAINA, 2006).

Em células animais, um Gy de irradiação ionizante induz aproximadamente 200 modificações de base, 1000 quebras de fita simples e até 35 quebras na dupla fita de DNA por célula, essas consideradas as mais importantes lesões por irradiação ionizante (GOODHEAD, 1994; NIKJOO et al., 1998; ROTHKAMM; LOBRICH, 2003). Apesar de não se ter conhecimento desses número em plantas, após a irradiação com 50Gy, os cromossomos em muitas metáfases de *L. multiflorum* se mantiveram íntegros durante o período experimental. Esse comportamento pode estar relacionada à uma série de eventos como, por exemplo, a restituição de quebras através da RH e RNH que permitem que os efeitos clastogênicos não ocorressem após a indução de quebras. A RH consiste na síntese de DNA a partir das extremidades rompidas, utilizando como base sequências homólogas presentes nessa região, atuando principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular. A RNH, por sua vez, promove essa ligação na total ausência de homologia ou em níveis de homologia muito baixos, sendo por isso reconhecida como "recombinação ilegítima" (LYSÁK; SCHUBERT, 2013). Ambos os mecanismos são essenciais para manter a estabilidade cromossômica, embora RH seja reconhecidamente mais eficiente e segura (JACKSON, 2002; LAMB; SHAKIROV; SHIPPEN, 2012; LANGERAK; RUSSELL, 2011; LYSÁK; SCHUBERT, 2013).

A estratégia de reparo via formação de neotelômeros não foi confirmada em *L. multiflorum*. Embora sejam reconhecidos como SFs nessa espécie e ricos em nucleotídeos C-G, os sítios de rDNA 45S não foram locais preferenciais de quebras por indução de raio X e não ofereceram condições de substrato para ação da telomerase formar novos telômeros. Segundo Bose et al. (2014) o reparo de quebras no DNA através da atividade neotelomérica é mais favorável em sequências repetitivas constituídas de nucleotídeos G, pois elas servem de substrato para que a telomerase inicie a

adição de sequências teloméricas (BOSE et al., 2014). De maneira geral, essa formação ocorre em baixa frequência, uma vez que a telomerase recrutada para recuperar pontos de quebra pode ser impedida de intervir na ausência de um trecho mínimo de sequências repetitivas adjacentes (RIBEYRE; SHORE, 2013). Ademais, alguns autores afirmam que a formação neotelomérica por meio da formação de novos telômeros nos pontos de quebra é reconhecidamente um evento raro e não aleatório (LAMB; SHAKIROV; SHIPPEN, 2012; RIBEYRE; SHORE, 2013).

Embora a ocorrência de neotelômeros ectópicos não tenha sido observada, a hipótese de que esse tipo de reparo possa ocorrer em alguns pontos de quebra em *L. multiflorum* não deve ser totalmente descartada. Um dos fatores que deve ser levado em conta é o tempo para síntese de neotelômeros pós-exposição. Em *Luzula elegans*, por exemplo, foram necessárias três semanas após o período de exposição à irradiação com raio-X para formação de neotelômeros (JANKOWSKA et al, 2015). Esse comportamento pode ter sido favorecido pelo fato dessa espécie ser holocêntrica e assim evitar a eliminação dos fragmentos.

Quebras ou lesões nos cromossomos de *L. multiflorum* foram observadas em diversas regiões intersticiais, mas não ocorreu nos sítios de rDNA 45S. Em condições normais, sem indução, Rocha et al. (artigo 1) demonstraram que, em *L. multiflorum*, sítios de rDNA 45S se caracterizam por uma alta descompactação da cromatina que resulta na aparente segmentação do cromossomo na região 45S, sem haver ruptura completa e perda de DNA. Manova e Stoilov (2003) afirmaram que quebras no rDNA de *H. vulgare* induzidas por raios- $\gamma$  não influenciaram o processo de transcrição dos genes ribossômicos, indicando que essas quebras foram eficientemente recuperadas por meio de recombinação homóloga nessa espécie, comparadas às demais regiões onde as quebras também ocorreram.

Os sítios frágeis são regiões cromossômicas altamente preferenciais para a quebras devido ao estresse replicativo ou oxidativo (GEORGAKILAS

et al., 2014; TSANTOULIS et al., 2008). No entanto, segundo Nikitaki; Georgakilas e Ravanat (2015) essas regiões não são necessariamente relacionadas com os sítios do genoma onde a irradiação interage criando um fenômeno cumulativo no genoma. Foltánková et al. (2013) ao compararem o reparo do DNA de SFs e do rDNA em humanos após o uso de irradiação do tipo gamma, observaram que as respostas aos danos se dão epigeneticamente de forma distintas nessas regiões. Os níveis de P53 e  $\gamma$ H2Ax são maiores após a indução em ambos, no entanto os níveis de eucromatina e heterocromatina são diferentes entre os SF e o rDNA. Nesses estudos, os autores confirmam que entre os genes ribossomais e SFs há especificidade na resposta aos danos no DNA.

Quando comparadas a outros grupos, as plantas possuem um grande número de cópias de rDNA, que pode totalizar 10% do genoma (GUERRA, 2012; KOBAYASHI, 2011). Essa quantidade de cópias permite a otimização do reparo de quebras no rDNA por viabilizar a coesão entre as cromátides irmãs e, assim, favorecer a atuação dos mecanismos reparadores conforme foi observado para leveduras (IDE et al., 2010, KOBAYASHI, 2011). Isso pode explicar, em partes, a recuperação e estabilidade observada em *L. multiflorum* após 28 dias da exposição ao raio-X e a ausência de quebras nos sítios de rDNA 45S também observada em *H. vulgare*, que de forma direta não contribuíram para os efeitos deletérios inviabilizando a sobrevivência das plantas.

Mesmo sendo considerados regiões frágeis do genoma, os sítios de rDNA 45S de *Lolium* que apresentam ampla distensão da cromatina, não são pontos propícios à quebras cromossômicas, tanto naturalmente, ou seja, sem tratamentos, quanto após a indução de quebras cromossômicas. Questionamentos sobre essa fragilidade no rDNA 45S devem ser levantados, podendo até se considerar se o fenômeno é o mesmo que ocorrem em humanos, outros animais e leveduras ou se é um fenômeno particular em plantas, mais especificamente em gramíneas.

## CONCLUSÃO

A irradiação com raio-X foi mais deletéria sobre *H. vulgare* em comparação com *L. multiflorum*.

Os sítios de rDNA 45S, não constituem *hotspots* para a formação de quebras cromossômicas induzidas com 50Gy de raio-X e, portanto, não devem ser considerados sítios frágeis do genoma de *Lolium multiflorum*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Institute for Breeding Research and Horticultural Crops, em Quedlimburg, Alemanha e a pesquisadora Evelyn Klocke pela indução de irradiação, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro à pesquisa e concessão de bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

BALASUBRAMANIAN, B.; POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 17, p. 9738-9743, 1998.

BERARDINELLI, F. et al. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts. **Environmental and molecular mutagenesis**, Hoboken, v. 54, n. 3, p. 172-179, 2013.

BOSE, P. et al. Tandem repeats and G-rich sequences are enriched at human

CNV breakpoints. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 7, July 2014.

BUSTAMANTE, F. O. et al. Distribution of rDNA in diploid and poliploid *Lolium multiflorum* Lam. reveals fragile sites in 45S rDNA region. **Crop Science**, Madison, v. 54, n. 2, p. 617-625, 2014.

CANNAN, W. J.; PEDERSON, D. S. Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 231, n. 1, p. 3-14, Mar. 2015.

FOLTÁNKOVÁ, V. et al. DNA-damage response in chromatin of ribosomal genes and the surrounding genome. **Gene**, Amsterdam, v. 522, n. 2, p. 156-167, June 2013.

FRIEBE, B. et al. Chromosome healing by addition of telomeric repeats in wheat occurs during the first mitotic divisions of the sporophyte and is a gradual process. **Chromosome Research**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 137-146, 2001.

GEORGAKILAS, A. G. et al. Are common fragile sites merely structural domains or highly organized “functional” units susceptible to oncogenic stress? **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 71, n. 23, p. 4519-4544, Sept. 2014.

GOODHEAD, D. T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 65, n. 1, p. 7-17, Jan. 1994.

GOSPODINOV, A.; HERCEG, Z. Chromatin structure in double strand break repair. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 12, n. 10, p. 800-810, 2013.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: the end of childhood. **Plant Biosystems**, Abingdon, v. 146, n. 3, p. 703-710, Aug. 2012.

HUANG, J. et al. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, p. 1-7, 2008.

HUANG, J. et al. Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. **Protoplasma**, Sachsenplatz, v. 236, p. 59-65, July 2009.

IDE, S. et al. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. **Science**, New York, v. 327, n. 5966, p. 693-696, Feb. 2010.

JACKSON, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 23, n. 5, p. 687-696, 2002.

JANKOWSKA, M. et al. Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. **Chromosoma**, Berlin, p. 1-10, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26062516>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

KOBAYASHI, T. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. **Cellular Molecular Life Science**, Basel, v. 68, n. 8, p. 1395-1403, 2011.

LAMB, J. C.; SHAKIROV, E. V.; SHIPPEN, D. E. Plant telomeres. In: \_\_\_\_\_. **Plant cytogenetics**. New York: Springer, 2012. p. 143-191.

LANGERAK, P.; RUSSELL, P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 366, n. 1584, p. 3562-3571, 2011.

LAVELLE, C.; FORAY, N. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 49, p. 84-97, Apr. 2014.

LYSÁK, M. A.; SCHUBERT, I. **Mechanisms of chromosome rearrangements**. Vienna: Springer, 2013. 147 p.

MA, L. et al. Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. **Chromosome Research**, Oxford, v. 18, n. 7,

p. 841-850, 2010.

MANOVA, V. I.; STOILOV, L. M. Induction and recovery of double-strand breaks in barley ribosomal DNA. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 2, n. 9, p. 983-990, 2003.

MELEK, M.; SHIPPEN, D. E. Chromosome healing: spontaneous and programmed *de novo* telomere formation by telomerase. **Bioessays**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 301-308, 1996.

MURNANE, J. P. Telomere dysfunction and chromosome instability. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 730, n. 1/2, p. 28-36, 2012.

NIKITAKI, Z.; GEORGAKILAS, A. G.; RAVANAT, J. L. Stress-induced DNA Damage biomarkers: applications and limitations. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 3, n. 35, p. 1-15, June 2015.

NIKJOO, H. et al. Track structure in radiation biology: theory and applications. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 73, n. 4, p. 355-364, Apr. 1998.

RIBEYRE, C.; SHORE, D. Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. **Chromosoma**, Berlin, v. 122, n. 3, p. 159-173, 2013.

ROCHA, L. C. et al. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, Sachsenplatz, v.252, n. 2, p. 451-460, 2015.

ROCHA, L. C. et al. Decondensation of chromosomal 45S rDNA sites in *Lolium* and *Festuca* genotypes does not result in karyotype instability. **Artigo 1 que compõe a presente tese submetido a revista Protoplasma em 2015.**

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 12, n. 9, p. 440-450, 2006.

ROTHKAMM, K.; LOBRICH, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 9, p. 5057-5062, Feb. 2003.

SCHUBERT, I. et al. DNA damage processing and aberration formation in plants. **Cytogenetics and Genome Research**, Würzburg, v. 104, n. 1/4, p. 104-108, Jan. 2004.

SCHUBERT, I. et al. Sequence organization and the mechanism of interstitial deletion clustering in a plant genome (*Vicia faba*). **Mutation Research**, Amsterdam, v. 325, n. 1, p. 1-5, Sept. 1994.

SLIJEPCEVIC, P.; BRYANT, P. E. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of radiation-induced chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, London, v. 73, n. 1, p. 1-13, 1998.

TSANTOULIS, P. K. et al. Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions: a genome-wide study. **Oncogene**, Cambridge, v. 27, n. 23, p. 3256-3264, Dec. 2008.

TSUJIMOTO, H. et al. *De novo* synthesis of telomere sequences at the healed breakpoints of wheat deletion chromosomes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 262, n. 4/5, p. 851-856, 1999.

WATERWORTH, W. M. et al. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. **New Phytologist**, Cambridge, v. 192, n. 4, p. 805-822, 2011.