



**LAIANE CORSINI ROCHA**

**SÍTIOS FRÁGEIS E SEQUÊNCIAS  
REPETITIVAS FUNCIONAIS EM  
CROMOSSOMOS DE *LOLIUM PERENNE* L.**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**LAIANE CORSINI ROCHA**

**SÍTIOS FRÁGEIS E SEQUÊNCIAS REPETITIVAS FUNCIONAIS  
EM CROMOSSOMOS DE *LOLIUM PERENNE* L.**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre.

Dra Vânia Helena Techio

Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2013**

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

Rocha, Laiane Corsini.

Sítios frágeis e sequências repetitivas funcionais em cromossomos de *Lolium perenne* L. / Laiane Corsini Rocha. – Lavras : UFLA, 2013.

69 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. rDNA. 2. Rearranjos cromossômicos. 3. RONS. 4. *Lolium*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

**LAIANE CORSINI ROCHA**

**SÍTIOS FRÁGEIS E SEQUÊNCIAS REPETITIVAS FUNCIONAIS  
EM CROMOSSOMOS DE *LOLIUM PERENNE* L.**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

Dra. Lisete Chamma Davide UFLA

Dra. Giovana Augusta Torres UFLA

Dra Vânia Helena Techio  
Orientadora

Dra Andréa Mitelmann  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2013**

*As carríssimas: Vânia, Raphaela, Natália e Fernandinha*

## OFEREÇO

*Aos meus amados pais, Maria e Luiz, que me criaram e me prepararam 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 dez 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, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Vânia Helena Techio, pela dedicação, comprometimento, por ser sempre tão solícita, por vibrar comigo por cada um dos resultados obtidos e por confiar no meu trabalho.

À Raphaela, minha fiel escudeira, meu braço direito. Esse trabalho é tão seu quanto meu.

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

Ao Prof. Sandro, meu orientador na graduação, o responsável por despertar a minha paixão pela citogenética.

Às Prof<sup>as</sup> Lisete e Giovana, pelas contribuições, por todo o conhecimento compartilhado e pela gentileza de sempre.

À Rose e Natália Souza, pela grande contribuição no estabelecimento das técnicas.

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

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

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

À Thaís, Ludmila e Jeanne pela amizade, pelos ensinamentos me acolherem em Lavras e pelas muitas risadas.

A todas (os) as (os) amigas (os) do Laboratório de Citogenética da UFLA pelo convívio harmonioso, pelo apoio em todos os momentos dessa jornada.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelas risadas, pelas infinitas horas de estudos, por toda ajuda diante das minhas dificuldades, aqui agradeço em especial à Juliana, Samira, Amanda e Camila.

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

Ao meu futuro esposo, meu companheiro Luiz Carlos, por toda dedicação, paciência, otimismo, alegria, amizade e amor.

Acima de tudo, a Deus pelo maior dos dons, a vida.

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

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério.  
É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte".

*Albert Einstein*



## RESUMO

*Lolium perenne* L., também conhecida como azevém perene, é considerada uma gramínea forrageira de alta qualidade e é amplamente utilizada em regiões de clima temperado para suprir a escassez de forragem durante o inverno. Na espécie já foram descritas algumas peculiaridades relacionadas aos aspectos citogenéticos, como a variabilidade em número e posição dos sítios de rDNA45S e a expressão dos sítios frágeis, que carecem de estudos mais aprofundados para subsidiar a compreensão de suas causas e consequências. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre a expressão dos sítios frágeis com as sequências repetitivas funcionais (rDNAs e teloméricas) em cromossomos de cultivares diploide e poliploide de *L. perenne*. As técnicas de FISH e de bandamentos Ag-NOR e fluorescente foram utilizadas para avaliar a distribuição dos sítios de rDNA 45S, 5S e das sequências teloméricas, a atividade transcricional dos genes ribossomais 45S e a distribuição de sequências ricas em AT e/ou GC em *L. perenne*, respectivamente. Houve variabilidade no número e na posição dos sítios de rDNA 45S, o que não foi observado para os sítios de rDNA 5S. Um dos genótipos avaliado apresentou dois sítios de rDNA 45S em um mesmo cromossomo, localizados em braços cromossômicos diferentes. Quebras e lesões foram evidenciadas no sítio de rDNA 45S na maioria das metáfases avaliadas de ambas as cultivares. Não foram detectadas sequências teloméricas na extremidade dos fragmentos cromossômicos correspondentes ao local de quebras nos sítios 45S. A atividade transcricional mostrou-se aparentemente alterada nos sítios fragilizados. Houve variação no número e tamanho dos nucléolos e fusões nucleolares foram evidenciadas. Todas as bandas CMA<sup>+</sup> estavam co-localizadas com os sítios 45S.

Palavras-chave: rDNA. Rearranjos cromossômicos. RONS. *Lolium* L..

## ABSTRACT

*Lolium perenne* L., a high quality forage grass known as perennial ryegrass, is widely used in temperate regions to supplement the lack of forage in winter. Some cytogenetic peculiarities o-ported for this species, such as variability in number and position of rDNA 45S sites and expression of fragile sites, require further studies to unravel their causes and consequences. Thus, this study aimed to evaluate the relationship between the fragile sites expression and functional repetitive sequences (rDNAs and telomeric) in chromosomes from diploid and polyploid cultivars of *L. perenne*. FISH and Ag-NOR and fluorescence banding were used to evaluate the distribution of rDNA 45S and 5S sites, telomeric sequences, transcriptional activity of the 45S ribosomal genes and distribution of AT and/or GC rich sequences in *L. perenne*, respectively. Variation on number and location of 45S rDNA sites was detected, but not on rDNA 5S sites. The tetraploid genotype showed two rDNA 45S sites on different arms of the same chromosome. Breaks and injuries were detected in rDNA 45S sites for most metaphases evaluated in both cultivars. We did not detect telomeric sequences at the end of chromosomal fragments corresponding to the breakage spots in the 45S sites. The transcriptional activity was apparently altered in fragile sites. We found variation in the number and size of nucleoli and nucleolar fusions as well. All CMA<sup>+</sup> bands were co-located with the 45S sites.

Keywords: rDNA. Chromosomal rearrangements. NORs. *Lolium* L..

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1 Origem, distribuição e taxonomia de espécies de <i>Lolium</i></b> .....	14
<b>2.2 Características botânico-agronômicas e melhoramento de azevém perene (<i>Lolium perenne</i>)</b> .....	17
<b>2.3 Aspectos citogenéticos de espécies <i>Lolium</i></b> .....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3.1 Material genético</b> .....	29
<b>3.2 Obtenção de meristemas e metáfases mitóticas</b> .....	29
<b>3.3 Bandamento cromossômico</b> .....	30
<b>3.3.1 Bandamento Ag-NOR</b> .....	30
<b>3.3.2 Bandamento CMA/DAPI</b> .....	30
<b>3.4 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)</b> .....	31
<b>3.5 Análise do cariótipo</b> .....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	34
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

*Lolium perenne* L., conhecido como azevém perene, é uma gramínea forrageira nativa da bacia do mediterrâneo com ampla distribuição nas regiões temperadas do mundo devido a sua capacidade de suprir a escassez de forragem durante os períodos mais frios do ano, somada às suas excelentes características agronômicas (TERREL, 1968; YAMADA et al., 2005). Essa espécie é naturalmente diploide, no entanto, cultivares tetraploides são desenvolvidas com o objetivo de otimizar a qualidade da forragem e a produtividade (BARKER et al., 2001; POLOK, 2007).

O *L. perenne* possui  $2n=2x=14$  cromossomos, nos quais três pares apresentam constrições secundárias associadas com bandas C e localizadas próximas à região centromérica (JAUHAR, 1993; MALIK; THOMAS, 1966; THOMAS, 1981). O número de constrições secundárias é correspondente ao número de marcações de regiões organizadoras do nucléolo (RONs) pela técnica de impregnação com prata, sendo detectados até seis nucléolos nos diploides e até 12 nos tetraploides (CARNIDE; ORELLANA, 1986).

Com a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) foram descritos para os diploides, sete sítios de genes ribossomais 45S, sendo um heterozigoto, e dois sítios 5S sendo estes últimos localizados no braço curto do cromossomo 3, em sintenia com um dos sítios de rDNA 45S (MALIK; THOMAS, 1966; THOMAS et al., 1996). A condição heterozigota para o gene 45S, o que resulta em número ímpar de genes ribossomais 45S, já foi observada em outras espécies de gramíneas do gênero *Paspalum* (VAIO et al., 2005) e *Hordeum* (TAKETA et al., 2001). Nestas espécies, a mobilidade gênica, o polimorfismo na população de origem, redução do tamanho dos sítios e deleções gênicas são mecanismos de evolução cariotípica que podem

estar envolvidos na origem do heteromorfismo do rDNA (TAKETA et al., 2001; VAIO et al., 2005).

Variações no número e localização dos genes ribossomais em cultivares diploides e poliploides de *L. perenne* já foram relatadas (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010; LIDEIKYTE et al., 2008). Nesses estudos, genótipos diploides apresentaram de quatro a sete sítios de rDNA 45S e, invariavelmente, dois sítios 5S. Nos tetraploides, a variação de número ocorreu tanto nos sítios 45S, de nove a 16, quanto nos 5S, de quatro a cinco sítios. Algumas plantas não apresentaram sintonia dos genes 45S e 5S no cromossomo 3, o que permitiu evidenciar mudanças de posição de um ou ambos os genes ribossomais.

Além dessas variações, estudos realizados também em *L. perenne* por Huang et al. (2008) mostraram que em algumas células meristemáticas havia maior número de cromossomos que o esperado para a espécie e sinais 45S na região terminal em número variável. Os autores demonstraram que estes sinais terminais eram provenientes da expressão de sítios frágeis, fenômeno já descrito em cromossomos humanos (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001). Essa expressão causava a ruptura total ou parcial exclusivamente nos sítios rDNA 45S dos cromossomos de *L. perenne*, gerando fragmentos que resultaram na contagem equivocada do número cromossômico. Recentemente, Bustamante (2012) também relatou a variabilidade para o sítio de rDNA 45S e a ocorrência de sítios frágeis em genótipos diploides e tetraploides de *L. multiflorum* e em uma progênie resultante do cruzamento entre esses genótipos.

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na variação do número e posição dos sítios de rDNA 45S tanto interespecífica quanto intraespecífica, tais como: diferentes rearranjos cromossômicos; permuta genética desigual; conversão, transposição gênica e a expressão dos sítios frágeis (BROWN; O'NEILL, 2010; DATSON; MURRAY, 2006;

DUBCOVSKY; DVORAK, 1995; RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b; SCHUBERT; WOBUS, 1985; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). Em *Lolium*, além de ser um mecanismo potencial para variabilidade no número e posição dos blocos de rDNA 45S, a ocorrência dos sítios frágeis pode levar a alterações no genoma que podem estar relacionadas a evolução e surgimento de novas espécies (BROWN; O'NEILL, 2010; RUIZ-HERRERA; ROBINSON, 2007). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre a expressão dos sítios frágeis com as sequências repetitivas funcionais (rDNAs e teloméricas) em cromossomos de *L. perenne*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Origem, distribuição e taxonomia de espécies de *Lolium*

O gênero *Lolium* (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).

De acordo com estudos realizados por Terrel (1968), o gênero possui oito espécies que estão subdivididas em dois grupos conforme o modo de reprodução. Dentre as oito espécies, quatro são autógamas (*L. loliaceum* Bory e Chaub., *L. persicum* Boiss e Hohen., *L. remotum* Schrank., *L. temulentum* L.) e três são alógamas (*L. perenne* L., *L. multiflorum* Lam. e *L. rigidum* Gaudich.). Apenas *Lolium canariense* Steud., endêmica das Ilhas Canárias, apresenta modo de reprodução intermediário com moderado grau de fertilização cruzada. Todas as espécies do gênero são diploides ( $2n=2x=14$ ), mas várias cultivares poliploides obtidas com a utilização de colchicina também são reconhecidas (MALIK; THOMAS, 1966; PEREIRA et al., 2011; POLOK, 2007; THOMAS, 1981).

Este gênero está aliado ao homem há muito tempo e os primeiros relatos de cultivo das espécies de *Lolium* datam dos séculos XIII e XIV (JENKIN, 1959). Provavelmente, as espécies desse gênero evoluíram em estreita associação com a agricultura primitiva devido ao comportamento semelhante ao de ervas daninhas (CHARMET; BALFOURIER, 1994).

A mais ampla distribuição é observada nas duas alógamas *L. multiflorum*, *L. perenne* e na autógama *L. temulentum*, que são encontradas em quase toda a Europa, parte significativa da Ásia, África, Australásia e nas

Américas do Norte e Latina. A espécie *L. multiflorum*, também conhecida como azevém italiano ou azevém anual, cresce melhor em climas mediterrâneos, enquanto o *L. perenne* é encontrado mais ao norte que as outras espécies do gênero por ser mais bem adaptado ao frio rigoroso, a climas úmidos e ser considerado sensível às mudanças de temperatura (POLOK, 2007).

As espécies *L. perenne* e *L. multiflorum* foram categorizadas como espécies diferentes com base em dados morfológicos, embora as relações taxonômicas não estejam claramente elucidadas (NAYLOR, 1960; POLOK, 2007). Alguns estudiosos defendem que *L. perenne* e *L. multiflorum* não devem ser intituladas como espécies, mas sim como subdivisões (POLOK, 2007). A reclassificação de *L. perenne* e *L. multiflorum* como uma única espécie foi proposta inicialmente por Naylor (1960). Bulińska-Radomska e Lester (1985), por sua vez, propuseram que o grupo das alógamas deve ser considerado como uma única espécie com três subespécies.

Na maioria dos sistemas de classificação *L. perenne* e *L. multiflorum* têm status de espécies taxonômicas. Essas espécies são distinguidas por vários caracteres morfológicos, sendo no geral relacionados ao hábito de crescimento e ao padrão estrutural das folhas. No entanto, muitas destas características morfológicas se sobrepõem nas duas espécies, dependendo da procedência geográfica dos genótipos comparados (POLOK, 2007).

A reclassificação de ecótipos e cultivares baseada na diversidade molecular e em análises morfológicas detalhadas demonstraram que as causas da diversificação entre ambos os taxa são resultantes de atividades humanas, como o manejo agrônomico e a pressão seletiva (MCGRATH; HODKINSON; BARTH, 2007; POLOK, 2007).

Os defensores da taxonomia baseada na morfologia não concordam com a reclassificação, mesmo sendo constatado que existe pouca diferenciação morfológica e até mesmo bioquímica entre as espécies de



polinização cruzada (LOOS, 1993a, 1993b; TERREL, 1968). O estudo realizado por Evans (1964) já mostrava que as duas espécies são muito semelhantes morfológicamente, sendo que uma das poucas diferenças observadas é o hábito mais ereto, mais amplo, com folhas mais flexíveis e geralmente enroladas na bainha em *L. multiflorum*, enquanto em *L. perenne* as folhas são suavemente dobradas e mais firmes, refletindo em diferenças anatômicas das folhas.

As pesquisas baseadas apenas na morfologia não são capazes de afirmar as relações sistemáticas devido ao grau de sobreposição de características entre as espécies, o que é incomum mesmo para espécies intimamente relacionadas (BENNET, 1997; BENNET; HAYWARD; MARSHALL, 2000; LOOS, 1993b). A maioria das características frequentemente utilizadas em estudos taxonômicos como comprimento, área e largura das folhas basais, da folha bandeira, altura do colmo, surgimento da espiga, duração e número de espiguetas não são suficientes para diferenciar *L. perenne* de *L. multiflorum* (POLOK, 2007).

A ausência de clara distinção entre *L. perenne* e *L. multiflorum* é também fundamentada no intercruzamento destas espécies. Os híbridos F<sub>1</sub> resultantes se estabelecem sem muitos problemas e podem chegar à maturidade plena com níveis de fertilidade consideráveis, sendo que algumas plantas resultantes ainda apresentam heterose (JENKIN, 1959). Alguns estudiosos alegam que a hibridação é um fenômeno recente subsidiado por questões espaciais e geográficas, em que as espécies são semeadas fora da sua área de distribuição natural, possibilitando que ambas entrem em contato e resulte no fluxo gênico (BENNETT; HAYWARD; MARSHALL, 2002).

Uma das poucas diferenças observadas entre as duas espécies é que *L. perenne* necessita de exposição à baixas temperaturas para florescer. Contudo, isto pode ocorrer em resposta à temperatura e ao fotoperíodo relacionado com a origem geográfica de uma população (POLOK, 2007). As

variações das condições ambientais estão diretamente relacionadas ao comportamento perene ou anual destas duas espécies. Como exemplo, sabe-se que *L. multiflorum* é anual, mas pode se comportar como bianual ou de ciclo curto dependendo das condições ambientais (COSGROVE; CASLER; UNDERSANDER, 1999).

Vários autores sugerem que as formas ancestrais de *Lolium* são semelhantes ao *L. perenne* atual (BALFOURIER; IMBERT; CHARMET, 2000; THOMAS, 1981). Estudos evolutivos baseados na investigação dos transposons mostraram que o isolamento provocado durante o período glacial não foi suficiente para isolar e diversificar as populações, sendo as diferenças observadas resultantes de mudanças climáticas recentes, que são mais desfavoráveis ao azevém que as alterações glaciais (MCDONALD et al., 2000; POLOK, 2007).

O estresse provocado pelas mudanças climáticas levou as populações mais ao sul da Europa a se adaptarem, possivelmente provocando modificações genéticas que não são perceptíveis ao nível de gene e que permitem que *L. perenne* e *L. multiflorum* se inter cruzem sem grandes problemas. As evidências dessas modificações mostraram acúmulo (proliferação) de transposons que, segundo Kalendar et al. (2000), podem ser induzidos por estresse.

## **2.2 Características botânico-agronômicas e melhoramento de azevém perene (*Lolium perenne*)**

As espécies do gênero *Lolium* apresentam raízes curtas e fibrosas e a parte aérea em forma de touceira. As folhas bandeira são finas e laminadas, com venação cruzada e coloração verde-escura. O colmo possui de 10 a 150cm, e nele estão inseridas as folhas por uma bainha com lígula eventualmente acompanhada por aurículas. A inflorescência em forma de

espiga possui espiguetas, nas quais estão inseridas as flores. Cada uma das flores possui duas glumas, uma lema e uma pálea que envolvem a cariopse (POLOK, 2007).

Especificamente em *L. perenne*, as folhas bandeira possuem cerca de 30cm de comprimento e até 7mm de largura, possuindo aurículas pequenas e suas espigas podem atingir 20 cm de comprimento. Cada espiguetas comporta de 7 a 9 flores com 3 anteras cada (LAMP; FORBES; CADE, 2001) e, segundo Vogel (1981), os colmos são eretos e as plantas podem atingir até 90cm de altura, com duração do ciclo de vida de 2 a 3 anos.

A germinação de *L. perenne* ocorre no final do verão e no início do outono, quando as condições ambientais se tornam favoráveis (THOMPSON; GRIME, 1979). E segundo os mesmos autores, o desenvolvimento se dá no início da primavera e ainda nesta estação, durante condições úmidas e frescas, ocorre o primeiro pico de produção de biomassa que se repete no outono. As inflorescências são emitidas a partir do início da primavera até o final do verão após terem sido submetidas às baixas temperaturas do inverno, condição necessária para induzir o florescimento (FRAKES, 1973).

Caracterizado como uma espécie alógama, o *L. perenne* possui autoincompatibilidade do tipo gametofítica (FRAKUES, 1973), multialélica (FEARON, HAYWARD; LAWRENCE, 1983) controlada por vários locos gênicos de interação complexa (THOROGOOD et al., 2005), que impede a autopolinização e permite explorar a heterozigose, além de favorecer a produção de populações sintéticas geneticamente variáveis (YAMADA et al., 2005).

O *L. perenne* é mais bem adaptado ao frio mais intenso e à umidade que as demais espécies de *Lolium*. Contudo, é mais sensível às temperaturas mais elevadas e à seca que *L. multiflorum* (POLOK, 2007) que, como as demais espécies do gênero, é tolerante a uma grande variedade de climas e

solos (HANNAWAY et al., 2012). No entanto, *L. perenne* tolera solos mais encharcados, o que não é evidenciado em *L. multiflorum* (FRAKUES, 1973; SMOLIAK et al., 1981).

*Lolium perenne* e *Lolium multiflorum* 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 e alto rendimento (HANNAWAY et al., 2012). Na Europa, dados de 2003 mostravam que 23% da área de gramíneas (52 milhões hectares) era coberta apenas por estas duas espécies de azevém. A produção anual de sementes de azevém nesse continente excedeu, na época, 45 mil toneladas e movimentou cerca de 160 milhões de euros (LÜBBERSTEDT; SCHEJBEL; BACH, 2003).

Estas duas espécies também têm importância para a agricultura mundial por serem capazes de suprir a escassez de forragem durante o período de inverno (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 de regiões que sofrem com a estacionalidade de suas forrageiras nativas (YAMADA et al., 2005).

Particularmente, o *L. perenne* é considerado uma forrageira de primeira qualidade em todo o mundo, tendo maior digestibilidade do que outras espécies de gramíneas perenes de clima temperado (WANG; BIGELOW; JIANG, 2009). Esta espécie é adequada a todos os estágios de vida do gado, especialmente os animais com altos requisitos de nutrientes como, por exemplo, animais jovens e vacas leiteiras. Em regiões mais secas, *L. perenne* é preferencialmente utilizado na forma de silagem e feno (HANNAWAY et al., 2012).

Devido à grande utilização de *L. perenne* como gramínea forrageira em vários países de clima temperado, muitos estudos moleculares foram

realizados com o intuito de conhecer a variabilidade genética e subsidiar os programas de melhoramento genético em todo o mundo. Dentre esses trabalhos, Bolaric et al. (2005) identificaram por RAPD que os ecótipos alemães da região Norte são distintos da região Central e Sul.

Um estudo mais amplo baseado nas sequências repetitivas (ISSR - Inter-simple sequence repeats) envolvendo genótipos cultivados e silvestres provenientes de países da Ásia, Europa, América do Norte e África mostrou que, de uma forma geral, a variabilidade genética é maior entre os ecótipos do que entre as cultivares e que a Europa é detentora da maior diversidade entre os continentes comparados (HU et al., 2011). Anhalt et al. (2009) realizaram análises com marcadores moleculares AFLP (Amplified fragment length polymorphism) e SSR (Simple sequence repeats) descreveram um QTL de efeito maior para produção de biomassa em *L. perenne* e demonstraram que essa característica apresenta variabilidade genética e que possivelmente pode apresentar efeito de heterose.

De acordo com Wittmann e Dall'Agnol (2003), principalmente quando o interesse é a produção de forragem, a indução de poliploidia pode ser vantajosa. Desta forma, vários programas de melhoramento obtiveram cultivares diploides e tetraploides que otimizaram ainda mais as características agrônômicas desta cultura, como a alta digestibilidade e preferência de pastagem devido a uma maior percentagem de açúcares (BARKER et al., 2001; RICHARDSON et al., 2007).

Salama et al. (2012) investigaram variedades diploides e tetraploides de *L. perenne* e observaram que os tetraploides possuem maior teor de carboidratos e menor teor de fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido e lignina em detergente ácido que seus parentais diploides, fatores considerados favoráveis a qualidade da forragem. Outros resultados favoráveis a poliploidização em espécies de *Lolium* são o aumento de resistência à seca e às doenças, o aumento do tamanho das sementes, das

folhas e do potencial de estabelecimento de mudas (HUMPHREYS, 1991).

No Brasil, *L. multiflorum* é a única espécie do gênero *Lolium* naturalizada e utilizada como forrageira na região do Sul do país, onde ocupa cerca de 5 milhões de hectares (PINTO; LAUS; PAULETTO, 2004). A espécie provavelmente foi introduzida no Rio Grande Sul por imigrantes italianos a partir de 1875 (ARAÚJO, 1978). Atualmente, essa espécie é alvo de programas de melhoramento que, além da produtividade, tem como principais objetivos desenvolver cultivares com precocidade, alto vigor inicial, boa capacidade de rebrota, maior proporção de folhas e de matéria seca. Além disso, esses programas buscam melhorar a distribuição da produção de forragem, estendendo o período de utilização da pastagem para atender os períodos de maior necessidade e adequar à cultura em diferentes sistemas de produção (CORRÊA et al., 2007; FONTANELI; FONTANELI, 2000; MITTELMANN et al., 2004).

A introdução do *L. perenne* como fonte de variabilidade genética pode contribuir muito com o melhoramento genético de azevém no Brasil. Essa espécie possui características de interesse que não são encontradas em genótipos de *L. multiflorum*, como tolerância à solos encharcados e a resistência às baixas temperaturas. Isso poderia favorecer a obtenção de cultivares superiores e permitir que alguns objetivos do melhoramento no Brasil sejam alcançados.

As espécies *Lolium perenne* e *L. multiflorum* possuem características agrônomicas complementares, que podem favorecer a obtenção de híbridos interespecíficos combinando a alta qualidade e o rápido desenvolvimento de *L. multiflorum* com o bom número de perfilhos e resistência de *L. perenne* (THOMAS; HUMPHREYS, 1991). Os tetraploides destes híbridos são estáveis para a produção de sementes devido ao grande potencial de pareamento cromossômico e regularidade na meiose, que resulta em cerca de

90% de viabilidade polínica (AUNG; EVANS, 1985; DENIZ, 2008; DENIZ; DOGRU, 2007).

Mundialmente, nas últimas décadas o melhoramento genético envolvendo as espécies de *Lolium* direcionou seus esforços para a obtenção de híbridos interespecíficos pelo cruzamento com espécies do gênero *Festuca* L., buscando desenvolver genótipos resistentes ao estresse abiótico causado pelo congelamento e pela seca no período de inverno intenso em países do hemisfério norte (HUMPHREYS; CANTER; THOMAS, 2003; KOSMALA et al., 2007). Os híbridos interespecíficos resultantes do cruzamento de espécies do gênero *Festuca* e *Lolium*, denominados Festulolium, apresentam bom desempenho agrônômico (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.

### **2.3 Aspectos citogenéticos de espécies *Lolium***

Na segunda metade do século passado, as espécies do gênero *Lolium* foram amplamente estudadas por diversos autores através das técnicas citogenéticas convencionais e geraram várias informações básicas importantes relacionadas à determinação do número cromossômico, construção dos cariótipos e comportamento meiótico, construindo uma base de dados ampla sobre a estrutura genética e citogenética deste grupo (MALIK; THOMAS, 1966; TECHIO et al., 2010).

As oito espécies do gênero *Lolium* são diploides com  $2n=2x=14$  cromossomos, sendo o conjunto básico de cromossomos  $n=x=7$ . Em relação ao cariótipo, as espécies apresentam três pares de cromossomos com constrições secundárias localizadas próximas à região centromérica e associadas às bandas C (JAUHAR, 1993; MALIK; THOMAS, 1966;

THOMAS, 1981).

Na meiose, o azevém apresenta processo regular formando, predominantemente, bivalentes em anel (KLEIJER, 1984). Jauhar (1975) obteve como configurações médias na diacinese, 6,93 bivalentes e 0,15 univalentes para *L. perenne* e 7 bivalentes para *L. multiflorum*. Nos híbridos entre *L. perenne* e *L. temulentum*, os pares de cromossomos homeólogos podem ser bem distintos morfológicamente e, ainda assim, apresentarem pareamento total ou parcial, apesar dos cromossomos de *L. temulentum* apresentarem quase 50% a mais de DNA do que os de *L. perenne*. O tetraploide desse híbrido, no entanto, geralmente forma bivalentes, quando deveria se esperar o predomínio de tetravalentes (JIMENEZ; JENKINS, 1995). Segundo esses autores, a formação de bivalentes pode depender mais de um controle gênico do que da semelhança entre homeólogos.

Em algumas variedades de *L. multiflorum* e *L. perenne* (DELAY; PETIT, 1972; FARUQI et al., 1987) foram descritos cromossomos B variando em número em microsporócitos de uma mesma planta. Estudos recentes realizados por Techio et al. (2010) mostraram que nos diferentes estágios da meiose em *L. multiflorum* ocorrem até dois cromossomos B, que demonstraram comportamento instável, tais como ascensão precoce na metáfase I ou atrasos durante anáfase I, mas com inserção dos cromossomos B nos novos núcleos formados, o que garante em tese sua propagação.

A avaliação citogenética comparativa em nível quantitativo e qualitativo das quatro espécies alógamas e três autógamas (*L. temulentum*, *L. remotum*, *L. loliaceum*) possibilitou conhecer a morfologia do cromossomo 1 nos dois grupos reprodutivos e evidenciou que as autógamas apresentam constrição secundária distal e, nas alógamas, a posição é proximal (MALIK; THOMAS, 1966). Nesse mesmo estudo foi possível observar que o comprimento relativo e a relação de braços cromossômicos são mais uniformes nas espécies autógamas, que também possuem cerca de 40% a



mais de DNA que as alógamas.

Carnide e Orellana (1986) e Carnide, Orellana e Ribeiro (1986) demonstraram, por meio de coloração com nitrato de prata, o papel das constrições secundárias como organizadores nucleolares funcionalmente ativos e observaram a boa correspondência entre o número de constrições secundárias na metáfase mitótica e o número máximo de nucléolos nos núcleos interfásicos, totalizando seis marcações nas espécies *L. perenne* e *L. multiflorum*.

Estudos básicos realizados nas espécies do gênero *Lolium* oferecem informações importantes sobre a caracterização citogenética que na atualidade servem de subsídio para pesquisas avançadas sobre a organização do genoma pelas técnicas citogenéticas moleculares, assim como no monitoramento e na obtenção híbridos envolvendo o gênero.

A partir do final do século passado muitos estudos baseados na citogenética molecular em *Lolium* foram publicados. Contudo, o enfoque nas últimas décadas foi dado aos híbridos *Festulolium* impulsionado pelos bons resultados obtidos com o complexo *Lolium-Festuca*, que tinha como objetivo entender a relação genômica entre as espécies, o comportamento e a organização dos cromossomos de ambos os gêneros e dos híbridos resultantes.

Além do conhecimento da composição genômica de híbridos interespecíficos por Hibridização *in situ* Genômica (GISH) em estudos como o de Kopecký et al. (2009), a estrutura e a função dos cromossomos também podem ser conhecidas através da técnica de FISH, marcando regiões de heterocromatina (APPEL et al., 1981; BEDBROOK et al., 1980), genes de rRNA (JIANG; GILL, 1994; MUKAI; ENDO; GILL, 1990), regiões centroméricas (ZHANG et al., 2001), subteloméricas (ZHANG et al., 2004) e teloméricas (FRIEBE et al., 2001).

De forma geral, as sequências de DNA repetitivo são um importante componente do genoma de eucariotos e em plantas superiores podem representar mais de 50% do genoma, permitindo evidenciar mudanças relativamente rápidas nos cromossomos (RIEGER; MICHAELIS; GREEN, 1991; WINTERFELD; RÖSER, 2007b).

Dentre as sondas de hibridização de regiões repetitivas as mais fáceis de serem isoladas e localizadas são o sítio de rDNA ribossomal 45S, constituída pela família multigênica 18S, 5,8S e 26S em plantas, e o sítio rDNA 5S (GUERRA, 2004). O sítio rDNA 45S é constituído por sequências repetidas em tandem, formando unidades que são repetidas por centenas ou milhares de vezes e que representam até 10% do genoma das plantas. Os sítios rDNA 45S e 5S são marcadores úteis para identificação do cromossomo e permitem inferir sobre as relações evolutivas, devido à conservação das sequências de nucleotídeos muito similar em todos os eucariontes. Alterações na distribuição cromossômica dos sítios geralmente estão correlacionadas com a especiação (GUERRA, 2004; HESLOP-HARRISON, 2000).

Por meio de hibridização *in situ*, Thomas et al. (1996) apresentaram o mapa físico dos genes rDNA 18S, 5.8S, 26S e 5S nos cromossomos de sete taxa de *Lolium*. Os sítios 18S, 5.8S e 26S foram localizados em dois pares de cromossomos das quatro espécies autógamas. Nas alógamas, seis sítios foram observados em *L. multiflorum*, sete em *L. perenne* e nove em *L. rigidum* var. *rigidum*. Em todos os sete taxa foram identificados dois sítios de rDNA 5S adjacentes a sítios 18S, 5.8S e 26S. Nas autógamas, esses sítios estavam localizados nas adjacências dos sítios 18S, 5.8S e 26S do cromossomo 2. Nas alógamas *L. multiflorum* e *L. perenne*, o sítio 5S sítio foi mapeado no braço curto do cromossomo 3 e em *L. rigidum* (variedade *rigidum*) em posição variável, no braço curto do cromossomo 3 e 2 dos diferentes genótipos avaliados.

Estudos realizados por Vaio et al. (2005) utilizando a hibridização *in situ* em DNA ribossomal e bandamento CMA e DAPI em cinco espécies do gênero *Paspalum* Juss., mostraram que após a poliploidização natural os sítios rDNA 5S apresentam a mesma localização nos cromossomos e uma correspondência entre o número de sítios e o nível de ploidia. Já a distribuição dos sítios de rDNA 45S foi variável, não representando a duplicação exata dos sítios do genótipo diploide.

As análises realizadas com citogenética molecular permitem que detalhes não perceptíveis pelo uso de técnicas básicas sejam evidenciados, como no mapeamento da região rDNA 45S de *L. perenne* realizado por Huang et al. (2008). Nesse estudo, a contagem de cromossomos de *L. perenne* pelo método convencional, na maioria das vezes, excedia o número de 14, variando de 15 a 20 em cerca de 85% das células analisadas. Quando as mesmas células foram submetidas à técnica de FISH para os sítios de rDNA 45S, algumas apresentaram número de sinais maior que sete. Os autores observaram que em alguns sítios 45S era possível observar falhas ou possíveis quebras que ocorriam em uma ou em ambas as cromátides irmãs dividindo-o em dois, o que aparentemente fragmentava, de modo aleatório, os cromossomos detentores das sequências rDNA 45S.

Estudos mais detalhados mostraram que nos locais das falhas/quebras podem ou não aparecer filamentos finos de DNA entre os fragmentos cromossômicos (HUANG et al., 2009). Cada fragmento formado pela falha ou quebra aparente no sítio do rDNA 45S pode ter sido equivocadamente caracterizado como um cromossomo a mais na contagem pela técnica convencional. Desta forma, as células com 2, 3, 4, 5 ou 6 quebras no sítio de rDNA 45s resultariam em contagens de células com o número de cromossomos variando entre 16, 17, 18, 19 e 20, respectivamente. Para confirmar os resultados, os autores repetiram os mesmos procedimentos em outras duas cultivares de *L. perenne* e uma de *L.*

*multiflorum* e confirmaram que as quebras ocorriam exclusivamente na região rDNAs 45S dos cromossomos.

A partir destas análises, Huang et al. (2008) correlacionaram os dados com a literatura e verificaram que as variações no número cromossômico em *L. perenne* eram resultantes da expressão de sítios frágeis na região 45S rDNA, semelhante ao descrito para a espécie humana. Nos seres humanos, os sítios frágeis são regiões cromossômicas propensas a formar lacunas/falhas que são fracamente coradas pelas técnicas citogenéticas, ou, também, quebras em uma ou em ambas as cromátides na metáfase que podem ocorrer espontaneamente ou após a inibição parcial de síntese de DNA (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001). Os sítios frágeis da espécie humana são classificados como raros ou comuns com base na sua frequência e modo de indução. Os sítios raros estão presentes em menos de 2,5% das populações humanas e aparentemente têm implicações diretas com a causa do câncer. Já os sítios comuns são vistos em todos os seres humanos e são geralmente estáveis em células somáticas (GLOVER, 2006; HUEBNER; CROCE, 2001).

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/quebras nos mecanismo de reparo durante a replicação do DNA (COFFE et al., 2002; WANG, 2006).

Contudo, Huang et al. (2008) relatam que é pouco provável que alterações na sequência gênica, uma das causas da expressão dos sítios em humanos, estejam relacionadas à expressão dos sítios frágeis em *L. perenne* pelo fato que a sequência gênica de repetição de rDNA 45S é altamente conservada entre as plantas e que até o momento não haviam relatos de falhas/quebras nas regiões de rDNA 45S em outras espécies vegetais. No entanto, é possível que o número de cópias repetidas ou os espaços

intergênicos dos sítios rDNA 45S possam explicar a expressão em *Lolium* spp. Em humanos, os sítios frágeis estão frequentemente envolvidos em rearranjos. Em plantas, devido à conservação destas regiões entre as espécies, pode estar mais relacionada à expressão gênica (NELSON, 1995; POPESCU, 2003).

Variação interespecífica e intraespecífica no número e localização de locos de rDNA 45 e 5S foram relatadas para cultivares de *F. pratensis* Huds., *L. perenne* e *L. multiflorum* (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010; LIDEIKYTE et al., 2008). Existem evidências que os locos de rDNA podem mudar de posição cromossômica sem a ocorrência de translocações (DUBCOVSKY; DVORAK, 1995) ou com a atividade de elementos transponíveis (HAYASAKI; MORIKAWA; LEGGET, 2001; RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b), indicando a transposição dos locos de rDNA ativados por transposons do tipo *En/Spm* (RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a). No entanto, não há evidências claras de quais mecanismos podem estar envolvidos na variação dos locos de rDNA de *F. pratensis* e *L. perenne* e *L. multiflorum* (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material genético

As avaliações foram realizadas em duas cultivares de *Lolium perenne*, sendo uma diploide (cv. Ellet) e outra tetraploide (cv. Oro verde), cedidas pela Embrapa Recursos Genéticos, Brasília-DF e Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado, Juiz de Fora-MG/Pelotas-RS.

#### 3.2 Obtenção de meristemas e metáfases mitóticas

Para a obtenção das raízes, sementes das cultivares de *L. perenne* foram colocadas para germinar a 10° C, em B.O.D., em caixas de germinação contendo papel de germinação umedecido com água. Com cerca de 20 dias, as plântulas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato Plantmax® e mantidas a 15°C (BRASIL, 1992). Após, aproximadamente 20 dias as plantas foram transferidas para vasos contendo substrato e terra vegetal (3:2) e mantidas em casa de vegetação. Para obtenção de raízes em quantidade e tamanho adequados, as plantas adultas foram transferidas para frascos plásticos contendo água e mantidas, por aproximadamente, sete dias.

As raízes emitidas em água foram coletadas entre 9 e 11 horas da manhã e pré-tratadas em água gelada por um período de 24 horas (HUANG et al., 2008), fixadas em Carnoy (Etanol: Ácido acético, 3:1) e armazenadas em freezer a aproximadamente -20°C até o momento do preparo das lâminas. Para confecção das lâminas, as raízes foram submetidas à maceração enzimática em solução de pectinase/celulase (100/200U) (Sigma™), por 2 horas e 10 minutos a 37°C em câmara úmida. O preparo das lâminas foi realizado pela técnica de secagem a chama (DONG et al., 2000).

A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de luz, sob contraste de fase, e as melhores lâminas foram selecionadas para realizar as técnicas citogenéticas de FISH, bandamento CMA/DAPI e Ag-NOR. A construção dos cariótipos e as interpretações dos resultados de todas as técnicas realizadas foram baseadas nas melhores metáfases obtidas.

### **3.3 Bandamento cromossômico**

#### **3.3.1 Bandamento Ag-NOR**

A metodologia utilizada para marcação das Regiões Organizadoras do Nucléolo (RONs) e nucléolos com nitrato de prata foi proposta por Guerra e Souza (2002) e Huang et al. (2012) com adaptações.

Sobre a preparação cromossômica foi colocada uma tela de nylon, na qual foi adicionada 1 gota de solução coloidal (2% gelatina incolor, 2% ácido fórmico) e 2 gotas de solução de nitrato de prata 50% previamente filtrada. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 72°C, de 2 a 7 minutos e posteriormente lavadas com água destilada e desidratadas em série alcoólica (70%, 80% e 100%), por 5 minutos. As lâminas foram observadas em microscópio de campo claro (Zeiss) modelo Axio com câmera AxioCam ICc1 acoplada. As marcações dos nucléolos foram avaliadas em 150 células interfásicas e as RONs, nas melhores metáfases de cada indivíduo.

#### **3.3.2 Bandamento CMA/DAPI**

Para obtenção do padrão de bandas com os fluorocromos DAPI e CMA foram utilizados os protocolos descritos Guerra e Souza (2002), com adaptações.

As lâminas selecionadas foram envelhecidas por, no mínimo, três

dias e em seguida lavadas em tampão McIlvaine (pH 7,0) por vinte minutos, secas e expostas a solução de cromomicina (CMA) 0,1 mg/mL, por 30 minutos. Após o tempo de exposição, as lâminas foram lavadas com tampão McIlvaine, secas e expostas ao DAPI (4-6-diamidino-2-phenilindole) 0,5 mg/mL, por 20 minutos. Posteriormente ao tempo de exposição, as lâminas foram novamente lavadas com tampão McIlvaine e montadas com Vectashield®. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 usando filtros nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para DAPI e 430 /480 nm, para CMA.

### **3.4 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)**

Para a FISH, foram usadas como sondas as sequências de rDNA 45S (pTa 71 de *Triticum aestivum* L.), 5S [D2 de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen., fragmento com aproximadamente 400pb (PEDROSA et al., 2002)] e telomérica (pAtT4 de *Arabidopsis thaliana* L. Heynh.) (RICHARDS; AUSUBEL, 1988). As sondas 45S foram marcadas com biotina e as sondas 5S e telomérica foram marcadas com digoxigenina por meio da reação de *nick-translation*.

A preparação cromossômica foi desnaturada com 100µL de formamida 70% em SSC 2x, por 1 minuto e 40 segundos, a 85°C, em estufa. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em etanol 70% (-20°C), 90% e 100% (ambas em temperatura ambiente). A mistura de hibridização (formamida 50%, SSC 2x, sulfato de dextran 10% e cerca de 50 ng de cada uma das sondas marcadas), foi desnaturada a 95°C por 8 minutos. Após a desnaturação, a mistura foi aplicada sobre a preparação cromossômica deixando-se hibridizar por, no mínimo, 16 horas, a 37°C, em câmara úmida.



As lavagens pós-hibridização foram feitas, sob agitação, em SSC 2x, 5 minutos, em temperatura ambiente, seguida de SSC 2x, a 42 °C, por 10 minutos e em TNT 1x por 5 minutos. A detecção foi realizada com anti-DIG conjugada com FITC e avidina conjugada com TRITC, em tampão TNB, por 1h a 37°C em câmara úmida. Posteriormente, foram feitas três lavagens de 5 minutos em TNT e uma lavagem de 5 min. em PBS 1x, sob agitação.

As lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI e avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 usando filtros nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para DAPI, 490/525 para FITC e 550/575 para o TRITC. As imagens de interesse foram digitalizadas por meio de câmera monocromática refrigerada Axio Cam HRm (Zeiss) e processadas usando o software Axio Vision Release 4.8.2 (Zeiss) e Adobe photoshop CS3.

Algumas hibridizações foram feitas em lâminas previamente submetidas ao bandamento Ag-NOR e fluorescente. Nesses casos, após o bandamento Ag-NOR, foram feitas as lavagens em SSC 2x por 4 min., série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 min. e em Carnoy (3:1) por mais 5 minutos (HUANG et al., 2012). Para serem hibridizadas, as lâminas do bandamento fluorescente foram previamente descoradas em Carnoy (3:1) por 30 min. e mergulhadas em álcool 100% por 2h (GUERRA; SOUZA, 2002) e procedeu-se com a hibridização como descrito anteriormente.

### 3.5 Análise do cariótipo

Para realizar as análises de cariótipo foram obtidas medições em cromossomos metafásicos utilizando o programa Image Tool 3.00 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio).

Para cada cromossomo, foram medidos o comprimento do braço curto (BC), o comprimento do braço longo (BL) para obter o comprimento total individual dos cromossomos ( $CTi = BL + BC$ ), o comprimento total do lote haploide ( $CTLH = \sum CTi$ ), a relação de braços ( $RB = BL/BC$ ), o índice centromérico ( $IC = BC \times 100/CTi$ ). Os cromossomos foram classificados de acordo com a posição do centrômero segundo Guerra (1986). Para realizar o mapeamento dos genes ribossomais e das bandas fluorescentes foi medida a distância das mesmas em relação ao centrômero.

As metáfases de ambas as cultivares foram analisadas quanto à posição e distribuição das bandas CMA-DAPI, Ag-NOR, sítios de rDNA 5S e 45S e quanto à integridade da morfologia cromossômica. Para caracterizar as quebras/lesões cromossômicas foram usados os mesmo critérios adotados por Bustamante (2012). As lesões foram caracterizadas por falhas na região proximal do cromossomo, sem haver ruptura do braço, ou ainda, quando, ao observar as metáfases com a FISH usando a sonda de rDNA 45S, o cromossomo aparecia ligado a um fragmento por meio de um filamento de cromatina, não caracterizando ruptura completa do braço cromossômico. As quebras foram caracterizadas pelo rompimento/separação total de uma região cromossômica, resultando na formação de um fragmento desprendido do cromossomo de origem.

#### 4 RESULTADOS

A cultivar Ellet (diploide) apresenta 14 cromossomos com fórmula cariotípica 8m+6sm. Os cromossomos são de tamanho médio, com comprimento variando de 3,24 a 4,93 $\mu$ m (Figura 1 e Tabela 1). Em relação aos marcadores citogenéticos, observou-se que sete cromossomos possuem genes rDNA 45S co-localizados com bandas CMA. Esses loci estão posicionados no braço longo dos cromossomo 1, 2, 3 e 5 à uma distância média do centrômero de 0,71 $\mu$ m, sendo o par 1 heterozigoto em relação ao sítio rDNA 45S. O sítio 5S ocupa a região proximal no braço curto do cromossomo 3 à uma distância de 0,21 $\mu$ m do (Figura 1 e Tabela 1).

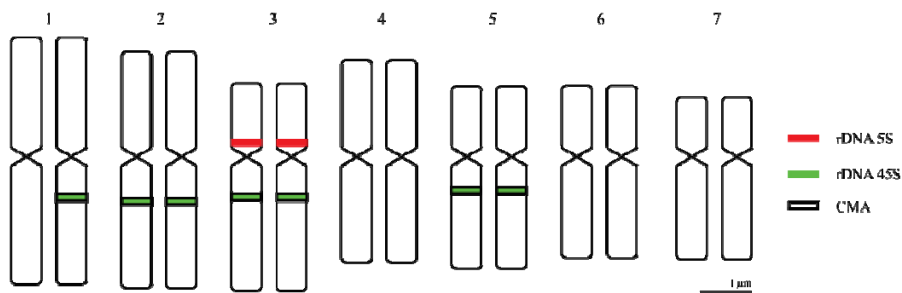


Figura 1 Idiograma de *L. perenne* cv. Ellet (diploide). Barra de 1 $\mu$ m.

Tabela 1 Comprimento total do cromossomo (CTi), relação de braços (RB), índice centromérico (IC) (classificação dos cromossomos: m=metacêntrico, sm= submetracêntrico), distância, em  $\mu\text{m}$ , do sítio rDNA45S em relação ao centrômero (d45S), distância, em  $\mu\text{m}$ , do sítio rDNA5S em relação ao centrômero (d5S) de *L. perenne* cv. Ellet (diploide).

Cromossomo	CTi	RB	IC	d45S	d5S
1	4,93	1,07	48,28(m)	0,73	
2	4,71	1,26	44,31(m)	0,81	
3	4,14	1,82	35,43(sm)	0,72	0,21
4	4,04	1,10	47,71(m)		
5	3,64	1,59	38,65(sm)	0,59	
6	3,44	1,42	41,28(m)		
7	3,24	1,73	36,63(sm)		
CTLH	28,12				

Dentre as 36 metáfases analisadas em plantas da cv. Ellet, apenas duas apresentaram estrutura dos cromossomos parcialmente conservada e com padrão similar de condensação a partir das quais foi obtido o idiograma. Nas demais metáfases, os sítios de rDNA 45S mostraram-se variáveis em número e localização nos cromossomos, sendo quantificados de oito a 13 sinais proximais e nas extremidades dos cromossomos (Figura 2 A e Tabela 2).

A posição na extremidade do cromossomo é devido à expressão dos sítios frágeis que causaram quebras e lesões em muitos sítios rDNA 45S e que, consequentemente, causaram o aumento do número de sinais na FISH e geraram fragmentos cromossômicos. Em sítios quebrados e, em alguns casos, lesionados, foram evidenciados sinais presentes somente no cromossomo (Figura 2 A) ou somente no fragmento (Figura 3 A) ou ainda em ambos (Figura 2 A), revelando que o sítio foi dividido em duas partes de tamanhos semelhantes ou diferentes, dependendo do local da quebra.

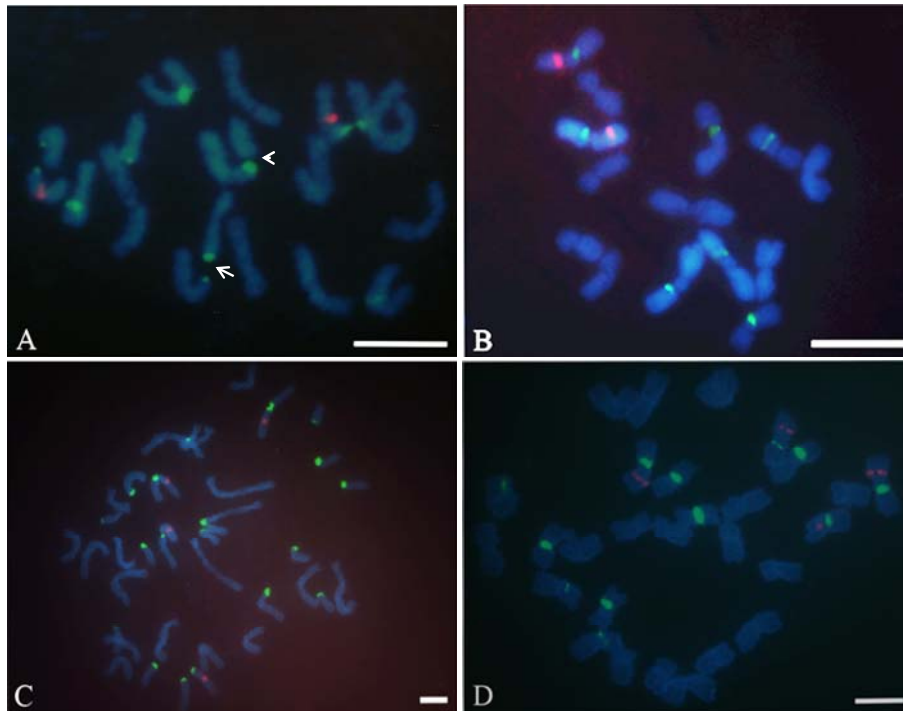


Figura 2 Sítios de rDNA 45S (verdes) 5S (vermelho) evidenciados por FISH em cromossomos de *L. perenne*. Cultivar Ellet (diploide): A. Pró-metáfase (ponta de seta – sinal 45S só no cromossomo; seta – sinal 45S no cromossomo e no fragmento) e B. Metáfase; cv. Oro verde (tetraploide): C. Pró-metáfase e D. Metáfase. Barra 5 $\mu$ m.

Nas metáfases das plantas cv. Oro verde (tetraploide) também não foi observado um padrão específico de distribuição e número de sítios 45S. Quebras e/ou lesões e fragmentos cromossômicos foram evidenciados em mais de 90% das metáfases avaliadas (Figura 2 C), o que impossibilitou a construção do idiograma. O número de sinais observados variou de 12 a 24, dentre eles, sinais proximais provenientes de sítios normais/integros e sítios quebrados e/ou lesionados. Assim como nos diploides, a proporção de quebras e lesões variou nas metáfases de uma mesma planta e entre plantas diferentes (Tabela 2).

Tabela 2 Número de sinais do sítio de rDNA 45S (número de metáfases analisadas), Número de cromossomos e fragmentos (NC+f), Número de quebras cromossômicas (NQ), Número de lesões cromossômicas (NL) e número de sítios de rDNA 5S evidenciados em plantas da cv. Ellet (diploide) e da cv. Oro verde (tetraploide) de *L. perenne*.

<b>Cultivar/Genótipos</b>	<b>45S</b>	<b>NC+f</b>	<b>NQ</b>	<b>NL</b>	<b>5S</b>
<b>Diploide</b>					
Ellet 1	9 a 12 (7)	14+ 3 a 14+5	3 a 5	2 a 4	2
Ellet 8	7 a 13 (18)	14+0 a 14+6	0 a 6	0 a 3	2
Ellet 18	8 a 11 (9)	14+1 a 14+4	1 a 4	0 a 4	2
<b>Tetraploide</b>					
Oro verde 27	14 a 19 (7)	28+8 a 28+11	8 a 11	1 a 4	4
Oro verde 29	16 a 23 (2)	28+4 a 28 +8	4 a 8	3 a 7	4
Oro verde 30	15 a 18(3)	28+1 a 28+6	1 a 6	1 a 3	4
Oro verde 33 *	14 a 24 (7)	28+1 a 28+9	1 a 9	0 a 4	4
Oro verde 34	14 a 19 (4)	28+2 a 28+6	2 a 6	4 a 8	4
Oro verde 37	12 a 22 (9)	28+0 a 28+6	0 a 6	0 a 5	4
Oro verde 43	17 a 20 (9)	28+5 a 28+12	5 a 12	0 a 2	4

\* dois sítios de rDNA 45S sintênicos.

A reibridização com sondas teloméricas em metáfases já analisadas com sondas de rDNA 45S e 5S, não detectou sequências teloméricas nos cromossomos quebrados e nos fragmentos, cuja extremidade estava marcada pela sonda 45S (Figura 3 A-B). Em contrapartida, todos os cromossomos com sinais 45S intersticiais intactos ou lesionados apresentaram as duas extremidades marcadas com as sondas teloméricas (Figura 3 A-D).

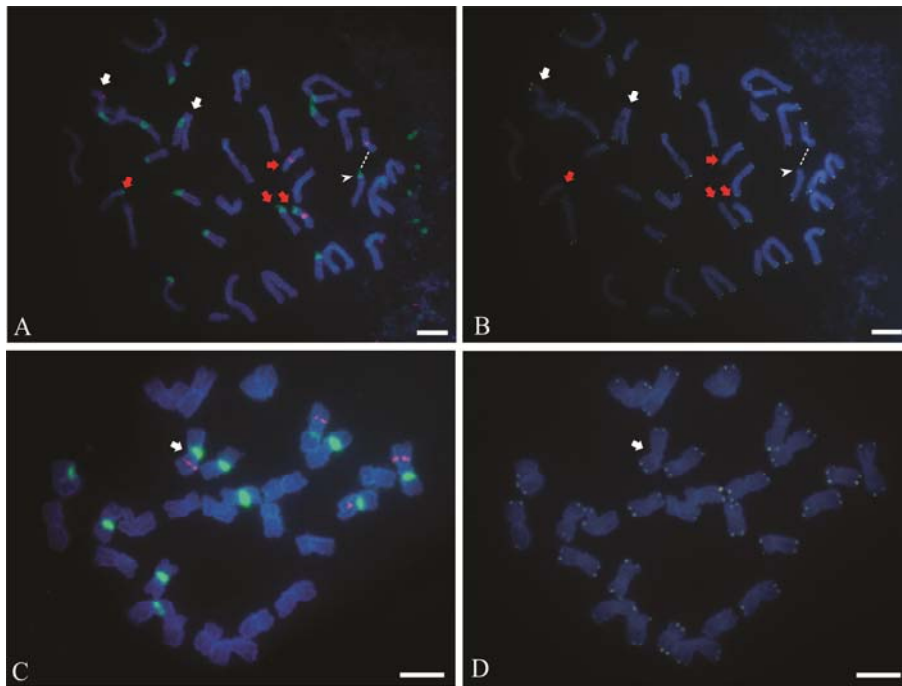


Figura 3 A e C. Sítios de rDNA 45S (verdes) e 5S (vermelhos), e B e D. sinais teloméricos (amarelos) evidenciados por FISH em cromossomos da cv. Oro verde (tetraploide) de *Lolium perenne*. As setas brancas indicam cromossomos íntegros e as setas vermelhas indicam a extremidade dos fragmentos cromossômicos ou dos cromossomos quebrados (segmentos com centrômero) sem a marcação com sonda telomérica no ponto da quebra. Em B, a cabeça de seta branca demonstra o sinal 45S somente no fragmento cromossômico. Barra 5 $\mu$ m.

Dois sítios de rDNA 45S sintênicos em diferentes braços cromossômicos foram evidenciados em um cromossomo nas metáfases da planta 33 da cv. Oro verde (tetraploide). Em algumas metáfases, os dois sinais estavam intactos e em posição proximal (Figura 4 B). Em outras metáfases, um sinal estava intacto e o outro estava localizado no cromossomo quebrado e no fragmento decorrente da quebra no sítio (Figura 4 A).

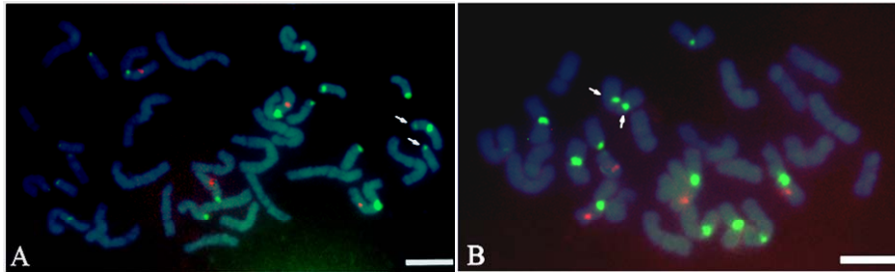


Figura 4 Sítios de rDNA 45S (verdes) e 5S (vermelhos) em cromossomos da planta 33, de *Lolium perenne* cv. Oro verde (tetraploide). As setas indicam cromossomos com dois sítios de rDNA 45S íntegros (A) um sítio íntegro e outro quebrado no mesmo cromossomo; (B) dois sítios íntegros. Barra 5 $\mu$ m.

Todas as metáfases das plantas diploides e tetraploides analisadas apresentaram, respectivamente, dois e quatro cromossomos com um sítio de rDNA 5S. A análise concomitante com sondas rDNA 45S, mostrou que os sítios ribossomais 5S eram sintênicos com o rDNA 45S, independente do nível de ploidia e da planta analisada (Tabela 2, Figuras 2, 3 e 4).

A análise dos cromossomos em pró-metáfases e metáfases das plantas diploides e tetraploides 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, observa-se, inclusive dentro de um mesmo meristema, que cromossomos menos compactados apresentam maior número de quebras e lesões (Figura 2 A e C e Figura 4 A) em relação às metáfases com cromossomos mais condensados (Figura 2 B e D e Figura 4 B).

Nas plantas tetraploides, em metáfases com cromossomos íntegros ou metáfases com fragmentos próximos aos cromossomos de origem, nos quais foram desconsiderados os sinais extras provenientes de quebras e lesões, foi observado que o número de sítios de rDNA 45S não correspondia ao número esperado após a poliploidização. Nenhum dos indivíduos tetraploides analisados apresentou o dobro dos sítios em relação às plantas diploides, ou seja, 14 sítios.



Na planta tetraploide Oro verde 33 foram observadas metáfases com cromossomos intactos que apresentavam 13 sítios distribuídos em 12 dos 28 cromossomos, sendo dois sintênicos (Figura 4 B). Metáfases das plantas tetraploides Oro verde 27, 30, 34, 37 e 43 apresentaram invariavelmente 12 sítios em diferentes cromossomos (Figura 2 D). Na planta tetraploide Oro verde 29 foram detectados 13 sítios, sendo um por cromossomo (Figura 5 F).

Nas metáfases dos genótipos diploide e tetraploide analisados não foram observadas bandas DAPI<sup>+</sup> (regiões ricas em AT) (Figura 5 A e D), mas foi observado um grande número de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (regiões ricas em CG). Embora observadas com boa repetibilidade, a quantidade e localização das bandas CMA<sup>+</sup> variou entre as plantas da cultivar diploide e entre as tetraploides. Nos diploides foram quantificadas seis, sete, oito e nove marcas (Figura 5 B) e nos tetraploides, metáfases com 10, 11, 13, 16, 17, 18, 19 e 22 marcas com tamanhos e localização variáveis (Figura 5 E) em ambas as cultivares as bandas CMA<sup>+</sup> estavam co-localizadas com sinais de rDNA 45S (Figura 5 B e C; E e F).

Em todos os sítios íntegros foram detectadas bandas CMA<sup>+</sup>, enquanto nos sítios que apresentavam quebras/lesões, em alguns casos, sinais CMA<sup>+</sup> não foram visualizados em um dos lados ou até mesmo em ambos os lados do sítio frágil (Figura 5 B, C, E e F).

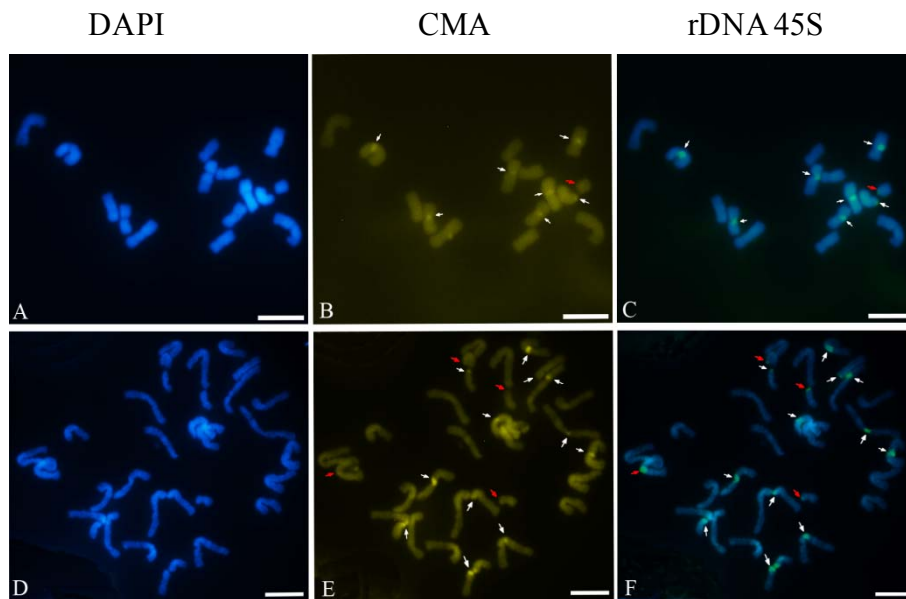


Figura 5 Bandamento DAPI e CMA e FISH rDNA 45S (verdes) em plantas diploides e tetraploides de *Lolium perenne*. Setas brancas mostram sinais FISH correspondentes às bandas/sinais CMA<sup>+</sup> e setas vermelhas sinais FISH que não apresentam sinais CMA<sup>+</sup> correspondentes. Barra 5µm.

A avaliação da atividade transcricional mostrou que nem todos os sítios de DNAr 45S marcados na FISH estavam ativos. Nas cultivares Ellet diploide e Oro verde tetraploide foram observadas sete e nove bandas Ag-NOR, respectivamente, desconsiderando as quebras e lesões (Figura 6 A-D).

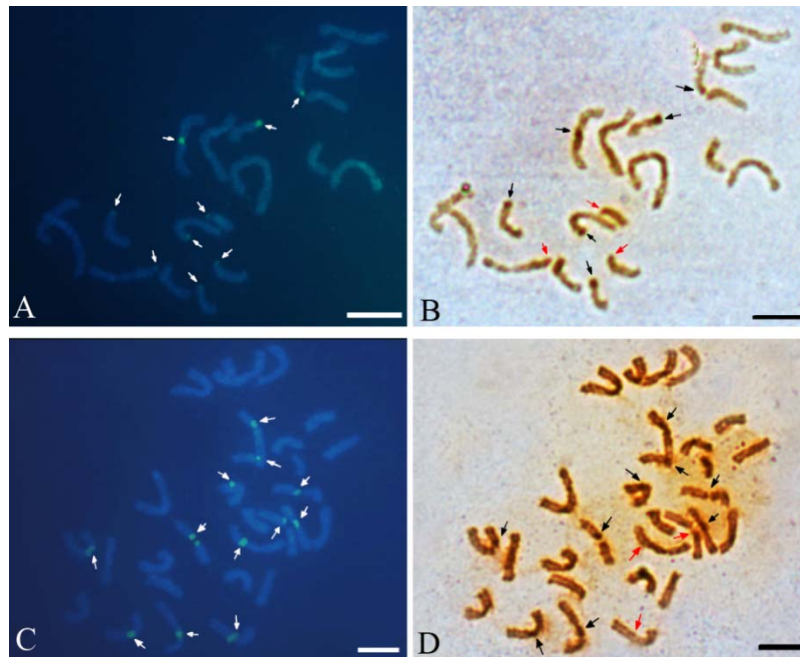


Figura 6 A Sítios de rDNA 45S e bandas Ag-NOR em *L. perenne* cv. Ellet diploide (A e B) e cv. Oro verde tetraploide (C e D). Setas vermelhas mostram sítios inativos e setas pretas, ativos. Barra 5 $\mu$ m.

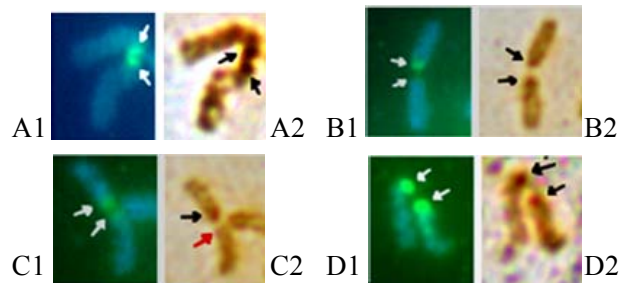


Figura 7 Características dos sítios de rDNA evidenciadas por FISH rDNA 45S e co-localizadas com Ag-NOR. Setas pretas indicam genes ou segmentos de rDNA 45S ativos e setas vermelhas indicam inatividade; (A1 e A2) cromossomo lesionado com sinais de tamanhos semelhantes, ambos ativos; (B1 e B2) cromossomo quebrado com sinais de tamanhos diferentes, ambos ativos; (C1 e C2) cromossomo quebrado com apenas o maior sinal ativo; (D1 e D2) cromossomo quebrado com sinais de tamanhos semelhantes, ambos ativos.

Os sítios lesionados, ou até mesmo alguns sítios quebrados, apresentaram marcação com Ag-NOR nas duas partes do sítio (Figura 7 A, B e D). Em outras quebras, observou-se que a menor parte do sítio foi inativada (Figura 7 C). Alguns sítios íntegros e fragilizados não apresentaram atividade transcricional (Figura 6 B e D).

Nas plantas da cultivar diploide, o número de nucléolos variou de três a cinco, com maior frequência de um e dois nucléolos (Tabela 3 e Figura 8). Nas plantas tetraploides, o número de nucléolos variou de um a seis, com maior frequência de dois e três nucléolos (Tabela 3 e Figura 8). Tanto na planta diploide quanto na tetraploide foram observadas fusão e dissociação nucleolares (Figura 8 G e H). Os nucléolos apresentaram tamanhos variáveis entre 21,4µm a 3,2 µm, tendo por base células em G2.

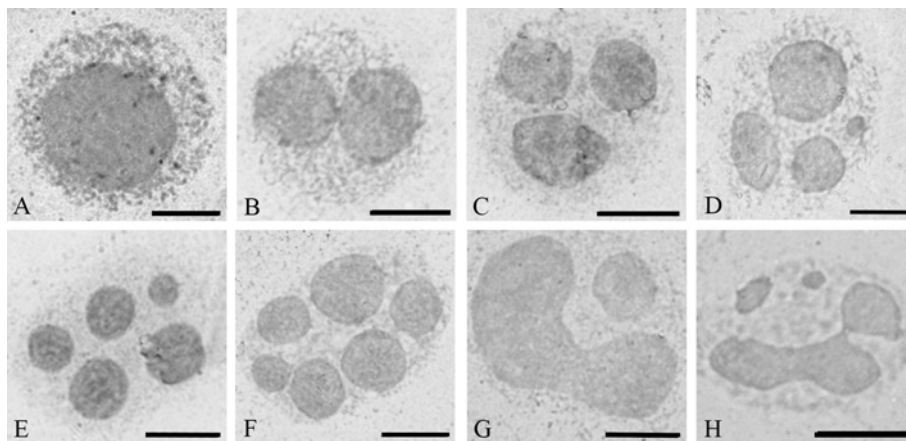


Figura 8 Número de nucléolos em *L. perenne* da cv. Ellet (diploide) e da cv. Oro verde (tetraploide) (A) 1 (B) 2 (C) 3 (D) 4 (E) 5 (F) 6 (G) fusão nucleolar (H) dissociação nucleolar. Barra 10µm.

Tabela 3 – Número de nucléolos, número de células contabilizadas e número de bandas Ag-NOR<sup>+</sup> em de *L. perenne* diploide e tetraploide.

Cultivar	Ag NORs/ Metáfase		N° de Nucléolos/ Células					
	Ag NOR <sup>+</sup>	N° de sítios rDNA 45S	1	2	3	4	5	6
Ellet 1(2x)	6	7	63	64	15	7	1	-
Oro verde 34 (4x)	9	12	28	43	42	26	8	3

## 5 DISCUSSÃO

A morfologia dos cromossomos intactos de *L. perenne* diploide, de forma geral, é semelhante à descrita por Malik e Thomas (1966), que mostraram que todas as espécies de *Lolium* apresentam três pares de cromossomos com constrições secundárias, mais um par com cromossomos medianos ou submedianos e mais 3 pares menores submedianos para subterminais.

O mapeamento das regiões de rDNA 45 e 5S, realizadas nesse estudo para a cv. diploide coincide com a descrição feita por Thomas et al. (1996), os quais mostraram sete sítios 45S, sendo seis correspondentes com a constrição secundária, e todos localizados na região proximal no braço longo. O mesmo estudo mostrou que a espécie apresenta dois sítios 5S localizados no braço curto dos cromossomos do par 3 em sintonia com um sítio 45S no braço oposto.

Diferente do observado nesse estudo e em outras espécies de Poaceae (TAKETA et al., 2005; WINTERFELD; RÖSER, 2007b), a maioria das angiospermas apresenta os sítios de rDNA 45S localizados mais frequentemente na região terminal e no braço curto dos cromossomos (ROA; GUERRA, 2012).

Uma das causas da variação na localização e no número de sinais rDNA 45S observada em *L. perenne* é decorrente da formação de quebras e/ou lesões nos sítios de rDNA 45S que podem ocorrer em uma ou em ambas as cromátides irmãs. Essas quebras ou lesões podem fragmentar de modo aleatório os cromossomos detentores das sequências de rDNA 45S gerando um maior número de sinais na FISH rDNA 45S, quando esses são divididos em dois, e originando fragmentos extras e sinais de diferentes tamanhos, conforme também descrito por Huang et al. (2008). Recentemente Bustamante (2012) realizou estudos com *L. multiflorum* e

relatou a variabilidade para os sítios 45S e a ocorrência de sítios frágeis em plantas diploides, tetraploides e em progênies desse cruzamento.

Huang et al. (2008) descreveram que em algumas lesões, as extremidades do fragmento e o cromossomo quebrado estavam ligados por um filamento de cromatina detectado na técnica de FISH. A análise destas lesões por meio da técnica de AFM (Microscopia de força atômica) 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. 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*.

O sítio frágil está envolvido no processo de variação cromossômica, incluindo rearranjos e ampliações, e assim, trata-se de um mecanismo potencial para a especiação (BROWN; O'NEILL, 2010). Além disso, os sítios frágeis podem ser geradores de instabilidade cromossômica e representar regiões fracas do genoma que são capazes de passar por eventos de recombinação e contribuir para a evolução cariotípica (RUIZ-HERRERA; ROBINSON, 2007).

A compactação do DNA parece interferir na expressão dos sítios frágeis ou levar a uma reestruturação ou adesão das partes fragmentadas. 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 por Huang et al. (2008, 2009).

Buscando averiguar a relação entre as alterações epigenéticas e a expressão de sítios frágeis em plantas, recentemente Huang et al. (2012) testaram actinomicina D (ActD) e ampicolina (APH) em gramíneas como

milho, arroz, cevada, sorgo. A ActD é um inibidor de transcrição e a APH promove retardo na replicação. Os autores observaram que a ActD causou aberrações nos sítios 45S semelhante as observadas em *L. perenne*. Análises específicas em milho tratado com ActD mostrou que nos sítios 45S houve diminuição de histonas H3, 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.

A ausência de sinais teloméricos nas extremidades dos sítios 45S dos fragmentos e dos cromossomos quebrados correspondentes à região 45S, demonstra a inexistência de sequências teloméricas nesses locais. Considerando que os telômeros são estruturas básicas de proteção e essenciais para manter a estrutura e funcionalidade dos componentes dos cromossomos eucarióticos (BIESSMAN; MASON, 1992; BLACKBURN, 1991), poderia se esperar que nas plantas avaliadas ocorressem danos que poderiam afetar a integridade do genoma, causando efeitos citogenéticos deletérios nas fases posteriores do ciclo celular se as quebras forem mantidas.

Até o momento, não há relatos sobre os efeitos da manutenção das quebras cromossômicas na mitose e do seu comportamento na meiose em *Lolium*. No entanto, em um trabalho recente realizado por Nunes et al. (2012) foram observadas altas taxas de viabilidade (>89%) dos grãos de pólen em vários genótipos de *L. multiflorum* avaliados por Bustamante (2012), nos quais foram detectados a expressão dos sítios frágeis, demonstrando, aparentemente, não haver influência destes na produção de gametas.

A presença de sítios de rDNA 45S sintênicos na cv. Oro verde também foi observada por Thomas, Harper e Morgan (2001) em três



metáfases de um único genótipo de *L. rigidum* e por Bustamante (2012) em *L. multiflorum*, onde os duplos sinais 45S foram observados em plantas diploides e tetraploides.

A variação intraespecífica observada no número de locos de rDNA 45S em *L. perenne* parece não ser rara em plantas (HAYASAKI; MORIKAWA; LEGGET, 2001) e diferentes mecanismos podem estar envolvidos nesse processo como: rearranjos cromossômicos, permuta genética desigual, conversão e transposição gênica (mobilidade gênica) (DUBCOVSKY; DVORAK, 1995; SCHUBERT; WOBUS, 1985; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001).

Nas plantas tetraploides, a observação de um número menor de sítios 45S do que o esperado pode ser devido a perda de genes 45S rDNA ou de sequências dentro do gene que ocorrem após a poliploidização, aparentemente porque as células vegetais frequentemente possuem mais cópias do que o necessário para síntese dos ribossomos (PHILLIPS, 1978; ROGERS; BENDICH, 1987; WINTERFELD; RÖSER, 2007b). O número de cópias do gene rRNA evolui rapidamente, resultando em reposicionamento ou a perda de alguns locus, bem como resultando na redução do número de cópias da sequências reduzindo o tamanho dos sítios (JIANG; GILL, 1994; RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a).

A variação no número e localização de genes ribossomais 45S já foi descrita em espécies de *L. perenne*, *L. multiflorum*, no entanto, nestes estudos não foram relatados indícios de quebras nos sítios de rDNA 45S (KSIACZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010; LIDEIKYTE et al., 2008).

O número e localização dos sítios rDNA 5S nas plantas diploides condiz com os relatos de Thomas et al. (1996). A sintenia deste gene com os genes 45S foi observada tanto nas plantas diploides quanto nas tetraploides. Essa observação mostra que aparentemente a estrutura do cromossomo 3 em

relação à posição desse sítio foi mantida após a poliploidização nas plantas avaliadas. Devido à função de ambos os rDNAs, presume-se que eles permaneçam próximos, sendo a sintenia um fator favorável (MONTIJN et al., 1999; PEDROSA; SCHWEIZER; GUERRA, 2000). A conservação do número de sítios 5S em plantas diploides e tetraploides também foi relatada em várias plantas de *L. perenne* e *L. multiflorum* estudadas por Ksiazczyk, Taciak e Zwierzykowski (2010) e Lideikyte et al. (2008).

No presente trabalho, o gene rDNA 5S, por estar em sintenia com o sítio 45S, se mostrou um eficiente marcador que permite inferir que as quebras/lesões ocorrem de forma aleatória nos cromossomos homólogos do par 3 de *L. perenne*. Em um mesmo meristema foram encontradas metáfases com grau de compactação semelhante, em que os cromossomos do par 3 apresentavam diferentes número de quebras ou lesões nos sítios 45S sintênicos aos sítios 5S, demonstrando assim que provavelmente não existe uma relação, ou um padrão da expressão dos sítios frágeis entre esses cromossomos homólogos tanto em plantas diploides quanto em plantas tetraploides. Huang et al. (2008) relataram não ter conhecimento da frequência com que cada um dos sete sítios 45S está envolvido na expressão dos sítios frágeis devido à difícil identificação ou discriminação dos cromossomos de *L. perenne*. Assim, em seu estudo, não foi possível saber se existia preferencialmente cromossomos detentores dos sítios de rDNA que seriam mais propensos à ruptura e qual era o comportamento das quebras em cromossomos homólogos.

Em relação à ausência de bandas DAPI nos genótipos de *L. perenne* avaliados pode-se inferir que não existem segmentos longos ricos em pares de bases A-T nos cromossomos ou que estas sequências estejam interdispersas pelo genoma de forma a não favorecer a visualização de bandas cromossômicas. A detecção de bandas DAPI<sup>+</sup> pode sofrer interferência dependendo da disposição dos nucleotídeos A-T nos sulcos da

hélice do DNA e da associação de proteínas histônicas e não-histônicas (BARROS; SILVA; GUERRA, 2009; WINTERFELD; RÖSER, 2007a).

As bandas CMA tanto íntegros quanto em sítios quebrados/lesionados identificou arranjos ricos em C-G. Os sítios rDNA 45S em muitas plantas superiores são ricos em pares de bases GC (KING et al., 1993) e mostram uma fluorescência mais intensa da cromomicina (HOSHI; PLADER, MALEPSZY, 1998). Winterfeld e Röser (2007b) identificaram em aveias perenes dos gêneros *Ammophila*, *Amphibromus*, *Arrhenatherum*, *Avena* e *Helictotrichon* alta correlação de bandas CMA co-localizadas com os genes de rDNA 45S com constrição secundária. Segundo os autores, 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.

Em humanos, uma das causas da fragilidade está ligada a 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 a fragilidade estava diretamente ligada ao tamanho das repetições CCG e ao grau de metilação em ilhas CpG (JONES et al., 1995).

A ausência de sinais CMA<sup>+</sup> em alguns fragmentos pode ser explicada por uma descompactação ou pela redução do tamanho das sequências C-G na região da quebra ou lesão que interfere na intensidade da cromomicina e inviabilizar a visualização dos sinais CMA<sup>+</sup>. Huang et al. (2009) mostraram que, em algumas lesões, a extremidades dos sinais 45S apresentavam baixa densidade de DNA pela técnica AFM (Microscopia de força atômica).

Nas plantas diploides, apenas um dos sete sítios não apresentou atividade, o que representa um aproveitamento de cerca de 85% da capacidade transcricional, já no tetraploide três dos 12 sítios não foram marcados pela prata o que corresponde à 75% de ativação. Considerando os

14 sítios, para uma melhor comparação com o diploide, a proporção de sítios ativos não chega a 65%. A menor proporção de sítios marcados pela prata no tetraploide em relação ao diploide demonstrou que existe uma diminuição da atividade transcricional.

As células de plantas geralmente possuem mais cópias rDNA do que o necessário para a síntese de ribossomos (PHILLIPS, 1978; ROGERS; BENDICH, 1987). O nível de transcrição de genes de rRNA em células eucarióticas é altamente regulado de acordo com a síntese de proteínas requisitadas nas células. A regulação por compensação de dosagem pode ocorrer variando o número de sítios ativos ou diminuindo a atividade de todos os sítios, em resposta a fatores como nutrição e crescimento (MCSTAY, 2006).

A ausência de atividade em uma das extremidades de alguns segmentos cromossômicos que sofreram quebras poderia ser explicada pela ausência de fatores de transcrição no segmento, pois nem todo rDNA, mesmo que em estado eucromático, é transcrito, ou ainda pela regulação do número de repetições dentro dos sítios rDNA que são transcritos (HUANG; ROTHBLUM; CHEN, 2010; MCSTAY, 2006). Carpeta et al. (2002) relataram que pequenas modificações na estrutura do genoma são suficientemente capazes de alterar a expressão gênica dos genes ribossomais 45S em cromossomos homólogos de centeio.

O número de nucléolos observados na planta diploide e tetraploide é proporcionalmente menor que o número de bandas Ag-NOR. Carnide e Orellana (1986) analisaram o número de nucléolos em várias plantas de *L. perenne*. Nos diploides, os autores descreveram de quatro a sete sítios ativos e foram contabilizados, no máximo, até seis nucléolos sendo a maior frequência de um e dois. Nos tetraploides observaram de nove a 12 RONS e de um a 12 nucléolos, com maior frequência de três, quatro e cinco nucléolos, em ambos níveis de ploidia houve tamanho variável dos

nucléolos. Bustamante (2012) também não encontrou correspondência entre número de constrictões secundárias e o número máximo de nucléolos em cultivares diploides e tetraploides de *L. multiflorum* que apresentavam sítios frágeis.

Os diferentes tamanhos dos nucléolos observados podem estar relacionados a um padrão de expressão transcricional diferencial entre os genes de *L. perenne*. Carpeta et al. (2002) relataram que existe um consenso entre os estudos de regulação da expressão gênica dos rDNA 45S de que os diferentes loco apresentam habilidades distintas de recrutar fatores de transcrição. Essa habilidade está relacionada principalmente a diferenças no número de unidades repetidas contidos nos genes e poderia levar a uma forma de dominância nucleolar. Segundo os mesmos autores, até mesmo o heteromorfismo de tamanho entre cromossomos homólogos pode causar expressão diferencial na transcrição das NORs.

A fusão de nucléolos é um fenômeno que já foi relatado para algumas espécies vegetais, dentre elas cevada (SCHUBERT; KUNZEL, 1990) e *L. multiflorum* (BUSTAMANTE, 2012). Em *L. perenne* foram evidenciadas fusões nucleolares tanto nas plantas diploides quanto nas tetraploides. Esse fenômeno poderia explicar o menor número de nucléolos em relação ao número de genes ativos. Huang et al. (2012), ao averiguarem a atividade transcricional em milho, no qual havia sido induzido a fragilidade no sítio 45S usando actinomicina D, verificou que ocorreu a iniciação da transcrição nestes sítios, ou seja, houve a alocação de fatores de transcrição, porém o alongamento do RNA heterogêneo foi interrompido, não formando o rRNA.

A ocorrência das quebras nos sítios rDNA 45S poderia levar a fragmentação nucleolar, um mecanismo não descartado no presente trabalho devido ao aspecto de alguns nucléolos. Segundo Boulon et al. (2010), estresses durante o ciclo celular podem, muitas vezes, levar a reorganização

da arquitetura nucleolar, como observado por Huang et al. (2012). Neste trabalho, os autores relataram alteração na organização nucleolar em milho tratado com actinomicina D onde o número de nucléolos observados para o controle foi de um ou dois, enquanto que nos núcleos tratados com a actinomicina D foram visualizados até dez nucléolos. Os autores sugeriram que a inibição transcricional oriunda do tratamento com a actinomicina D resultou na dispersão dos genes de rRNA para o nucleoplasma, contribuindo para a formação de múltiplos nucléolos.

## 6 CONCLUSÃO

Existe variabilidade no número e posição dos sítios de rDNA 45S, inclusive com a presença de mais de um sítio em um mesmo cromossomo.

Os sítios de rDNA 45S são ricos em nucleotídeos C-G (CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>) e constituem sítios frágeis que se expressam sob a forma de quebras e lesões com geração de fragmentos cromossômicos.

A expressão dos sítios frágeis entre cromossomos homólogos do par 3, tanto em plantas diploides quanto em plantas tetraploides ocorre de forma aleatória.

Os sítios de rDNA 45S fragilizados apresentam atividade transcricional alterada.

**REFERÊNCIAS**

- ANHALT, U. C. M. et al. Quantitative trait loci mapping for biomass yield traits in a *Lolium* inbred line derived F<sub>2</sub> population. **Euphytica**, Wageningen, v. 170, n. 1/2, p. 99-107, 2009.
- APPEL, S. R. et al. Two repeated DNA sequences from the heterochromatic regions of rye (*Secale cereale*) chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 84, n. 2, p. 265-277, 1981.
- ARAÚJO, A. A. **Forrageiras para ceifa: capineiras, fenação e ensilagem**. Porto Alegre: Sulin, 1978. 196 p.
- AUNG, T.; EVANS, G. M. The potential for diploidizing *Lolium multiflorum* × *L. perenne* tetraploids. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 27, n. 5, p. 506-509, 1985.
- BALFOURIER, F.; IMBERT, C.; CHARMET, G. Evidence for phylogenetic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe: a cpDNA study. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 1/2, p. 131-138, 2000.
- BARKER, R. E. et al. Use of flow cytometry to determine ploidy level of ryegrass. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 29, n. 2, p. 493-502, 2001.
- BARROS, E.; SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, Louisville, v. 85, n. 2, p. 115-125, Apr. 2009.
- BEDBROOK, J. R. et al. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. **Cell**, Cambridge, v. 19, p. 545-560, 1980.



BENNETT, S. J. A phenetic analysis and lateral key of the genus *Lolium* (Gramineae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 44, n. 1, p. 63-72, Feb. 1997.

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.

\_\_\_\_\_. Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Wageningen, v. 47, n. 3, p. 247-255, June 2000.

BIESSMANN, H.; MASON, J. M. Functional reconstitution of wild-type and mutant Tetrahymena telomerase. **Advances in Genetics**, New York, v. 30, p. 185-249, Mar. 1992.

BLACKBURN, E. H. Structure and function of telomeres. **Nature**, London, v. 350, n. 6319, p. 569-573, Apr. 1991.

BOLARIC, S. et al. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. **Plant Breeding**, Berlin, v. 124, n. 3, p. 257-262, June 2005.

BOULON, S. et al. The nucleolus under stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 216-227, Oct. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.

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.

BULIŃSKA-RADOMSKA, Z.; LESTER, N. Relationships between five

species of *Lolium* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 148, p. 169-175, 1985.

BUSTAMANTE, F. O. **Variabilidade nos sítios de rDNA, morfologia e viabilidade polínica de *Lolium multiflorum* Lam. (Poaceae)**. 2012. 95 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CAPERTA, A. D. et al. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. **Journal of Cell Science**, London, v. 115, n. 14, p. 2839-2846, July 2002.

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.

CHARMET, G.; BALFOURIER, F. Isozyme variation and species relationships in the genus *Lolium* L. (ryegrasses, Gramineae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, n. 6, p. 641-649, Jan. 1994.

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.

CORRÊA, B. O. et al. Caracteres agronômicos em populações locais de azevém no Sul do Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 274-282, 2007.

COSGROVE, D.; CASLER, M.; UNDERSANDER, D. **Ryegrass types for pasture and hay**. Ithaca: Agronomy Advice FC, 1999. Disponível em:

<<http://www.uwex.edu/ces/forage/pubs/ryegrass.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

DATSON, P. M.; MURRAY, B. G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 845-857, 2006.

DELAY, C.; PETIT, D. Chromosomes surnumeraires chez des Graminees. **Annals of Caryosystematic and Cytogenetics**, Washington, v. 6, p. 1-4, 1972.

DENIZ, B. Meiotic behaviour in reciprocal tetraploid hybrids between perennial and Italian ryegrasses. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wallington, v. 51, n. 1, p. 33-37, 2008.

DENIZ, B.; DOGRU, U. Interspecific hybridisation in *Lolium* evaluated by morphological genetic markers. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 50, n. 3, p. 279-284, 2007.

DONG, F. et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 101, n. 7, p. 1001-1007, 2000.

DUBCOVSKY, J.; DVORAK, J. Ribosomal-RNA multigene loci-nomads of the Triticeae genomes. **Genetics**, Austin, v. 140, n. 4, p. 1367-1377, Aug. 1995.

EVANS, P. S. Comparision of some aspects of the anatomy and morphology of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* LAM.) and Perennial ryegrass (*L. Perenne* L.). **New Zealand Journal of Botany**, Wallington, v. 2, p. 120-130, 1964.

FARUQI, S. A. et al. Studies in Libyan grasses: chromosome number and some interesting features. **Annals of Botany**, Oxford, v. 45, p. 75-102, 1987.

FEARON, C. H.; HAYWARD, M. D.; LAWRENCE, M. J. Self-incompatibility in ryegrass: V., genetic control, linkage and seed-set in diploid *Lolium multiflorum* Lam. **Heredity**, Cary, v. 50, n. 1, p. 35-45, 1983.

FONTANELI, R. S.; FONTANELI, R. S. Subsídio ao planejamento forrageiro para produção de leite em pastagens durante o ano todo. In: FONTANELI, R. S.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). **Sistema de produção de leite**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2000. p. 59-84.

FRAKES, R. V. The ryegrasses. In: HEATH, M. E.; METCALFE, D. S.; BARNES, R. F. (Ed.). **Forages, the science of grassland management**. Ames: Iowa State University, 1973. p. 307-313.

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, Feb. 2001.

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

GUERRA, M. (Org.). **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 180 p.

\_\_\_\_\_. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 741-743, 1986.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.

HANNAWAY, D. et al. **Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)**. Disponível em:

<<http://cropandsoil.oregonstate.edu/News/Publicat/Hannaway/PerRye/complete.html>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

HAYASAKI, M.; MORIKAWA, T.; LEGGET, J. M. Intraespecific variation

of 18S-5.8S-26S rDNA sites revealed by FISH and RFLP in wild oat, *Avena agadiriana*. **Genes and Genetic Systems**, Shizuoka, v. 76, n. 1, p. 9-14, Feb. 2001.

HESLOP-HARRISON, J. S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 617-635, May 2000.

HOSHI, Y.; PLADER, W.; MALEPSZY, S. Physical mapping of 45S rRNA gene loci in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) using fluorescence *in situ* hybridization. **Caryologia**, Firenze, v. 52, n. 1/2, p. 49-57, 1998.

HU, T. et al. Assessing genetic diversity of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from four continents by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 83, p. 19365-19374, 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.

\_\_\_\_\_. 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.

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

HUANG, S.; ROTHBLUM, L. I.; CHEN, D. Ribosomal chromatin: the meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, Louisville, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2010.

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. O. The value of polyploidy in breeding hybrid grasses. In: MEETING OF THE FODDER CROPS SECTION OF EUCARPIA, 17., 1991, Alghero. **Proceedings...** Alghero: MFC, 1991. p. 37-44.

HUMPHREYS, M. W.; CANTER, P. J.; THOMAS, H. M. Advances in introgression technologies for precision breeding within the *Lolium - Festuca* complex. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 143, n. 1, p. 1-10, 2003.

JAUHAR, P. P. Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: DAMANIA, A. B. (Ed.). **Biodiversity and wheat improvement**. Ciudad del Mexico: A. Wiley-Sayce, 1993. p. 103-104.

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

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, J.; GILL, B. S. New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal and marks for the evolution of polyploid wheats. **Chromosoma**, Berlin, v. 103, n. 3, p. 179-185, June 1994.

JIMENEZ, C.; JENKINS, G. Lateral element lengths and nuclear disposition in *Lolium*. **Heredity**, Cary, v. 75, n. 4, p. 273-280, 1995.

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.

KALENDAR, R. et al. Genome evolution of wild barley (*Hordeum*

*spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 12, p. 6603-6607, 2000.

KING, K. et al. Molecular evolution of the intergenic spacer in the nuclear ribosomal RNA genes of Cucurbitaceae. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 36, n. 2, p. 144-152, Feb. 1993.

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

KOPECKÝ, D. et al. Chromosome pairing of individual genomes in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), its progenitors, and hybrids with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 124, n. 2, p. 170-178, 2009.

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

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.

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.

LAMP, C. A.; FORBES, S. J.; CADE, J. W. **Grasses of temperate Australia: a field guide**. Melbourne: Inkata, 2001. 83 p.

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.

LOOS, 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, 1993a.

\_\_\_\_\_. Morphological variation in *Lolium* (Poaceae) as a measure of species relationships. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 188, n. 1/2, p. 87-99, 1993b.

LÜBBERSTEDT, T.; SCHEJBEL, A. B.; BACH, H. P. Development of ryegrass allele-specific (GRASP) markers for sustainable grassland improvement: a new EU framework V project. **Genetics and Plant Breeding**, Berlin, v. 39, p. 125-129, 2003. Special issue.

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

MCDONALD, G. M. et al. Holocene tree line history and climate change across northern Eurasia. **Quaternary Research**, San Diego, v. 53, n. 3, p. 302-311, May 2000.

MCGRATH, S.; HODKINSON, T. R.; BARTH, S. Extremely high cytoplasmic diversity in natural and breeding populations of *Lolium* (Poaceae). **Heredity**, Cary, v. 99, n. 5, p. 531-544, Nov. 2007.

MCSTAY, B. Nucleolar dominance: a model for rRNA gene silencing. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, p. 1207-1214, Apr. 2006.

MITTELMANN, A. et al. Variabilidade entre plantas de azevém para caracteres relacionados à precocidade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1249-1250, jul./ago. 2004.



MONTIJN, M. B. et al. The 5S rRNA gene clusters have a defined orientation toward the nucleolus in *Petunia hybrida* and *Crepis capillaris*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 387-399, 1999.

MUKAI, Y.; ENDO, T. R.; GILL, B. S. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. **Journal of Heredity**, Cary, v. 81, n. 4, p. 290-295, 1990.

NAYLOR, B. Species differentiation in the genus *Lolium*. **Journal of Heredity**, Cary, v. 15, p. 219-233, 1960.

NELSON, D. L. The fragile X syndromes. **Seminars in Cell Biology**, London, v. 6, n. 1, p. 5-11, Feb. 1995.

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.

PEDROSA, A. et al. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicas*. **Genetics**, Austin, v. 161, n. 4, p. 1661-1672, Aug. 2002.

PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 3/4, p. 361-367, Feb. 2000.

PEREIRA, R. C. et al. Poliploidização induzida em *Lolium multiflorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA Gado e Leite, 2011.

Disponível em:

<<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=pc&id=921933&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22PASQUAL,%20M.%22&qFacets=autoria:%22PASQUAL,%20M.%22&sort=ano-publicacao&paginacao=t&paginaAtual=1>>.

Acesso em: 10 dez. 2012.

PHILLIPS, R. L. Molecular cytogenetics of the nucleolus organizer region. In: WALDEN, D. B. (Ed.). **Maize breeding and genetics**. New York: Wiley, 1978. p. 711-742.

PINTO, L. F. E.; LAUS, J. A.; PAULETTO, E. A. Solos de várzea no sul do Brasil. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. (Ed.). **Arroz irrigado no sul do Brasil**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. p. 75-95.

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

POPESCU, N. C. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 192, n. 1, p. 1-17, Mar. 2003.

RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Activity of the *En/Spm*-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 153-161, 2004a.

\_\_\_\_\_. Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 41, p. 14818-14823, Oct. 2004b.

RICHARDS, E. J.; AUSUBEL, F. M. Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, Cambridge, v. 53, p. 127-136, 1988.

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.

RICHARDSON, M. D. et al. Meadow fescue and tetraploid perennial ryegrass-two new species for overseeding dormant bermudagrass turf. **Crop**

**Science**, Madison, v. 47, n. 1, p. 83-90, Jan. 2007.

RIEGER, R.; MICHAELIS, A.; GREEN, M. M. **Glossary of genetics**. 5<sup>th</sup> ed. Berlin: Springer, 1991. 647 p.

ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 12, p. 255, Nov. 2012. Abstract.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number in an intergenic spacer. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 9, n. 5, p. 509-520, 1987.

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.

SALAMA, H. et al. Limited genotype- and ploidy-related variation in the nutritive value of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil Plant and Science**, Copenhagen, v. 62, n. 1, p. 23-24, 2012.

SCHUBERT, I.; KUNZEL, G. Position-dependent NOR activity in barley. **Chromosoma**, Berlin, v. 99, n. 5, p. 352-359, 1990.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, Berlin, v. 92, p. 143-148, 1985.

SMOLIAK, S. et al. **Alberta forage manual**. Edmonton: Alberta Agriculture, 1981. 87 p.

TAKETA, S. et al. Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with

the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 1, p. 23-33, 2005.

\_\_\_\_\_. Physical locations of 5S and 18S-25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. **Heredity**, Edinburgh, v. 86, n. 5, p. 522-530, May 2001.

TECHIO, V. H. et al. Meiotic and mitotic behaviour of B chromosomes of ryegrass. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 83-88, jan./fev. 2010.

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. Comparasion 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.; HARPER, J. A.; MORGAN, W. G. Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 9, n. 7, p. 585-590, 2001.

THOMAS, H. M.; HUMPHREYS, M. O. Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 117, n. 1, p. 321-326, Aug. 1991.

THOMPSON, K.; GRIME, J. P. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 893-921, Nov. 1979.

THOROGOOD, D. et al. Identification and mode of action of self-compatibility loci in *Lolium perenne* L. **Heredity**, Edinburgh, v. 94, n. 3, p. 356-363, Mar. 2005.

VAIO, M. et al. Localization of the 5S and 45S rDNA Sites and cpDNA sequence analysis in species of the *Quadrifaria* Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 191-200, Aug. 2005.

VOGEL, W. G. **A guide for revegetating coal minesoils in the eastern United States**. Broomall: USDA, 1981. 190 p.

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

WANG, Y.; BIGELOW, C. A.; JIANG, Y. Ploidy level and DNA content of perennial ryegrass germplasm as determined by flow cytometry. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 7, p. 2049-2052, 2009.

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.

WINTERFELD, G.; RÖSER, M. Chromosomal localization and evolution of satellite DNAs and heterochromatin in grasses (Poaceae), especially tribe Aveneae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 264, n. 1/2, p. 75-100, Mar. 2007a.

\_\_\_\_\_. 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, 2007b.

WITTMANN, M. T. S.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 9, n. 1/2, p. 155-164, 2003.

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.

ZHANG, P. et al. The centromere structure in robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary constriction. **Chromosoma**, Berlin, v. 10, n. 5, p. 335-344, Sept. 2001.

ZHANG, P. L. I. W. et al. BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. **Chromosoma**, Berlin, v. 112, n. 6, p. 288-299, Mar. 2004.