



FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE

**VARIABILIDADE NOS SÍTIOS DE rDNA,
MORFOLOGIA E VIABILIDADE POLÍNICA DE
Lolium multiflorum Lam. (Poaceae)**

LAVRAS – MG

2012

FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE

**VARIABILIDADE NOS SÍTIOS DE rDNA, MORFOLOGIA E VIABILIDADE
POLÍNICA DE *Lolium multiflorum* Lam. (Poaceae)**

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

Orientadora

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

LAVRAS – MG

2012

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

Bustamante, Fernanda de Oliveira.

Variabilidade nos sítios de rDNA, morfologia e viabilidade polínica de *Lolium multiflorum* Lam. (Poaceae) / Fernanda de Oliveira Bustamante. – Lavras : UFLA, 2012.

98 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Vânia Helena Techio.

Bibliografia.

1. Azevém anual. 2. Rearranjos cromossômicos. 3. rDNA 5S e 45S. 4. Grão de pólen. 5. Sítios frágeis. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

FERNANDA DE OLIVEIRA BUSTAMANTE

**VARIABILIDADE NOS SÍTIOS DE rDNA, MORFOLOGIA E VIABILIDADE
POLÍNICA DE *Lolium multiflorum* Lam. (Poaceae)**

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

APROVADA em 25 de julho de 2012.

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

UFLA

Dra. Andréa Mittelmann

EMBRAPA

Dra. Roselaine Cristina Pereira

UFLA

Prof. Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Profa. Dra. Vânia Helena Techio

Orientadora

LAVRAS – MG

2012

*As meninas do Lolium: Vânia, Laiane, Renata, Natália e Raphaela,
sem as quais esse trabalho não se concretizaria*

OFEREÇO

*Aos meus pais, Fernando e Vera, exemplos de vida, superação e por terem me
propiciado uma base tão sólida,
Ao amado irmão Frederico,
Ao companheiro e, acima de tudo amigo, Douglas.*

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.

A orientadora Vânia Helena Techio, exemplo de dedicação, comprometimento e responsabilidade. Serei sempre grata pelos constantes desafios propostos ao longo dessa jornada.

A coorientadora Lisete Chamma Davide, por todas as oportunidades, ensinamentos e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

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

A Giovana por toda a cumplicidade durante a implementação da técnica de hibridização *in situ* e por todo o conhecimento compartilhado.

A Rose, que além de amiga, sempre contribuiu para a condução desse trabalho.

Ao professor Sandro pelas valiosas contribuições.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos professores José Eduardo e Suzan, pelos ensinamentos e, em especial ao Professor Magno, exemplo de competência.

A oportunidade de ter feito parte da Associação dos Pós-Graduandos da UFLA, onde pude aprender muito sobre a estrutura da Universidade, ter tido um excelente contato com os reitores e pró-reitores, sempre dispostos a ajudar e, acima de tudo, ter realizado verdadeiros amigos: Alessandra, Alisson, Diogo, Jair, Jairo, Leandro, Lucas, Manuela, Melissa, Priscila e Renzo. Aproveito para agradecer aos integrantes do CEPE, CPA e FAEPE pelo bom convívio.

Aos funcionários do Departamento de Biologia: Sr. Antônio, D. Irondina, Heloíza, Zélia, Rafa, Viviane e Du, pela ótima convivência.

Aos laboratoristas que sempre me auxiliaram na condução deste trabalho: Lamartine, Fabrício e Ivani; e as colegas Ana Rafaela, Quelen e Mariana, o meu muito obrigada.

A todas (os) as (os) amigas (os) do Laboratório de Citogenética da UFLA pelo apoio e alegria em todos os momentos dessa jornada. É impossível citar os nomes, pois somos uma família em que cada um tem sua importância

singular. Assim, agradeço especialmente e individualmente cada integrante do laboratório. Obrigado por serem a minha família de Lavras.

Aos colegas de graduação, por todos os momentos especiais de minha vida, apesar dos cinco anos já passados, a amizade permanece a mesma.

Aos amigos de Lavras: D. Raimunda, Sr. Antônio, Lourdes, Tia Rosanita, Lívia e aos novos vizinhos do Jardim Dona Wanda, pelos bons momentos.

A toda a Pastoral da Família e em especial ao grupo Phoenix e a Galera da Alegria, por estarmos vencendo juntos todos os obstáculos da vida.

Ao grande amigo Pe. Israel (in memoriam), por me mostrar o verdadeiro caminho da felicidade e pelos exemplos de superação e dedicação. Agradeço também a todos os meninos da Fazendinha e aos Padres Joelbert e Antônio, pela amizade.

Aos afilhados Miguel, Beatriz e Pedro, por todo amor e por serem, muitas vezes, meu motivo para sorrir. As comadres Melina, Marla e Karina pela amizade e oportunidade de me tornar segunda mãe.

A todos os meus familiares: tios, tias, primos, primas, sogro, sogra, cunhados, cunhadas e sobrinhas. Vocês são o meu porto seguro.

Ao vovô Zezé, exemplo de determinação e persistência. Não existem limites para quem tem vontade de vencer na vida.

As vovós Esmerinda (in memoriam) e Culinha (in memoriam), meus exemplos de vida. A certeza de reencontrá-las daqui um tempo, que para mim é quase eterno, mas que na verdade passará em um piscar de olhos, faz com que eu não me permita ficar triste e me fortalece diariamente.

Ao irmão Frederico, por quem tento ser sempre melhor.

Aos meus pais Fernando e Vera, exemplos de vida, superação e por terem me propiciado uma base tão sólida. AMO VOCÊS!

Aos filhinhos Teddy e Maggie, por serem a alegria da casa e meus grandes companheiros.

Ao esposo, Douglas, por toda dedicação, paciência, otimismo, companheirismo, alegria, amizade, amor... Obrigada por fazer os meus dias valerem a pena. Amo você!

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 de minha vida.

“O valor das coisas
não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Sabino

"Quem passou pela vida em branca nuvem
E em plácido repouso adormeceu...
Quem não sentiu o fio da desgraça,
Quem passou pela vida e não sofreu...
Foi espectro de homem, não foi homem.
Só passou pela vida, não viveu."

Fernando Pessoa

RESUMO

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é a principal espécie forrageira de clima temperado cultivada no Brasil destinada à alimentação animal por apresentar características de interesse agrônomo. O programa de melhoramento genético da espécie conduzido pela Embrapa Clima Temperado conta com um banco de germoplasma com aproximadamente 200 acessos, fazendo-se necessária a caracterização dos mesmos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição, número e localização dos sítios de rDNA em cromossomos, relatar a atividade transcricional desses sítios e descrever a morfologia e viabilidade polínica de genótipos de *L. multiflorum* cultivados no Brasil. Não há variabilidade nos sítios de rDNA 5S, mas existe uma ampla variabilidade nos sítios de rDNA 45S, inclusive com a presença de mais de um sítio em um mesmo cromossomo. Aproximadamente 93% das metáfases analisadas apresentam pelo menos uma quebra/lesão no sítio de rDNA 45S, sendo que cada quebra resulta na formação de fragmentos. Assim, esse sítio corresponde a uma região de fragilidade cromossômica em *L. multiflorum*. Esses fatos podem ter implicações na organização do genoma, pois podem resultar em novos rearranjos cromossômicos, que juntamente com outros eventos, são responsáveis por mudanças genômicas microevolutivas envolvidas com os processos de diferenciação e especiação. Nem todos os sítios de rDNA 45S são ativos transcionalmente, sendo que mecanismos epigenéticos podem estar relacionados com o silenciamento de genes ribossômicos. Variação no número e tamanho de nucléolos, além de mecanismos de fusão nucleolar são observados nos genótipos de *L. multiflorum* avaliados. Os genótipos de azevém anual apresentam altas taxas de viabilidade polínica. Os grãos de pólen são pequenos, monoaperturados, com abertura não proeminente e com âmbito circular. As diferenças morfométricas entre os grãos de pólen podem auxiliar na distinção entre os mesmos e, posteriormente, serem utilizadas para comparação entre os níveis de ploidia, auxiliando assim, nos programas de melhoramento da espécie.

Palavras-chave: Azevém anual. rDNA 45 e 5S. Grão de pólen. Rearranjos cromossômicos. Sítios frágeis. Transposons.

ABSTRACT

The Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is the main temperate forage species cultivated in Brazil for animal feeding because of its desirable agronomic traits. The germplasm bank maintained by Embrapa Clima Temperado for breeding purposes has around 200 accessions lacking a wider characterization. Thus, the objective of this study was to evaluate the number, distribution and location of rDNA sites on chromosomes, to verify the transcriptional activity of these sites and to describe pollen morphology and viability of genotypes of *L. multiflorum* grown in Brazil. The 5S rDNA site is highly conserved, while for 45S rDNA there is a high variation within genotypes. Some genotypes show two sites of 45S rDNA on the same chromosome. Approximately 93% of metaphases analyzed have at least one breakage/gap at the site of 45S rDNA, resulting in the formation of fragments. Thus, the site of 45S rDNA corresponds to a region of chromosomal fragility in *L. multiflorum*. This phenomenon may have implications for genome organization, since it can result in new chromosomal rearrangements. Along with other events, these rearrangements are responsible for microevolutionary genomic changes involved in the processes of differentiation and speciation. Some sites of 45S rDNA are not transcriptionally active and epigenetic mechanisms may be related to ribosomal gene silencing. Variation in the number and size of nucleoli and nucleolar fusion are observed in *L. multiflorum*. The genotypes of *L. multiflorum* show high rates of pollen viability. Pollen grains are characterized as small, monoporate with circular and non-prominent apertures. Variation on pollen morphometric traits can be used to compare genotypes with different ploidy, assisting breeding programs of the species.

Keywords: Chromosomal rearrangements. Fragile sites. Italian ryegrass. Pollen grain. Transposon. 45 and 5S rDNA.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Taxonomia, características botânico-agronômicas e importância do azevém anual (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.).....	14
2.2 Aspectos gerais do melhoramento genético de azevém anual (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.).....	16
2.3 Características citogenéticas de azevém anual (<i>Lolium multiflorum Lam.</i>)	19
2.4 Estudos Polínicos	28
REFERÊNCIAS	31
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	40
ARTIGO 1 Variabilidade nos sítios de rDNA de <i>Lolium multiflorum Lam.</i>	40
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Material genético	46
2.2 Obtenção de metáfases mitóticas	47
2.3 Bandeamento Ag-NOR	47
2.4 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	48
2.5 Caracterização de quebras e lesões cromossômicas.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
Toc316658791 C:\Users\Usuario\Desktop\Tese_versao9.docx - Toc316658781	
ARTIGO 2 Morphology and Pollen Viability of <i>Lolium multiflorum</i> Lam.	75
1 INTRODUCTION	78
2 MATERIAL AND METHODS	80
3 RESULTS AND DISCUSSION	83
4 CONCLUSIONS	92
REFERENCES	94

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
----------------------------------	-----------

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Lolium* faz parte da família Poaceae e é composto por oito espécies, sendo quatro autógamas (*L. loliaceum* Bory & Chaubard, *L. persicum* Boiss. & Hohen., *L. remotum* Schrank e *L. temulentum* L.), três alógamas (*L. perenne* L., *L. rigidum* Gaundin e *L. multiflorum* Lam.) e uma com modo de reprodução intermediário (*L. canariense* Steud). Todas as espécies do gênero são diploides com $2n=2x=14$ e algumas cultivares poliploides foram obtidas com a utilização de colchicina em programas de melhoramento genético (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2012; MEYERS, 1939; POLOK, 2007; WIT, 1958, 1959).

Dentre as espécies do gênero, destacam-se *L. perenne* (azevém perene) e *L. multiflorum* (azevém anual) por suas importâncias econômicas como forrageiras (LÜBBERSTEDT; SCHEJBEL; BACH, 2003) e por serem amplamente cultivadas em regiões de clima temperado (FONTANELI, 1984). Ambas as espécies são originárias da bacia do Mediterrâneo de onde, posteriormente, se espalharam para diversas regiões temperadas (NELSON; PHILLIPS; WATSON, 1997).

No Brasil, acredita-se que o azevém anual tenha sido incorporado à região Sul do país a partir de 1875 por colonos italianos, sendo hoje amplamente cultivado no Rio Grande do Sul. Nessa região, o azevém anual é utilizado tanto para ceifa quanto para pastejo. Além disso, a espécie ocorre de forma espontânea em diferentes regiões, evidenciando sua excelente adaptação (ARAÚJO, 1978; CARVALHO, 2004; MORAES; MARASCHIN; NABINGER, 1995).

As atividades de melhoramento genético da espécie no Brasil foram inicialmente desenvolvidas na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul

(GIARETTA; JAMARDO; CATALOGNE, 1982), tendo continuidade com a criação da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul (FEPAGRO) (CASTRO et al., 2007), e na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), na época denominada EMPASC (DALL'AGNOL; GOMES; VIDOR, 1995; TCACENCO, 1989, 1995), dentre outras instituições. O melhoramento desenvolvido pela Embrapa teve início em 1999 com a coleta de germoplasma. O banco de germoplasma contém 201 acessos de azevém anual e o melhoramento é conduzido em parceria com outras unidades da Embrapa e outras instituições (BARBIERI et al., 2005).

Assim, diversos estudos visando melhorias em caracteres agronômicos de interesse têm sido realizados em *L. multiflorum* e demonstraram a existência de variabilidade entre os genótipos avaliados (CASTRO et al., 2003; CORRÊA et al., 2007; DIAS; GOMES; INFELD, 2001; FLORES et al., 2008; MITTELMANN et al., 2004b, 2010). No entanto, estudos citogenético-moleculares são importantes e ainda não foram bem explorados, podendo auxiliar na caracterização dessa espécie.

A caracterização citogenética envolvendo estudos básicos em azevém, como número cromossômico, construção do cariótipo e comportamento meiótico é bem compreendida (DELAY; PETIT, 1972; FARUQI et al., 1987; JAUHAR, 1975; KLEIJER, 1984; KOPECKÝ et al., 2010; SCHIFINO; WINGE, 1983; TECHIO et al., 2010). No entanto, a citogenética molecular apenas passou a ser utilizada para estudar a espécie há menos de duas décadas (HUMPHREYS; PASAKINSKIENE, 1996; PASAKINSKIENE et al., 1998; PASAKISKIENE; JONES, 2005).

Atualmente uma questão intrigante envolvendo o gênero *Lolium* é a variabilidade quanto ao número e distribuição de sinais de rDNA 45S (HUANG et al., 2008, 2009; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). Apesar dessa

variabilidade já ter sido descrita para genótipos cultivados em outros países, estudos citomoleculares ainda não foram realizados em genótipos de azevém anual cultivados no Brasil. O estudo das características citomoleculares é importante, uma vez que pode auxiliar no entendimento da organização do genoma, além de poder detectar rearranjos que tenham ocorrido na espécie, contribuindo assim, com a resolução das questões evolutivas do grupo, por revelar similaridades e diferenças entre espécies relacionadas.

Outra área que carece de informações no estudo de *Lolium* é a caracterização do grão de pólen e a sua viabilidade em diferentes genótipos, sejam cultivados em outros países (KIYOSHI et al., 2012; WANG et al., 2004) ou naturalizados no Brasil. Essas informações são importantes uma vez que podem indicar genótipos promissores para o programa de melhoramento genético da espécie.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição, número e localização dos sítios de rDNA em cromossomos de genótipos de *L. multiflorum* (diploides e poliploides) e relatar a atividade transcricional desses sítios. Em uma segunda análise, objetivou-se descrever a morfologia e a viabilidade polínica de *L. multiflorum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taxonomia, características botânico-agronômicas e importância do azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.)

O azevém anual (*L. multiflorum* Lam.) pertence à família Poaceae, subfamília Pooideae, tribo Poeae (WHEELER; JACOBS; WHALLEY, 2002). A espécie é originária da bacia do Mediterrâneo (sul da Europa, norte da África e Ásia Menor) de onde se espalhou para a Europa e, posteriormente, América do Norte (NELSON; PHILLIPS; WATSON, 1997). O azevém foi cultivado pela primeira vez na Itália e devido a tal fato também recebe o nome de azevém italiano (sinonímia *L. italicum*) (BARKER et al., 2005).

Na região sul do Brasil, o azevém anual provavelmente foi introduzido por colonos italianos a partir de 1875. Atualmente é uma das gramíneas hibernais mais cultivadas no Rio Grande do Sul devido às características como boa capacidade de rebrote, resistência ao pisoteio e ao pastejo mais intenso, facilidade de implantação e perenização da pastagem por ressemeadura natural (CARVALHO, 2004; OLIVEIRA; DUTRA; MORAES, 2001). As plantas são utilizadas para ceifa e em pastagens cultivadas, isoladamente ou consorciado, na alimentação dos rebanhos durante a estação fria do ano (ARAÚJO, 1978). Além disso, a espécie ocorre de forma espontânea em diferentes regiões, evidenciando sua excelente adaptação (MORAES; MARASCHIN; NABINGER, 1995).

O azevém apresenta raízes curtas (5 a 15 cm), é uma planta cespitosa que pode atingir até 1,20m e forma touceiras de 0,40 m até 1,00 m. As folhas são finas e laminadas e de coloração verde-escura. A inflorescência em forma de espiga é do tipo dística, ereta, com 15 a 20 cm de comprimento, possui espiguetas, nas quais estão inseridas as flores. Cada uma das flores possui duas glumas, uma lema e uma pálea que envolvem a cariopse. As anteras ocorrem em

número de três e são amareladas ou arroxeadas (DERPSCH; CALEGARI, 1992; FONTANELI; SARTORI, 1993; LAMP; FORBES; CADE, 2001; POLOK, 2007).

As sementes do azevém são compactas, de tamanho médio para uma gramínea forrageira. Mil grãos pesam de 2 a 2,5 g nas variedades diploides e 3 a 4,5 g nas tetraploides. As estruturas de revestimento (lema e pálea) são aderidas à cariopse, facilitando a embebição (FONTANELI, 1984).

O azevém é uma espécie de polinização cruzada e normalmente possui autoincompatibilidade do tipo gametofítica, multialélica, o que caracteriza a planta como alógama (FEARON; HAYWARD; LAWRENCE, 1983), mantendo assim, características de alta variabilidade genética (NELSON; PHILLIPS; WATSON, 1997). A quantidade de autopolinização é tão pequena que a emasculação não é necessária para realização de cruzamentos dirigidos (FEARON; HAYWARD; LAWRENCE, 1983). A espécie é considerada como uma planta anual, mas pode se comportar como bianual ou perene de ciclo curto dependendo das condições ambientais (COSGROVE; CASLER; UNDERSANDER, 1999).

O ciclo do azevém naturalizado vai de março a dezembro quando então floresce e morre. A temperatura ótima para o máximo crescimento é próxima de 18 a 20° C. Apresenta pequeno desenvolvimento no inverno, pois as baixas temperaturas paralisam seu crescimento, sendo sensível a geadas muito fortes, apesar das folhas permanecerem verdes (OLIVEIRA; MORAES, 1995).

O azevém desenvolve-se bem em qualquer tipo de solo, sendo os melhores rendimentos obtidos em solos argilosos e ricos em matéria orgânica. É considerada uma gramínea pouco exigente em fertilidade, sendo mais rústica que a aveia e o centeio (DERPSCH; CALEGARI, 1992).

A área total da espécie é estimada em 5,4 milhões de hectares no Brasil (PINTO; LAUS; PAULETTO, 2004). Na Europa, duas espécies de azevém: *L.*

multiflorum e *L. perenne* correspondem a 23% da área de gramíneas cultivadas (52 milhões hectares). Estas duas espécies também têm importância para a agricultura mundial por serem capazes de suprir o vazio forrageiro durante o período de inverno (POLOK, 2007). Ainda na Europa, a produção anual de sementes de azevém excede 45 mil toneladas e movimenta cerca de 160 milhões de euros (LÜBBERSTEDT; SCHEJBEL; BACH, 2003).

2.2 Aspectos gerais do melhoramento genético do azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.)

As atividades de melhoramento genético da espécie no Brasil foram inicialmente desenvolvidas na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul (GIARETTA; JAMARDO; CATALOGNE, 1982), tendo continuidade com a criação da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul (FEPAGRO) (CASTRO et al., 2007), e na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), na época denominada EMPASC (DALL'AGNOL; GOMES; VIDOR, 1995; TCACENCO, 1989, 1995), dentre outras instituições.

O melhoramento desenvolvido pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS) teve início em 1999 com a realização de coletas, avaliações e seleções entre populações locais de plantas para compor o germoplasma. Essa estratégia permitiu, em um curto espaço de tempo, disponibilizar cultivares mais produtivas e melhor adaptadas aos ambientes do sul do Brasil. As sementes coletadas originaram experimentos pioneiros que demonstraram a existência de variabilidade entre essas populações (CASTRO et al., 2003; CORRÊA et al., 2007; DIAS; GOMES; INFELD, 2001; FLORES et al., 2008; MITTELMANN et al., 2004b, 2010).

A partir de 2002, a Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG), Embrapa

Clima Temperado (Pelotas - RS), Embrapa Pecuária Sul (Bagé -RS) e outras instituições colaboradoras, investiram na implantação de banco de germoplasma associado ao programa de melhoramento genético de azevém anual. O banco de germoplasma da Embrapa conta com aproximadamente 200 acessos de azevém anual, a maioria populações locais e algumas cultivares introduzidas (BARBIERI et al., 2005).

Mais recentemente, os programas de melhoramento do azevém visam além do aumento de produtividade, desenvolver cultivares com precocidade, alto vigor inicial, boa capacidade de rebrota, maior proporção de folhas e de matéria seca (FONTANELI; FONTANELI, 2000) e adaptadas a diferentes condições edafoclimáticas (NUNES et al., 2002). Genótipos mais tolerantes ao alumínio, resistentes a diversas doenças (NELSON; PHILLIPS; WATSON, 1997; NUNES et al., 2002), com maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, como as vastas terras de várzea do Rio Grande do Sul, onde predomina a cultura do arroz irrigado em rotação com a pecuária (FREITAS et al., 2003) também são requeridos. Além disso, busca-se uma melhor distribuição da produção de forragem com o alargamento do período de utilização da pastagem para atender aos períodos de maior necessidade e aos diferentes sistemas de produção (CORRÊA et al., 2007; MITTELMANN et al., 2004a).

Diversas cultivares tetraploides foram introduzidas no Brasil, com características agronômicas de interesse, como baixas temperaturas base (MÜLLER et al., 2009) e ciclo longo (MITTELMANN et al., 2004a), mas tem apresentado baixa capacidade de ressemeadura natural. No entanto, quando o interesse é a produção de forragem, a indução de poliploidia pode ser vantajosa (WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003), além de otimizar ainda mais as características agronômicas desta cultura, como a alta digestibilidade e preferência de pastagem devido a uma maior percentagem de açúcares (BARKER et al., 2005; RICHARDSON et al., 2007).

Assim, para que o programa de melhoramento do azevém consiga novos ganhos torna-se necessária a utilização de metodologias de seleção e melhoramento genético mais apuradas, como a seleção com teste de progênies, a realização de cruzamentos entre populações e a geração de genótipos poliploides, buscando o aprimoramento de determinadas características de interesse agrônomo. Uma linha de seleção mais voltada para a região Sudeste, com base em uma visão de futuro que indica o aumento da utilização da espécie em sistemas intensivos de produção, também é contemplada no programa de melhoramento (FONTANELI; FONTANELI, 2000; FREITAS et al., 2003; NUNES et al., 2002).

Outro fator que deve ser levado em consideração é a caracterização do banco de germoplasma, uma vez que a simples coleta e conservação do germoplasma, sem obtenção de informações sobre suas características, torna os bancos de germoplasma simples depósitos de germoplasma (ABADIE; BERRETA, 2001), sendo que os recursos genéticos vegetais desacompanhados de sua caracterização são de pouca utilidade (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1998).

Dessa forma, a disponibilidade de informações qualitativas e quantitativas do germoplasma em estudo poderá auxiliar no sucesso da seleção genotípica. Nesse contexto, o entendimento da estrutura citogenética e modo de reprodução são caracteres importantes. Quando se trata de genótipos conservados em um banco genético, o desafio da manutenção de informações completas e corretas sobre a coleção é maior, pois, além de fornecerem materiais para os melhoristas de plantas, servem de fontes de consulta sobre a diversidade das espécies para atividades de pesquisa e intercâmbios (TECHIO et al., 2008). Além disso, o estudo das progênies resultantes do cruzamento entre os genótipos já pertencentes ao germoplasma poderá indicar novos genótipos que poderão compor o banco de germoplasma.

Para entender a estrutura citogenética do germoplasma pode-se utilizar tanto as técnicas citogenéticas clássicas quanto as moleculares (GUERRA, 2004; GUERRA; SOUZA, 2002) que fornecem informações básicas importantes e refinadas sobre a estrutura e o comportamento do complemento cromossômico.

Assim, uma avaliação mais criteriosa do germoplasma disponível é fundamental para um melhor planejamento e investimento nos programas de melhoramento.

2.3 Características citogenéticas de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.)

Análises por técnicas convencionais realizadas nas espécies de *Lolium* oferecem informações importantes sobre a caracterização citogenética que, na atualidade, servem de subsídio para pesquisas avançadas sobre a organização do genoma obtidas pelas técnicas citogenéticas moleculares, assim como no monitoramento e na obtenção de híbridos intra e interespecíficos.

Os primeiros estudos de citogenética clássica com espécies de *Lolium* reportam-se ao século passado. Informações básicas importantes relacionadas à determinação do número cromossômico, construção dos cariótipos e comportamento meiótico foram apresentadas por diferentes autores, constituindo uma base de dados ampla sobre a estrutura genética e citogenética deste grupo (CARNIDE; ORELLANA, 1986; CARNIDE; ORELLANA; RIBEIRO, 1986; DELAY; PETIT, 1972; DEVESA et al., 1990; EVANS; MACEFIELD, 1974; FARUQI et al., 1987; HOVIN; HILL, 1966; MALIK; THOMAS, 1966).

O gênero *Lolium* é constituído por oito espécies diploides ($2n=2x=14$) e algumas cultivares poliploides obtidas com a utilização de colchicina em programas de melhoramento genético (MEYERS, 1939; POLOK, 2007; WIT,

1958, 1959). As espécies são distribuídas em duas seções estabelecidas de acordo com o modo de reprodução (TERREL, 1968). A primeira seção inclui quatro espécies autógamas (*L. loliaceum*, *L. persicum*, *L. remotum* e *L. temulentum*) e a segunda é composta por três espécies alógamas (*L. perenne*, *L. rigidum* e *L. multiflorum*) (BENNETT; HAYWARD; MARSHALL, 2002; INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2012; JENKIN, 1959; LOOS, 1993). A exceção é *L. canariense*, endêmica das Ilhas Canárias, que apresenta modo de reprodução intermediário (POLOK, 2007).

Malik e Thomas (1966) avaliaram quatro espécies alógamas e três autógamas de *Lolium* quanto às características quantitativas e qualitativas do cariótipo. A comparação da morfologia do cromossomo 1 nos dois grupos mostrou que as espécies autógamas apresentaram constrição secundária distal e nas alógamas, a posição é proximal. Os autores também observaram diferenças entre esses dois grupos quanto ao comprimento relativo e relação de braços cromossômicos, sendo que as autógamas apresentam maior uniformidade do que as alógamas.

Nas primeiras descrições do cariótipo de *L. multiflorum*, cujo genoma é LmLm, foram observados três pares de cromossomos submetacêntricos com constrições secundárias (regiões organizadoras do nucléolo, RONS) localizadas próximas às regiões teloméricas, um grande par metacêntrico e três pares menores submetacêntricos (MALIK; THOMAS, 1966; THOMAS, 1981).

A presença de RONS nos três pares cromossômicos de azevém anual foi confirmada, posteriormente, após FISH (hibridização *in situ* fluorescente) com a sonda de rDNA 45S, mostrando que os seis sítios de rDNA marcados pelas sondas são ativos transcricionalmente (THOMAS et al., 1996).

Carnide e Orellana (1986) e Carnide, Orellana e Ribeiro (1986) observaram seis bandas Ag-NOR intersticiais e demonstraram, por meio de coloração com nitrato de prata, a natureza das constrições secundárias como

organizadores nucleolares funcionalmente ativos. Esses autores também observaram boa correspondência entre o número de constrições secundárias na metáfase mitótica e o número máximo de nucléolos nos núcleos interfásicos de espécies de *Lolium*.

Em estudo realizado por Schifino e Winge (1983) com *L. multiflorum* foi observada a presença de satélite no segundo par cromossômico e o comprimento total do complemento atingiu 27,21 μm .

Mais recentemente, Kopecký et al. (2010) avaliaram a cultivar Prolog de *L. multiflorum* e encontraram três pares cromossômicos metacêntricos e quatro pares submetacêntricos, sendo que três pares possuíam constrição secundária (cromossomos 2, 3 e 7). O comprimento dos cromossomos variou de 3,37 μm para o cromossomo 1 a 5,33 μm para o cromossomo 4, sendo que o comprimento total do lote haploide foi de 30,62 μm .

Em algumas variedades de *L. multiflorum*, *L. perenne* (DELAY; PETIT, 1972; FARUQI et al., 1987), *L. rigidum* (DEVESA et al., 1990; HOVIN; HILL, 1966), *L. persicum*, *L. remotum* e *L. strictum* (HOVIN; HILL, 1966), foi descrita a ocorrência de cromossomos B variando em número de um a oito nos microsporócitos da mesma planta. Também em híbridos provenientes do cruzamento de *L. multiflorum* e *L. perenne* foram constatados dois cromossomos B (EVANS; MACEFIELD, 1974).

Ao analisar citologicamente 37 acessos de *L. multiflorum*, Techio et al. (2010) encontraram apenas um acesso (ETBAZ 055) contendo cromossomos B. Para esse acesso foram observados um a dois cromossomos B em vários estágios da meiose. Os cromossomos B apresentaram um comportamento instável com ascensão precoce na metáfase I ou atrasos na anáfase I, sendo que nos meiócitos que apresentaram um cromossomo B, esses apareceram como univalentes na diacinese e metáfase I e, quando em número de dois, eles formaram bivalentes. Não foi observada nenhuma configuração multivalente,

indicando que não há homologia entre os cromossomos A e B no acesso ETBAZ 055 de *L. multiflorum*. Ao final do processo, os Bs exibiram predominantemente segregação para os núcleos em formação, a fim de garantir a sua propagação. Nos tecidos somáticos analisados (células do tapete da antera e células meristemáticas da raiz) observou-se que os cromossomos B apresentaram um comportamento mais estável. Nas células meristemáticas, observou-se mais de dois cromossomos B, que apresentaram segregação normal.

Com relação aos estudos meióticos, 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. perene* e sete bivalentes para *L. multiflorum*. Nos híbridos entre *L. perene* 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. perene*. O tetraploide desse híbrido, no entanto, geralmente forma bivalentes, quando era esperado o predomínio de tetravalentes (GUERRA, 1988). Esse exemplo, segundo o autor, mostra como a formação de bivalentes pode depender mais de um controle gênico que da semelhança entre homeólogos.

O ano de 1995 foi considerado um marco no estudo do gênero *Lolium*, pois foram publicados os primeiros resultados da aplicação da técnica de hibridização genômica *in situ* no complexo *Lolium-Festuca*, a qual permitiu refinar as análises dos cromossomos e melhorar substancialmente o entendimento da relação genômica entre as espécies (THOMAS et al., 1996).

A facilidade em produzir híbridos intergenéricos entre *Festuca* e *Lolium* e o sucesso comercial das cultivares *Festulolium* estimularam as pesquisas relacionadas à estrutura e comportamento dos genomas envolvidos. Este estudo foi realizado devido ao progresso da citogenética molecular, capaz de identificar

os genomas parentais nos híbridos e seu comportamento, incluindo pareamento meiótico, recombinação, eliminação e identificação de cada cromossomo (KOPECKÝ; LUKASZEWSKY; DOLEZEL, 2008).

Assim, estudos envolvendo técnicas citogenéticas moleculares têm revelado com maior refinamento a relação genômica do complexo *Lolium-Festuca*. Esses estudos são favorecidos devido às peculiaridades genéticas que envolvem estas espécies, tais como a produção de híbridos duplicados férteis, que podem ser cruzados ou retrocruzados, possibilitando a recombinação genômica e a troca de alelos e, as diferenças existentes entre ambas espécies em relação às seqüências repetitivas dispersas, característica que favorece a discriminação dos cromossomos (PASAKINSKIENE; JONES, 2005).

A FISH é uma técnica de citogenética molecular que se baseia na aplicação de sondas que identificam seqüências gênicas específicas em preparações citogenéticas. As regiões mais utilizadas para investigação com a FISH são os sítios de rDNA 5S e 45S, esta última consiste em uma seqüência gênica precursora que codifica os RNAs ribossomais 26S, 18S, e 5,8S. Os sítios de rDNA 45S e 5S são regiões muito conservadas evolutivamente entre os eucariotos, e desta forma, a localização, o número e o tamanho dos sítios têm valor não só na identificação de cromossomos como também na elucidação das relações evolutivas e taxonômicas, sendo que alterações na distribuição cromossômica dos sítios geralmente estão correlacionadas com a especiação (GUERRA; 2004; HESLOP-HARRISON, 2000).

Por meio de hibridização *in situ*, foi construído o mapa físico dos genes de rDNA 18S, 5,8S, 26S e 5S nos cromossomos de sete taxa do gênero *Lolium*, sendo que os taxa ainda eram classificados conforme os métodos mais antigos. Os sítios 18S, 5,8S, 26S foram localizados em dois pares de cromossomos nas espécies autógamas (*L. temulentum*, *L. remotum*, *L. persicum*, *L. rigidum* e *L. rigidum* var. *rottbollioides*). Nas alógamas, seis sítios foram observados em *L.*

multiflorum, sete em *L. perenne* e nove em *L. rigidum* var. *rigidum*. Em todos os taxa, foram identificados dois sítios de rDNA 5S. Nas alógamas, esses sítios estavam localizados nas adjacências dos sítios 18S, 5.8S, 26S do cromossomo 2. Em *L. multiflorum* e *L. perenne*, esse sítio foi mapeado no braço curto do cromossomo 3, que contém no braço longo o sítio 18S, 5.8S, 26S e a constrição secundária, e em *L. rigidum* var. *rigidum* ele foi encontrado em ambas as posições (THOMAS et al., 1996)

Lideikyte et al. (2008) encontraram números variáveis de sinais de rDNA 45S dentro da mesma cultivar de *L. multiflorum*. Uma cultivar diploide apresentou cinco e seis sinais e a outra apenas seis sinais. Já para as três cultivares tetraploides avaliadas a variação foi de 11 a 14 sinais. O número de sinais 5S foi mais estável nas cultivares diploides (dois sinais) do que nas tetraploides (três a cinco sinais).

Ainda em relação aos sítios de rDNA foi observada uma situação interessante durante a construção dos mapas físicos dos cromossomos de *L. perenne* e *L. multiflorum*. Em uma frequência superior à esperada, foram observados mais de 14 cromossomos na maioria das células de *L. perenne* L. cultivar Player por meio de preparações de rotina. Quando foi utilizada a técnica de FISH para os sítios de rDNA 45S, algumas células apresentaram mais de sete sinais. 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 os cromossomos detentores das sequências rDNA 45S de forma aleatória (HUANG et al., 2008).

Estudos mais detalhados em microscopia de força atômica mostraram que nos locais das falhas/quebras podem ou não aparecer filamentos finos de DNA entre as partes separadas (HUANG et al., 2009). Cada fragmento formado pela falha ou aparente quebra 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 duas, três, quatro, cinco ou seis quebras no sítio de rDNA 45s resultariam em contagens de células com o número de cromossomos variando em 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* que confirmaram que as quebras ocorrem exclusivamente na região rDNA 45S dos cromossomos. Dessa forma, os autores concluíram que a alta frequência de lesões cromossômicas nessas espécies é o resultado da expressão de sítios frágeis de rDNA 45S, semelhante ao que ocorre em cromossomos humanos.

Contudo, é pouco provável que alterações na sequência gênica, uma das causas da expressão dos sítios frágeis 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 existam 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. (HUANG et al., 2008). 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).

A natureza frágil desses sítios já havia sido mencionada em um estudo com oito genótipos de *L. rigidum* realizado por Thomas, Harper e Morgan (2001). Os autores observaram, por meio da FISH, diferenças nas posições (um cromossomo em três metáfases de um mesmo genótipo apresentou dois sinais) e número (variando de seis a nove) de rDNA 45S entre os genótipos avaliados. Na meiose de um genótipo foram observados quadrivalentes na metáfase I, sendo que os demais genótipos apresentaram meiose regular com o pareamento de sete bivalentes. Dessa forma, os autores sugeriram que os locais correspondentes ao

rDNA devem estar envolvidos na quebra e religamento cromossômicos por meio de inversões pericêntricas e paracêntricas e translocações recíprocas, que resultariam em rearranjos cromossômicos e causariam a variação do rDNA em número e tamanho, ao invés de um movimento isolado do sítio de rDNA.

Anteriormente, Morgan et al. (2000), ao avaliarem duas plantas de *L. multiflorum* regeneradas por cultura de tecidos, descreveram uma situação similar as já relatadas para os sítios frágeis. Os autores observaram em uma das plantas que o centrômero foi dividido ao meio, resultando em $2n=13+2$ telocêntricos. As extremidades dos dois cromossomos telocêntricos pareciam estar associadas em algumas células mitóticas. Os autores sugeriram que os dois cromossomos telocêntricos originaram-se de uma fissão cêntrica. Ao utilizar sequências repetitivas teloméricas (TTTAGGG), os autores observaram a presença dessas sequências nas extremidades dos dois cromossomos telocêntricos, sugerindo que esses telômeros foram gerados após a fissão cêntrica. Quanto ao comportamento meiótico, em mais de metade das células observadas na anáfase I, a segregação foi balanceada com seis cromossomos padrão e dois telocêntricos segregando para um polo da célula e sete cromossomos segregando para o polo oposto. Na outra metade dos casos os dois telocêntricos orientaram-se para os polos opostos e o centrômero do cromossomo padrão não apresentou orientação.

Variação interespecífica e intraespecífica no número e localização de locos de rDNA 4S e 5S foram relatadas para cultivares de *F. pratensis* Huds. e *L. perenne*, indicando que variações intracromossômicas podem ter ocorrido durante a especiação de ambas (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010). A variabilidade de sinais de rDNA 5S é mais difícil de ser explicada e sua regulação parece ser dependente de um mecanismo ainda desconhecido. Uma das possíveis hipóteses é que o rDNA 5S é frequentemente localizado na heterocromatina pericentromérica que é tipicamente rica em elementos

transponíveis, assim, um rearranjo mediado por transposons deve contribuir para a perda ou transposição de sequências de rDNA. Já a variação interespecífica no número de locos de rDNA 45S 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).

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* (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010).

Devido a variabilidade já relatada no número e localização dos sítios de rDNA, seu uso em estudos evolutivos deve ser limitado. É importante também questionar se a variação observada é intraespecífica ou se é um artefato do protocolo da FISH, uma vez que podem ocorrer falhas da técnica para detectar sinais fracos de hibridização (KOPECKÝ; LUKASZEWSKY; DOLEZEL, 2008).

Apesar das técnicas de hibridização *in situ* para rDNA 5S e 45S estarem bem estabelecidas para o híbrido *Festulolium* e algumas espécies do gênero *Lolium* cultivadas em outros países, não existem estudos que utilizem essa técnica para caracterizar genótipos de *L. multiflorum* cultivados no Brasil ou para uma melhor compreensão do comportamento genético e observação da

existência de polimorfismos na organização e estrutura cromossômica desses genótipos em comparação com outros genótipos relatados na literatura. Tais estudos se relacionam diretamente à descrição e à discriminação de genótipos importantes, possibilitando a detecção de similaridades e dissimilaridades genéticas dos materiais disponíveis, podendo assim, ter um papel fundamental na evolução do gênero.

2.4 Estudos polínicos

O grão de pólen é objeto de estudo de diferentes áreas como a botânica, sistemática, taxonomia, melhoramento genético, filogenia, geologia, medicina e farmácia. As primeiras observações polínicas iniciaram com o desenvolvimento do microscópio no século XVII. Com o progresso e desenvolvimento destes aparelhos, observou-se que a morfologia do grão de pólen é constante dentro de uma espécie ou um grupo de espécies (DAJOZ; TILL-BOT; GOUYON, 1991; SALGADO-LABOURIAU, 1961).

Existem nos grãos de pólen quatro características nas quais residem os fundamentos do estudo polínico: sua grande resistência à degradação, o que facilita a fossilização; seu pequeno tamanho, que facilita a dispersão e depósito em partículas sedimentares; sua complexidade morfológica, que permite sua caracterização; e a produção em grande número, o que favorece levantamentos estatísticos confiáveis (MIRANDA; ANDRADE, 1990).

Os grãos de pólen podem diferir quanto ao tamanho, forma, número de aberturas e arranjo das aberturas através das quais o tubo polínico cresce quando ocorre germinação. Grande parte das famílias de Angiospermas, muitos gêneros e algumas espécies podem ser identificadas apenas por estas características do grão de pólen, além da ornamentação da exina (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Para efeito de cruzamento, há necessidade de avaliar a viabilidade polínica, seja dos grãos de pólen recém liberados da antera ou armazenados por curtos ou longos períodos. Fatores externos, como temperatura, umidade relativa do ar, percentagem de gás carbônico na atmosfera, afetam a viabilidade polínica, principalmente daqueles estocados por longos períodos (PAGLIARINI; POZZOBON, 2006).

A análise da viabilidade polínica pode ser realizada por meio de metodologias *in vivo* ou *in vitro*. A análise *in vitro* mais conhecida é a germinação em meio de cultura enquanto que as análises *in vivo* podem ser realizadas por meio de coloração e de germinação. A coloração é um método simples, barato e fornece resultados rapidamente, tornando-se atrativo para estudos polínicos (NINOV; TECHIO; GAUER, 2004).

Em um teste realizado com um meio de cultura específico observou-se que a taxa de germinação do pólen variou de 69 a 83% para *L. perenne*, *L. multiflorum* e *F. pratensis* (WANG et al., 2004). Ao avaliar a cultivar Waseoba de azevém anual, observou-se que a taxa de viabilidade polínica, utilizando o corante carmim acético 1%, foi de 94,6 e 98,6% em polens coletados em casa de vegetação a 15,7 e 20,8°C, respectivamente, e de 96% em condições de campo a 16,5°C (KIYOSHI et al., 2012).

No entanto, não há relatos sobre a caracterização morfológica e viabilidade para genótipos de *L. multiflorum* naturalizados no Brasil, cultivares introduzidas ou populações de melhoramento, diploides e poliploides. A caracterização de grãos de pólen é um passo importante para os programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos, a fim de complementar estudos básicos de dados biológicos que caracterizam os genótipos. Além disso, os dados de viabilidade polínica podem ser correlacionados com anormalidades meióticas, podendo auxiliar na seleção de genótipos, sendo assim, uma

ferramenta adicional em pesquisas biotecnológicas e agrárias (NINOV; TECHIO; GAUER, 2004).

REFERÊNCIAS

- ABADIE, T.; BERRETA, A. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. In: BERRETA, A.; RIVAS, M. (Ed.). **Estrategia em recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur**. Montevideo: IICA-PROCISUR, 2001. Disponível em: <http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docencia/materiales%20apoyo/Caracterizacion_y_Evaluacion_de_Recursos_Fitogeneticos.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2012.
- ARAÚJO, A. A. **FORAGEIRAS PARA CEIFA**: capineiras, fenação e ensilagem. Porto Alegre: Sulin, 1978. 196 p.
- BARBIERI, R. L. et al. **Conservação ex-situ de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2005. 27 p. (EMBRAPA Clima Temperado. Documentos, 143).
- BARKER, W. R. et al. **Census of South Australian vascular plants**. Adelaide: Botanic Gardens of Adelaide & State Herbarium, 2005. 382 p.
- 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.
- 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*: 1., *Lolium multiflorum*, *Festuca arundinacea* and *Lolium-Festuca* Hybrids. **Heredity**, Cary, v. 56, n. 3, p. 311-317, June 1986.
- CARVALHO, P. C. de F. Manejando pastagens para ovinos. In: PEREIRA NETO, O. A. (Ed.). **Práticas em ovinocultura**: ferramentas para o sucesso. Porto Alegre: SENAR-RS, 2004. p. 15-28.
- CASTRO, C. M. et al. Morphological and molecular characterization of Italian ryegrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 4, p. 245- 254, 2003.

CASTRO, R. L. et al. Nova cultivar de azevém FEPAGRO São Gabriel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., 2007, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2007. 1 CD-ROM.

CORRÊA, B. O. et al. Caracteres agrônômicos 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.

DAJOZ, I.; TILL-BOT, T. I.; GOUYON, P. H. Evolution of pollen morphology. **Science**, New York, v. 253, n. 5015, p. 66-68, July 1991.

DALL'AGNOL, M.; GOMES, K. E.; VIDOR, M. A. Competição de cultivares de azevém anual. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 26., 1989, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1989. 1 CD-ROM.

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

DERPSCH, R.; CALEGARI, A. **Plantas para adubação verde de inverno**. Londrina: IAPAR, 1992. 80 p. (Circular, 73).

DEVESA, J. A. et al. Contribución al conocimiento cariológico de las Poaceae en Extremadura II. **Boletim da Sociedade Broteriana**, Coimbra, v. 63, p. 153-205, 1990.

DIAS, J. C. A.; GOMES, J. F.; INFELD, J. A. **Avaliação de genótipos de azevém anual em solos hidromórficos**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2001. 2 p. (EMBRAPA Clima Temperado. Comunicado Técnico, 42).

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, G. M.; MACEFIELD, A. J. The effect of B chromosomes on homoeologous pairing in species hybrids: II., *Lolium multiflorum* x *Lolium perenne*. **Chromosoma**, Berlin, v. 45, p. 369-378, 1974.

FARUQI, S. A. et al. Studies in Libyan grasses: chromosome number and some interesting features. **Annals of Botany**, London, v. 45, n. 1, p. 75-102, Apr. 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.

FLORES, R. A. et al. Produção de forragem de populações de azevém anual no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, n. 7, p. 1168-1175, jul. 2008.

FONTANELI, P. R. S. Azevém anual. In: ENCONTRO DE INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA DO PLANALTO MÉDIO RIO-GRANDENSE, 1., 1984, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 1984. p. 139-150.

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.

FONTANELI, R. S.; SARTORI, J. F. (Ed.). **Estabelecimento, utilização e manejo de plantas forrageiras**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 1993. 139 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome, 1998. 510 p.

FREITAS, F. A. et al. Análise multivariada de populações de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) em diferentes regimes de água. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 1, p. 17-23, 2003.

GIARETTA, H.; JAMARDO, A.; CATALOGNE, E. V. A. Sementes nocivas que ocorreram em amostras de sementes de azevém (*Lolium multiflorum*), analisadas no Rio Grande do Sul nos anos de 1978 e 1979. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ERVAS DANINHAS, 14.; CONGRESSO LATINO AMERICANO MALEZAS, 6., 1982, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 1982. 1 CD-ROM.

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

_____. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

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

HAYASAKI, M.; MORIKAWA, T.; LEGGET, J. M. Intraspecific 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.

HOVIN, A. W.; HILL, H. B. Chromosomes, their origin and relation to meiosis in interspecific *Lolium* hybrids. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 53, p. 702-708, 1966.

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.

_____. 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.

HUMPHREYS, M. W.; PASAKINSKIENE, I. Chromosome painting to locate genes for drought resistance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. **Heredity**, Cary, v. 77, p. 530-534, 1996.

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

JAUHAR, P. P. 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.

KIYOSHI, T. et al. Exceptionally high fertility observed in three F1 hybrids between *Lolium multiflorum* Lam. and *L. temulentum* L. **Japanese Society of Grassland Science**, Grassland, v. 58, n. 2, p. 66-72, 2012.

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

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

KOPECKÝ, D.; LUKASZEWSKY, A. J.; DOLEZEL, J. Cytogenetics of Festulolium (*Festuca* x *Lolium* hybrids). **Cytogenetics and Plant Breeding**, Würzburg, v. 120, n. 3/4, p. 370-383, May 2008.

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

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, v. 95, 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, 1993.

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.

MEYERS, W. M. Colchicine induced tetraploidy in perennial ryegrass. **Journal**

of **Heredity**, New York, v. 30, p. 499-504, 1939.

MIRANDA, M. M. B.; ANDRADE, T. A. P. **Fundamentos de palinologia**. Fortaleza: UFC, 1990. 99 p.

MITTELMANN, A. et al. **Avaliação de populações de azevém quanto à produção de forragem**. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite; Bagé: EMBRAPA Pecuária Sul, 2004a. 12 p. (Boletim de Pesquisa, 15).

_____. Caracterização agronômica de populações locais de azevém na Região Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 12, p. 2527-2533, dez. 2010.

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

MORAES, A.; MARASCHIN, G. E.; NABINGER, C. Pastagens nos ecossistemas de clima subtropical: pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32.; SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSISTEMAS BRASILEIROS: PESQUISAS PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 1., 1995, Brasília. **Anais...** Brasília: SBZ, 1995. p. 147-200.

MORGAN, W. G. et al. The cytogenetic of a Robertsonian rearrangements in *Lolium multiflorum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 173-177, 2000.

MÜLLER, L. et al. Temperatura base inferior e estacionalidade de produção de genótipos diploides e tetraploides de azevém. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1343-1348, ago. 2009.

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

NELSON, L. R.; PHILLIPS, T. D.; WATSON, C. E. Plant breeding for improved production in annual ryegrass. In: ROUQUETTE, F. M.; NELSON, L. R. (Ed.). **Ecology, production, and management of *Lolium* for forage in the USA**. Madison: Crop Science Society of America, 1997. p. 1-14.

NINOV, K.; TECHIO, V. H.; GAUER, E. Viabilidade de pólen em espécies de passiflora. **Acta Ambiental Catarinense**, Chapecó, v. 3, p. 7-12, 2004.

NUNES, C. D. M. et al. Ocorrência de brusone em azevém. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 803, 2002. Resumo. Suplemento.

OLIVEIRA, J. C. P.; DUTRA, G. M.; MORAES, C. O. C. **Alternativas forrageiras para sistemas de produção pecuária**. Bagé: EMBRAPA Pecuária Sul, 2001. 33 p. (Documentos, 29).

OLIVEIRA, J. C. P.; MORAES, C. O. C. **Cadeias forrageiras regionais**. Porto Alegre: Caramuru, 1995. 203 p.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBOM, M. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: PENALOZA, A. del P. de S. (Ed.). **Curso de citogenética aplicada e recursos genéticos vegetais, II**. Brasília: EMBRAPA, 2006. v. 1, p. 24-41.

PASAKINSKIENE, I. et al. New molecular evidence on genome relationships and chromosome identification in fescue (*Festuca*) and ryegrass (*Lolium*). **Heredity**, Cary, v. 81, p. 659-665, 1998.

PASAKINSKIENE, I.; JONES, N. A decade of "chromosome painting" in *Lolium* and *Festuca*. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 109, n. 1/3, p. 393-399, 2005.

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.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

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.

SALGADO-LABOURIAU, M. L. Palinologia: fundamentos, técnicas e algumas perspectivas. **Revista Brasileira de Geografia**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 695-717, 1961.

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

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

TCACENCO, F. A. Comparação de cultivares de azevém anual em Lages, estado de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 157-163, fev. 1989.

_____. Desempenho de cultivares de *Lolium multiflorum* Lam. em Lages, Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 119-123, 1995.

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.

_____. Número cromossômico em acessos de *Pennisetum*. **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 291-294, 2008.

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

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

THOMAS, H. M. et al. Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence *in situ* hybridization. **Chromosome Research**, Oxford, v. 4, n.

7, p. 486-490, Nov. 1996.

THOMAS, H. M.; 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.

WANG, Z. Y. et al. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinaceae*) (Poaceae) plants. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 4, p. 523-530, Apr. 2004.

WHEELER, D. J. B.; JACOBS, S. W. L.; WHALLEY, R. D. B. **Grasses of New South Wales**. Armidale: University of New England Printery, 2002. 450 p.

WIT, F. Chromosome doubling and the improvement of grasses. **Genetica Agraria**, Rome, v. 9, p. 97-115, 1959.

_____. Tetraploid Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Euphytica**, Wageningen, v. 4, p. 245-253, 1958.

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.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Sítios frágeis e atividade transcricional das regiões de rDNA em *Lolium multiflorum* Lam.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição, número e localização dos sítios de rDNA em cromossomos e relatar a atividade transcricional desses sítios em sete genótipos de azevém anual (*L. multiflorum* Lam.) (diploides e poliploides) e uma progênie resultante do cruzamento entre esses. Os nucléolos e as regiões organizadoras do nucléolo foram marcados com nitrato de prata. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com a utilização das sondas de rDNA 5S e 45S, sendo que algumas hibridizações foram feitas em lâminas previamente submetidas ao bandejamento Ag-NOR. Não há variabilidade nos sítios de rDNA 5S, mas existe uma ampla variabilidade nos sítios de rDNA 45S, inclusive com a presença de mais de um sítio em um mesmo cromossomo. Em um dos genótipos foi observado um número maior de sinais 45S que o esperado. Aproximadamente 93% das metáfases analisadas apresentam pelo menos uma quebra/lesão no sítio de rDNA 45S, sendo que cada quebra resulta na formação de fragmentos. Assim, esse sítio corresponde a uma região de fragilidade cromossômica em *L. multiflorum*. Esses eventos podem ter implicações na organização do genoma, pois podem resultar em novos rearranjos cromossômicos, que juntamente com outros eventos, são responsáveis por mudanças genômicas microevolutivas envolvidas com os processos de diferenciação e especiação. Nem todos os sítios de rDNA 45S são ativos transcricionalmente, sendo que mecanismos epigenéticos podem estar relacionados com o silenciamento de genes ribossomais. Variação no número e tamanho de nucléolos, além de mecanismos de fusão nucleolar, são observados nos genótipos de *L. multiflorum* avaliados.

Palavras-chave: rDNA. Rearranjos cromossômicos. RONS. Sítios frágeis. Transposons. Evolução cromossômica.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the number, distribution and location of rDNA sites on chromosomes and describe the transcriptional activity of these sites in seven genotypes (diploid and polyploid) of Italian ryegrass (*L. multiflorum* Lam) and in one progeny from a cross between two of them. The nucleolus and the nucleolus organizing regions were characterized by silver staining. Ribosomal DNAs 5S and 45S were localized by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). Sequential hybridization was performed on the same chromosome preparations after silver staining. The 5S rDNA site is highly conserved, while for 45S rDNA there is a high variation within genotypes. Some genotypes showed two sites of 45S rDNA on the same chromosome and one of them showed a larger number of 45S signals than the expected one. Approximately 93% of metaphases analyzed have at least one breakage/gap at the site of 45S rDNA, resulting in the formation of fragments. Thus, the site of 45S rDNA corresponds to a region of chromosomal fragility in *L. multiflorum*. This phenomenon may have implications for genome organization, since it can result in new chromosomal rearrangements. Along with other events, these rearrangements are responsible for microevolutionary genomic changes involved in the processes of differentiation and speciation. Some sites of 45S rDNA are not transcriptionally active and epigenetic mechanisms may be related to ribosomal gene silencing. Variation in the number and size of nucleoli and nucleolar fusion are observed in *L. multiflorum*.

Keywords: Chromosomal evolution. Chromosomal rearrangements. Fragile sites. NORs. rDNA. Transposons.

1 INTRODUÇÃO

Os sítios de DNAs ribossomais (rDNAs) representam cerca de 10% do genoma de plantas e são tradicionalmente empregados como marcadores citogenéticos importantes em estudos filogenéticos e taxonômicos, pois constituem unidades repetitivas altamente conservadas, cuja posição e distribuição nos cromossomos tem sido usadas para correlacionar com a especiação e com a definição de tendências evolutivas em grupos vegetais (CASTILHO; HESLOP-HARRISON, 1995; HESLOP-HARRISON, 2000; HUGHES; HAWLEY, 2009).

Os genes de rDNA 5S ocorrem como repetições em tandem e estão localizados em um ou mais sítios por conjunto cromossômico. Já o rDNA 45S corresponde a centenas ou milhares de cópias, em tandem, dos genes de rRNA 18S, 5.8S e 26S, separados por espaçadores intergênicos não transcritos. No entanto, apenas poucos genes de rDNA 45S são transcricionalmente ativos (CONCONI et al., 1989; HESLOP-HARRISON, 2000).

Estudos em várias espécies, tais como em *Allium* (SCHUBERT; WOBUS, 1985), *Triticeae* (ALTINKUT et al., 2006; DUBCOVSKY; DVORAK, 1995), *Nemesia* (DATSON; MURRAY, 2006), *Crotalaria* (MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2012), *Passiflora* (CUCO et al., 2005), *Aegilops* (RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b) e arroz (SHISHIDO; SANO; FUKUI, 2000) tem demonstrado a variabilidade no número e posição dos sítios de rDNA 45S.

Recentemente, variações intraespecíficas para a posição e número desses sítios vem sendo vastamente descritas em *Lolium* (HUANG et al., 2008, 2009; KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010; LIDEIKYTE et al., 2008; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). Em cultivares de *L. perenne* L., por exemplo, a variação intraespecífica no número e localização de locos de rDNA

45S e 5S indicam que variações intracromossômicas podem ter ocorrido durante sua especiação (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010). Já a análise de espaçadores intergênicos e regiões transcritas de *Sinapis alba* L. em sete taxa de *Lolium*, permitiu prever que o rDNA das espécies autógamas é mais homogêneo do que o das espécies alógamas, uma clara diferença na variação ribossômica entre espécies autógamas e alógamas de *Lolium* (WARPEHA; GILLILAND; CAPESIUS, 1998).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos no processo de variação no número e posição do rDNA 45S, tais como: diferentes rearranjos cromossômicos (deleções, duplicações, translocações e inversões), permuta genética desigual e conversão e transposição gênica (mobilidade gênica) (DUBCOVSKY; DVORAK, 1995; SCHUBERT; WOBUS, 1985; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). No entanto, não há evidências claras de quais mecanismos podem estar envolvidos na variação dos locos de rDNA 45S em *L. multiflorum* Lam.

A variabilidade no número e posição dos blocos de rDNA 45S observadas em *Lolium* pode ter implicações na organização do genoma, pois pode resultar em novos rearranjos cromossômicos, uma vez que novas espécies podem surgir por meio desses rearranjos, motivo pelo qual a variabilidade relatada para esse gênero no sítio de rDNA deve ser investigada mais detalhadamente.

Dentre as espécies do gênero *Lolium*, o azevém anual (*L. multiflorum*) apresenta genoma LmLm e $2n=2x=14$ cromossomos, sendo três pares cromossômicos metacêntricos e quatro submetacêntricos. O comprimento total do lote haploide da espécie mede 30,62 μm (KOPECKY et al., 2010), apresenta meiose regular, formando predominantemente, bivalentes em anel (KLEIJER, 1984) e já foi relatada a ocorrência de cromossomo B (TECHIO et al., 2010).

Estudos com genótipos cultivados em outros países mostraram que

cultivares diploides de *L. multiflorum* apresentam três pares cromossômicos com constrições secundárias localizadas próximas às regiões teloméricas, e essas são correspondentes ao número de RONS (Regiões Organizadoras do Nucléolo) e de sítios de rDNA 45S visualizadas na metáfase (CARNIDE; ORELLANA; RIBEIRO, 1986; MALIK; THOMAS, 1966; THOMAS, 1981; THOMAS et al., 1996). Em *L. perenne*, sinais fortes específicos corados com Ag-NOR e co-localizados nas regiões de quebras/lesões de sítios de rDNA descondensados foram observados. Contrariamente, as regiões intactas dos sítios de rDNA 45S não apresentaram sinais ou esses eram muito fracos (HUANG et al., 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a distribuição, número e localização dos sítios de rDNA em cromossomos de genótipos de *L. multiflorum* (diploides e poliploides) e relatar a atividade transcricional desses sítios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

As avaliações foram feitas em sete genótipos de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) e uma progênie resultante do cruzamento entre esses (Tabela 1). Os genótipos são oriundos do Banco Ativo de Germoplasma do Azevém e do programa de melhoramento genético do azevém conduzido pela Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado, Juiz de Fora-MG/Pelotas-RS. A progênie foi obtida pela técnica *chance hybrids*, em que alguns parentais são mantidos lado a lado em casa de vegetação, sem emasculação, procurando-se sincronizar o florescimento realizando cortes no material mais precoce.

Tabela 1 Genótipos, origem e ploidia esperada em *L. multiflorum*.

Genótipos	Origem	Ploidia Esperada
Comum - planta 2 (parental masculino)	População Local	2x
Comum - planta 14 (parental masculino)	População Local	2x
Comum - planta 19 (parental masculino)	População Local	2x
Comum - planta 32 (parental masculino)	População Local	2x
Barjumbo - planta 2 (parental feminino)	Cultivar Introduzida	4x
Barjumbo - planta 11 (parental feminino)	Cultivar Introduzida	4x
Barjumbo - planta 33 (parental feminino)	Cultivar Introduzida	4x
ABARP - planta 14 (progênie)	Barjumbo x Comum	3x

2.2 Obtenção de metáfases mitóticas

As sementes de *L. multiflorum* 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). Posteriormente, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato Plantmax® e terra vegetal (3:2) e mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 40 dias, quando então, foram transferidas para frascos plásticos contendo água para obtenção de raízes em quantidade e tamanhos adequados para extração dos meristemas. As raízes obtidas foram coletadas e tratadas em água gelada por 24 horas (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010). Posteriormente, as raízes foram fixadas em Carnoy (álcool etílico absoluto:ácido acético glacial, 3:1) e mantidas a -4°C. As lâminas foram preparadas pelo método de secagem a chama (DONG et al., 2000) após maceração enzimática em pectinase-celulase (100U:200U), por 2h10min., a 37°C, em câmara úmida.

2.3 Bandeamento Ag-NOR

A metodologia utilizada para marcação dos nucléolos e das RONS com nitrato de prata foi baseada em Guerra e Sousa (2002) e Huang et al. (2012).

Sobre a preparação cromossômica foi colocada uma tela de nylon, na qual foi adicionada 1 gota de solução coloidal (gelatina incolor 2%, ácido fórmico 2%) e 2 gotas de solução de nitrato de prata 50% previamente filtradas. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 72°C, de 2 a 7 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e desidratadas em série alcoólica (70%, 90% e 100%) por 5 min. As lâminas foram observadas em

microscópio de campo claro (Zeiss). As marcações dos nucléolos e das RONS foram avaliadas em 150 células interfásicas e, em pelo menos, cinco metáfases de cada genótipo, sendo as imagens capturadas.

2.4 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

Para a FISH, foram usadas como sondas as sequências de rDNA 45S (pTa 71 de *Triticum aestivum* L.) e 5S [D2 de *Lotus japonicus* Regel, fragmento com aproximadamente 400pb (PEDROSA et al., 2002)]. As sondas 5S e 45S foram marcadas, respectivamente, com digoxigenina e biotina, 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 min. em TNT e uma lavagem de 5 min. em PBS 1x a temperatura ambiente e 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 bandeamento Ag-NOR. Nesse caso, após o bandeamento, foram feitas as lavagens em SSC 2x e na série alcoólica 70, 90 e 100% por 5 min. e então, procedeu-se com a hibridização como descrito anteriormente.

2.5 Caracterização de lesões e quebras cromossômicas

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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliações preliminares em metáfases mitóticas com coloração convencional e com DAPI demonstraram variação no número cromossômico para todos os genótipos de *L. multiflorum* avaliados (Tabela 2 e Figura 1). Esses resultados divergiram da descrição cromossômica apresentada para a espécie por Darlington e Wylie (1958) e Jenkin e Thomas (1938), que relataram, por meio de análises em coloração convencional, $2n=14$ cromossomos para os diploides e, conseqüentemente, 28 e 21 cromossomos para os genótipos tetraploide e triploide, respectivamente. Posteriormente, constatou-se que esse número aparentemente excedente de cromossomos nos genótipos analisados é decorrente da formação de fragmentos devido à quebras cromossômicas (Tabela 2 e Figura 1), já relatadas por Huang et al. (2008) em *L. perenne*.

Tabela 2 Número cromossômico (NC) e número de fragmentos (f), número de sítios de rDNA 45S (número de metáfases), número de quebras nos sítios de rDNA 45S (NQ), número de lesões nos sítios de rDNA 45S (NL) e número de sítios de rDNA 5S de genótipos de *L. multiflorum*.

Genótipos	NC+f	45S	NQ	NL	5S
Comum - planta 2 (2x)	14+2f a 14+4f	10 a 13 (6)	2 a 4	0 a 2	2
Comum - planta 14 (2x)	14+2f a 14+5f	8 a 13 (7)	2 a 5	0 a 3	2
Comum - planta 19 (2x)	14 a 14+4f	6 a 10 (12)	0 a 4	0 a 2	2
Comum - planta 32 (2x)	14+1f a 14+5f	7 a 13 (14)	1 a 5	0 a 3	2
Média		9,46	2,49	0,77	2
Barjumbo - planta 2 (4x)	28+3f a 28+6f	9 a 17 (12)	3 a 6	0 a 1	4
Barjumbo - planta 11 (4x)	28+4f a 28+8f	15 a 19 (4)	4 a 8	0 a 1	4
Barjumbo - planta 33 (4x)	28+1f a 28+9f	17 a 21 (2)	1 a 9	0 a 7	4
Média		15,17	4,88	0,83	4
ABARP - planta 15 (3x)	21+2f a 21+4f	11 a 13 (4)	2 a 4	0 a 2	3
Média		12,25	2,75	0,5	3

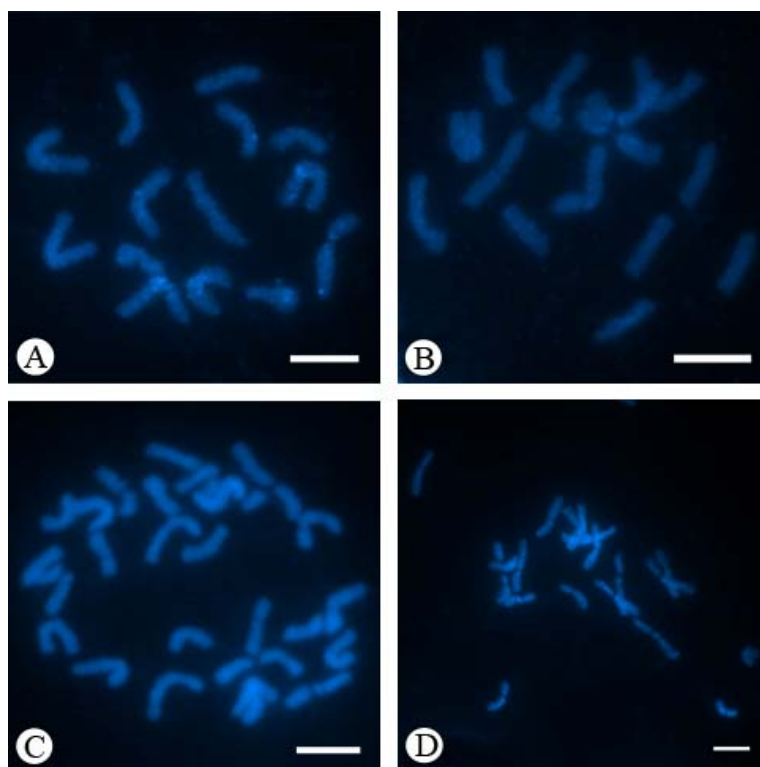


Figura 1 Variação no número cromossômico e número de fragmentos (f) em metáfases mitóticas observadas com DAPI em genótipos de *L. multiflorum* (A) Comum - planta 19 (diploide): 14 cromossomos (B) Comum - planta 19 (diploide): 14+3f cromossomos (C) Barjumbo - planta 2 (tetraploide): 28+4f cromossomos (D) ABARP - planta 15 (triploide): 21+2f cromossomos (barra: 5 μ m).

Ao avaliar as metáfases com a FISH usando a sonda de rDNA 45S foi possível confirmar a que a formação desses fragmentos em número variável é devido a quebras e/ou lesões nos sítios de rDNA 45S em vários cromossomos (Figura 2). Esses fragmentos, especialmente nas metáfases observadas com DAPI, foram quantificados, de forma equivocada, como cromossomos

verdadeiros, fornecendo a variação numérica relatada (Tabela 2 e Figura 1). Dessa forma, uma quebra, e em alguns casos uma lesão, resultou na quantificação de um fragmento, e assim sucessivamente. Assim, para os genótipos avaliados observa-se que o sítio de rDNA 45S corresponde a uma região de fragilidade cromossômica, suscetível à quebras e geração de fragmentos cromossômicos, como já descrito por Huang et al. (2008) em genótipos de *L. perenne* e *L. multiflorum* cultivados em outros países.

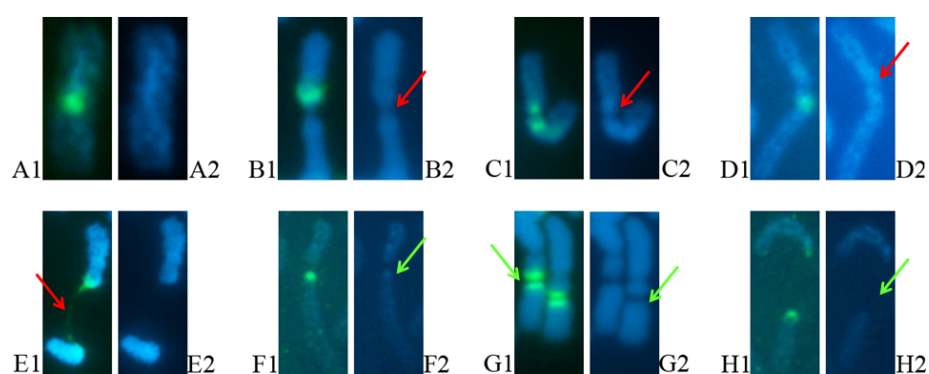


Figura 2 Características dos sítios de rDNA 45S (verde) em cromossomos de *L. multiflorum* evidenciadas por FISH e DAPI, respectivamente. (A1 e A2) Cromossomo intacto com um sinal (B1 e B2) Cromossomo com lesão e um sinal do sítio 45S (C1 e C2) Cromossomo com lesão e dois sinais com mesma intensidade de fluorescência (D1 e D2) Cromossomo com lesão e dois sinais com intensidades diferentes (E1 e E2) Filamento de cromatina no local da lesão unindo o cromossomo e o fragmento (F1 e F2) Cromossomo com quebra e um sinal do 45S (G1 e G2) Cromossomos com quebra e dois sinais com mesma intensidade (H1 e H2) Cromossomo com quebra e dois sinais com intensidades diferentes. As setas vermelhas representam as lesões e as setas verdes representam as quebras.

Huang et al. (2008), ao estudarem plantas de *L. perenne* cultivadas *in vitro* observaram células com 14 a 20 cromossomos por meio de preparações de rotina. Da mesma forma como observado nos genótipos obtidos naturalmente avaliados no presente estudo, ao utilizar sondas de rDNA 45S, os autores verificaram que esses cromossomos aparentemente adicionais eram fragmentos resultantes de quebras cromossômicas ou falhas de formação *in vitro* (lesões cromossômicas) nos locais correspondentes aos sítios de rDNA 45S. Como a unidade repetitiva de rDNA 45S é uma sequência muito conservada entre diferentes plantas, e lesões cromossômicas nessa região ainda não foram relatadas para outras plantas.

Huang et al. (2008) sugeriram que a sequência da unidade repetitiva de rDNA 45S não seja a principal causa da fragilidade, mas que é possível que o número de cópias de unidades repetitivas de rDNA 45S ou mesmo os espaços intergênicos entre essas unidades repetitivas estejam associados com a expressão de sítios frágeis de rDNA 45S em *Lolium* spp., pois o número de unidades repetitivas e os espaços intergênicos entre essas unidades repetitivas são variáveis entre as espécies.

As características e a variabilidade no número de sítios de rDNA 45S estão demonstradas na Tabela 2 e Figura 2. Esses sítios foram observados em três situações: em cromossomos intactos (Figura 2A), em cromossomos com lesão (Figuras 2B-E) e em cromossomos com quebras (Figuras 2F-H).

Os cromossomos intactos apresentaram apenas um sinal de rDNA 45S proximal (Figura 2A). Nos cromossomos que apresentaram lesões, os sinais ocorreram em número de um (em um dos lados da lesão) (Figura 2B) ou dois (nos dois lados da lesão) (Figuras 2C-D), podendo ocorrer variação quanto ao tamanho e a intensidade de fluorescência entre os sinais (Figura 2D). Em alguns casos, uma fina fibra de cromatina ligava o fragmento lesionado ao cromossomo (Figura 2E). Nos cromossomos que apresentaram quebras, os sinais foram

observados nas extremidades do fragmento ou do cromossomo ou em ambos (Figuras 2F-H). Assim como nas lesões, os sinais observados nos locais de quebra ocorreram em número de um (em um dos lados da quebra) (Figura 2F) ou dois (nos dois lados da quebra) (Figuras 2G-H), podendo o tamanho e a intensidade de fluorescência variar entre os dois sinais (Figura 2H).

Tanto nos cromossomos intactos (Figura 3C), com lesões (Figuras 3B e D) ou quebras (Figura 3A), quando haviam dois sinais no mesmo cromossomo, esses estavam localizados em braços cromossômicos diferentes, podendo apresentar intensidade de sinais e tamanho iguais ou diferentes.

Huang et al. (2008) comprovaram a divergência na intensidade de fluorescência dos sinais por meio da análise de curva de varredura de linha de sinais de fluorescência para cromossomos de *L. perenne*, em que ocorre situação semelhante à relatada no presente estudo. Já a detecção de uma ou poucas finas fibras de DNA ligando as extremidades dos fragmentos ocasionados pela quebra no sítio frágil de rDNA 45S em *L. perenne* foi realizada por meio de microscopia de força atômica (HUANG et al., 2009). Os autores sugeriram que as falhas do 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*.

No presente estudo, observaram-se, simultaneamente, quebras e lesões na mesma metáfase, mas localizadas em cromossomos diferentes (Figuras 3A-E), assim como variações no número de quebras e lesões em metáfases de um mesmo meristema, pois algumas metáfases continham apenas cromossomos intactos (Figura 3F) e outras apresentaram, além dos cromossomos intactos, quebras/lesões em diferentes frequências (Figuras 3A-E), sendo que aproximadamente 93% de todas as metáfases avaliadas apresentaram pelo menos uma quebra/lesão no sítio de rDNA 45S.

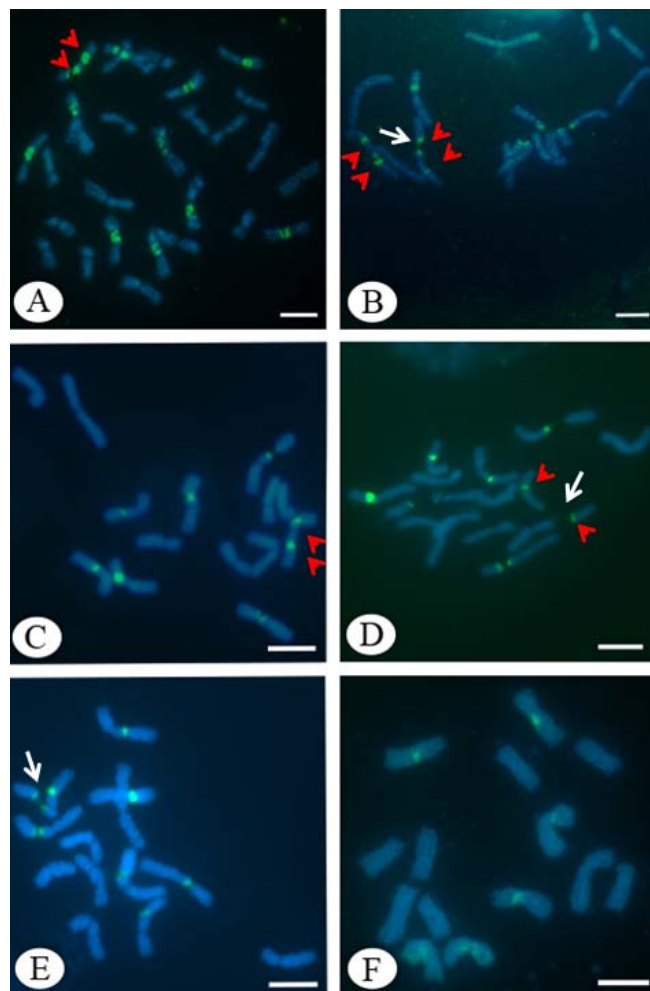


Figura 3 Sítios de rDNA 45S (verde) evidenciados por FISH em cromossomos de genótipos de *L. multiflorum* (A) Barjumbo - planta 33 (tetraploide): 12 cromossomos marcados, sendo um com dois sítios de rDNA 45S (B) Comum - planta 14 (diploide): seis cromossomos marcados, sendo dois com dois sítios de rDNA 45S, cada um (C,D) Comum - planta 2 (diploide): sete cromossomos marcados, sendo um com dois sítios de rDNA 45S (E) Comum - planta 2 (diploide): oito cromossomos marcados (F) Comum - planta 19 (diploide): seis cromossomos marcados. Os sinais provenientes de quebras e lesões foram considerados como um único sinal. As pontas das setas indicam dois sítios de rDNA 45S marcados em um único cromossomo. A seta branca indica um filamento de cromatina ligando o fragmento lesionado ao cromossomo (barra: 5 μ m).

As lesões observadas nas metáfases variaram, em média, de 0,77 para os genótipos diploides, 0,83 para os tetraploides e 0,5 para a progênie triploide, enquanto as quebras variaram em média de 2,49 para os diploides, 4,88 para os tetraploides e 2,75 para a progênie triploide (Tabela 2). Observou-se que quanto maior o número cromossômico, maior o número de sítios de rDNA 45S e, conseqüentemente, maior a ocorrência de quebras. Além disso, o genótipo triploide ABARP - planta 15 apresentou um comportamento intermediário para o número de sítios de rDNA 5 e 45S e número de quebras em relação aos genótipos parentais diploide e tetraploide (Tabela 2).

Em plantas, até o momento, as quebras/lesões nos sítios de rDNA 45S foram relatadas somente em espécies de *Lolium* e foram consideradas semelhantes aos sítios frágeis descritos em cromossomos humanos (HUANG et al., 2008, 2009; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001), os quais ocorrem com alta frequência em linfócitos (cerca de 200 sítios já mapeados) (CIMPRICH, 2003; DEBATISSE et al., 2012). O interesse científico nos sítios frágeis dos cromossomos humanos decorre da sua natureza alvo para danos ao DNA em lesões pré-neoplásicas, que sugerem a sua associação com os estágios iniciais da oncogênese.

Os sítios frágeis são locos expressos como quebras/falhas no cromossomo devido à instabilidade na estrutura do DNA e que são herdáveis. Os sítios frágeis estão envolvidos 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).

Embora não seja possível descartar outros mecanismos envolvidos, as quebras nos sítios frágeis parecem ser as principais responsáveis pelas

características e pela variabilidade no número e posição dos sítios de rDNA 45S, as quais vem sendo descritas por outros autores para *Lolium* (HUANG et al., 2008, 2009; KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010; LIDEIKYTE et al., 2008; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). Para outros grupos vegetais, tais como *Allium* (SCHUBERT; WOBUS, 1985), *Triticeae* (ALTINKUT et al., 2006; DUBCOVSKY; DVORAK, 1995), *Nemesia* (DATSON; MURRAY, 2006), *Crotalaria* (MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2012), *Passiflora* (CUCO et al., 2005), *Aegilops* (RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b) e arroz (SHISHIDO; SANO; FUKUI, 2000) já foram relatadas variações no número e posição dos blocos de rDNA 45S, sem, no entanto, observar e associar a sua ocorrência aos sítios frágeis, mas a outros fenômenos como rearranjos cromossômicos, permuta genética desigual, conversão e transposição gênica.

Uma situação peculiar observada aqui e relatada apenas para um único genótipo de *L. rigidum* em três metáfases (THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001), foi a presença de mais de um sítio de rDNA 45S em um mesmo cromossomo, tanto para cromossomos intactos (Tabela 3 e Figura 3C) como para cromossomos com quebras/lesões (Figuras 3A-D). Além disso, algumas metáfases do Comum - planta 2 apresentaram sete e oito cromossomos marcados pela sonda de rDNA 45S (Figuras 3C-E), considerando os sinais de quebras ou lesões como um único sinal, quando eram esperados apenas seis cromossomos marcados para esse genótipo, conforme já descrito para genótipos diploides de *L. multiflorum* por Thomas et al. (1996). Dessa forma, para os genótipos tetraploide e triploide eram esperados 12 e nove cromossomos com rDNA 45S, respectivamente, o que foi observado no presente estudo.

Tabela 3 Número de metáfases em relação ao número de sítios (N. sítios) de rDNA 45S em genótipos de *L. multiflorum*.

Genótipos 2x N. Sítios	Comum - planta 2	Comum - planta 14	Comum - planta 19	Comum - planta 32	Total
6 sítios em cromossomos diferentes (6)*	0	1	12	9	22
7 sítios, sendo 2 sítios no mesmo cromossomo (6)*	2	3	0	4	9
8 sítios em cromossomos diferentes (8)*	1	0	0	0	1
8 sítios, sendo 4 sítios em 2 cromossomos (6)*	0	3	0	1	4
8 sítios, sendo 2 sítios no mesmo cromossomo (7)*	3	0	0	0	3
Total	6	7	12	14	39
Genótipos 4x N. sítios	Barjumbo - planta 2	Barjumbo - planta 11	Barjumbo - planta 33		Total
12 sítios em cromossomos diferentes (12)*	12	3	1		16
13 sítios, sendo 2 sítios no mesmo cromossomo (12)*	0	0	1		1
14 sítios, sendo 4 sítios em dois cromossomos (12)*	0	1	0		1
Total	12	4	2		18
Genótipo 3x N. sítios	ABARP - planta 15				
9 sítios em cromossomos diferentes (9)*	1				1
10 sítios, sendo 2 sítios no mesmo cromossomo (9)*	3				3
Total	4				4

*Número de cromossomos que apresentam o sítio do rDNA 45S.

Nesse estudo, não foi observada total correspondência entre os sinais de rDNA 45S nas metáfases mitóticas e as RONS marcadas pela coloração com prata para todos os genótipos avaliados (Figura 4). Esse fato demonstra que nem

todos os sítios marcados pela FISH estão envolvidos na transcrição do rRNA, mas apenas os sítios marcados pela coloração com prata.

Nos casos dos cromossomos com quebras em que apenas o fragmento ou o cromossomo foi marcado com Ag-NOR (Figuras 5 A2 e B2), é provável que uma porção do sítio permaneceu ativa e a outra se tornou inativa. Uma das possíveis explicações é que a ausência ou o silenciamento dos genes ribossomais por mecanismos epigenéticos tenham sido desencadeados pelas quebras. A mesma justificativa pode ser aplicada no caso em que apenas um dos dois sítios de rDNA 45S, em um mesmo cromossomo, foi marcado com prata (Figura 5B2), ao considerar os sinais de quebras e lesões como um único sinal.

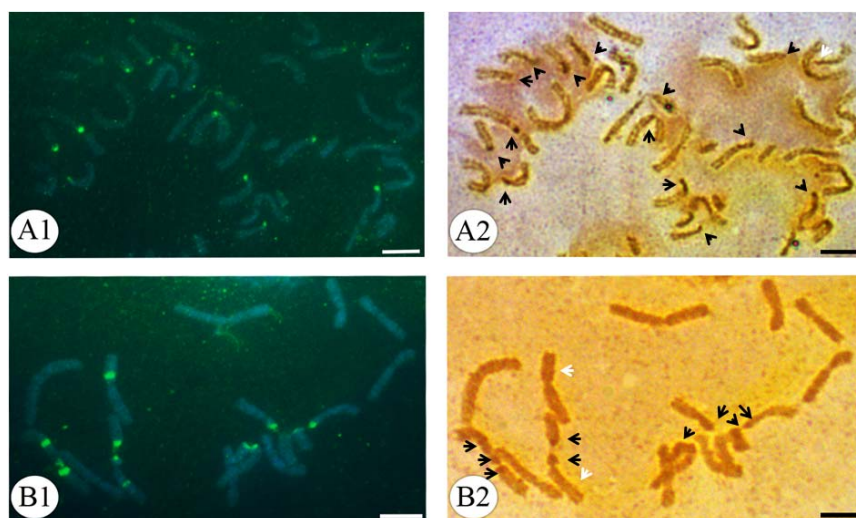


Figura 4 (A1 e B1) Metáfases mitóticas evidenciando sítios de rDNA 45S (verde) por FISH (A2 e B2) e com bandeamento Ag-NOR. Em A2 e B2 as pontas das setas pretas evidenciam os sítios transcricionalmente ativos e as pontas das setas brancas, os inativos (barra: 5 μ m).

O heteromorfismo no tamanho e intensidade de sinais de hibridização de rDNA foram demonstrados em espécies de importância econômica de *Cymbidium* (Orchidaceae). Três espécies desse gênero apresentaram sinais como pontos de fluorescência descondensados, dispersos e estendidos, indicando atividade transcricional. Outras cinco espécies desse gênero revelaram formas condensadas, indicativo de inatividade transcricional (SHARMA et al., 2012). Os autores sugerem que a divergência relatada deve ser devida ao controle epigenético. Dentre os fatores epigenéticos que interferem na atividade transcricional do rDNA 45S estão a metilação do DNA e modificações histônicas (LAWRENCE et al., 2004; MCSTAY, 2006). Em espécies de aveia as bandas menores de rDNA 45S não apresentaram atividade nucleolar (WINTERFELD; RÖSER, 2007). Em *L. mauritiana* apenas o sinal 45S maior e estável foi considerado o sítio ativo da RON, enquanto que os sítios menores e instáveis de 45S nas regiões pericentroméricas em todos os cromossomos foram considerados inativos (KONO et al., 2011).

Em *L. perenne*, a comparação dos sinais obtidos na FISH com os sinais do bandeamento Ag-NOR na mesma metáfase, evidenciou sinais fortes específicos corados com a prata e colocalizados nas regiões de quebras/lesões de sítios de rDNA descondensados. Contrariamente, as regiões intactas dos sítios de rDNA 45S não apresentaram sinais ou esses eram muito fracos (HUANG et al., 2012). Os autores sugeriram que a suscetibilidade diferencial dos locos de rDNA 45S à coloração com Ag-NOR indicam que a transcrição pela Pol I deve impedir a condensação do DNA durante a metáfase, resultando na fragilidade dos sítios de rDNA 45S.

As RONS, além de poderem corresponder a constrições secundárias nos cromossomos metafásicos, são responsáveis pela formação de nucléolos na interfase (BESERENDORFER et al., 2002). Variação no número de nucléolos no núcleo interfásico foi detectada para todos os genótipos avaliados de *L.*

multiflorum, com maior frequência de um a quatro, não sendo detectado mais que oito nucléolos para nenhum genótipo (Tabela 4 e Figura 5). Dentre os sete e oito nucléolos observados nos núcleos interfásicos do genótipo Barjumbo - planta 33 encontravam-se micronúcléolos, caracterizados por diâmetros inferiores a 1µm (Figuras 5G-H).

Carnide, Orellana e Ribeiro (1986) relataram variação no tamanho de RONS em metáfases de *Festuca arundinaceae* Schreb. e de *Festulolium*. O tamanho dos nucléolos formados em associação com uma RON específica é proporcional a dosagem gênica de rRNA e ao nível de atividade gênica (ANASTASSOVA-KRISTEVA et al., 1977; WARBOUTON; ATWOOD; HENDERSON, 1976).

Tabela 4 Porcentagem de núcleos interfásicos com número de nucléolos variando de um a oito e total de núcleos avaliados em genótipos de *L. multiflorum*.

Genótipo	Número de nucléolos								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Comum - planta 14	54	33	11	1,3	0,7				150
Comum - planta 32	35	45	17	3					150
Barjumbo - planta 11	7	25	29	27	10	2			150
Barjumbo - planta 33	10	25	24	24	13	5	1,3	0,7	153
ABARP - planta 15	47	35	11	2					150

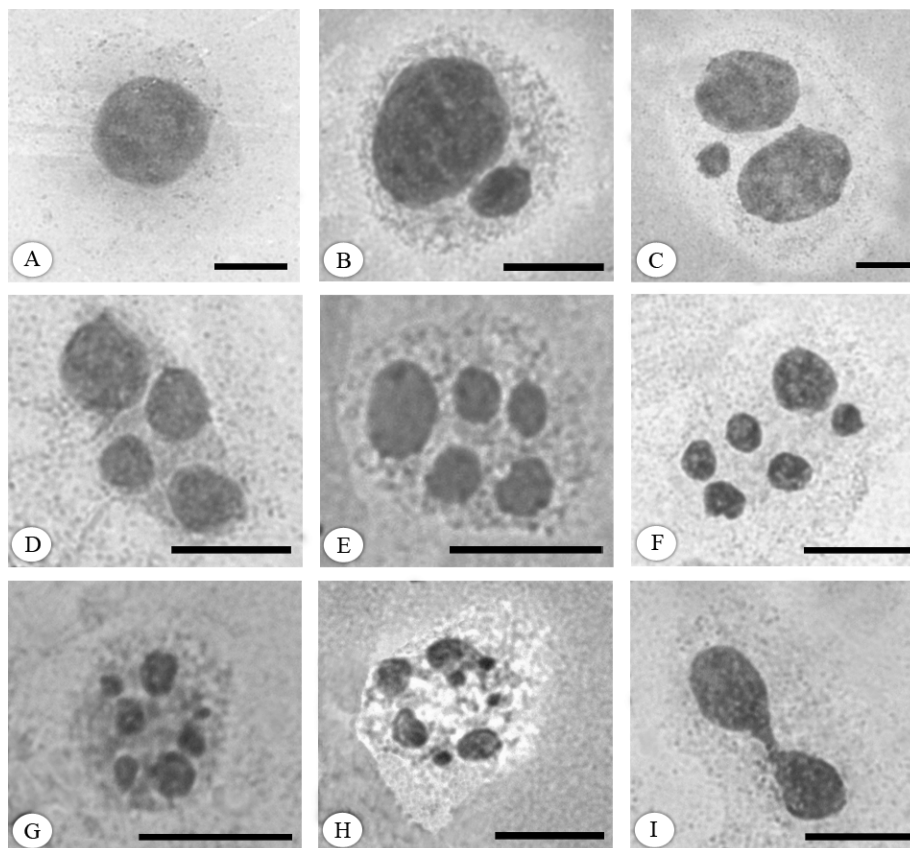


Figura 5 Número de nucléolos em *L. multiflorum* (A) 1 (B) 2 (C) 3 (D) 4 (E) 5 (F) 6 (G) 7 (H) 8. (I) Fusão nucleolar (barra: 10 μ m).

Carnide, Orellana e Ribeiro (1986) encontraram seis RONS em diploides de *L. multiflorum*, nos quais não foram relatadas a ocorrência de quebras/lesões. O número de RONS encontradas foi correspondente ao número de constrições secundárias visualizadas na metáfase. Dessa forma, no presente trabalho eram esperadas nove e doze RONS para os genótipos triploide e tetraploide, respectivamente. No entanto, o número máximo de nucléolos não foi correspondente ao número de constrições secundárias na metáfase mitótica de *L. multiflorum*, uma vez que os números máximos de nucléolos encontrados foram

oito e seis nucléolos para os tetraploides Barjumbo - planta 33 e Barjumbo - planta 11, respectivamente. Os demais genótipos apresentaram menos de seis nucléolos (Tabela 4). A não correspondência pode ser devido às quebras espontâneas nos sítios de rDNA 45S dos genótipos avaliados, uma vez que as mesmas podem interferir na organização dos nucléolos e na inativação dos sítios.

A formação de micronucléolos pode ter associação com os rearranjos provocados pelas quebras/lesões nos sítios frágeis, similarmente ao descrito para linhagens de cevada que apresentavam translocações (SCHUBERT; KÜNZEL, 1990). Os micronucléolos podem ser indicativos de atividade transcricional reduzida de RONS que sofreram algum tipo de rearranjo.

Hibridações intraespecíficas em que ocorrem rearranjos cromossômicos, podem ocasionar modificações na atividade das RONS. Em linhagens de cevada com translocações, em que ocorre a combinação das RONS 6 e 7 em um único cromossomo, a dominância nucleolar intraespecífica ocasiona repressão parcial ou completa da atividade de uma das famílias de genes de rRNA (RIEGER; NICOLOFF; ANASTASSOVA-KRISTEVA, 1979), é estável, desde que ocorra a manutenção da constrição secundária e da RON e, nesse caso, micronucléolos são, por vezes, formados pela supressão parcial da RON (SCHUBERT; KÜNZEL, 1990). Nesse estágio, os corpos pré-nucleolares podem ser confundidos com nucléolos verdadeiros (OCHS et al., 1985). A única indicação confiável de dominância da RON 6 sobre a RON 7 é a presença de nucléolos de tamanhos normais associados apenas a RON 6 de bivalentes em bastão na prófase I de cromossomos com translocação com ambas as RONS (SCHUBERT; KÜNZEL, 1990).

Huang et al. (2012), ao utilizarem a actinomicina D, um inibidor transcricional que bloqueia a transcrição de genes de rRNA, relataram alteração na organização nucleolar em milho. 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 sugerem 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.

Aspectos sobre a dinâmica da formação dos nucléolos também foram observados nos núcleos interfásicos dos genótipos avaliados, em que se constatou variação no tamanho dos nucléolos (Figura 5). No caso da ocorrência de um único nucléolo, esse ocupava grande parte do núcleo (Figura 5A), além disso, foi possível visualizar, em alguns casos, o início da união entre nucléolos (Figura 5I). A proporção de células com diferentes números de macronúcleolos em *L. multiflorum* suportam o padrão de fusão nucleolar descrita por Nicoloff et al. (1979). O heteromorfismo de tamanho entre locos de rDNA homólogos, resultante da expressão diferencial nas RONS, foi detectado em cevada. A atividade preferencial de uma RON sobre sua homóloga, nesse caso é aleatória e independente da origem parental (CARPETA et al., 2002).

A fusão de nucléolos é um fenômeno que já foi relatado para algumas espécies vegetais, dentre elas cevada (SCHUBERT; KUNZEL, 1990). Nesse caso os autores sugerem que pareamentos mitóticos e meióticos dos braços homólogos devem ser a razão para a fusão dos nucléolos e assim, para a não ocorrência do número máximo esperado de nucléolos na intérfase.

Para os sítios de rDNA 5S não foi observada variabilidade dentro de um mesmo genótipo avaliado em *L. multiflorum*. Para os genótipos diploide, tetraploide e triploide foram visualizados dois, quatro e três sinais dessa sonda, respectivamente. Tanto nos diploides quanto nos poliploides, todos os sinais observados estavam sempre localizados nos braços opostos aos que continham o sinal de rDNA 45S (Tabela 2 e Figura 6).

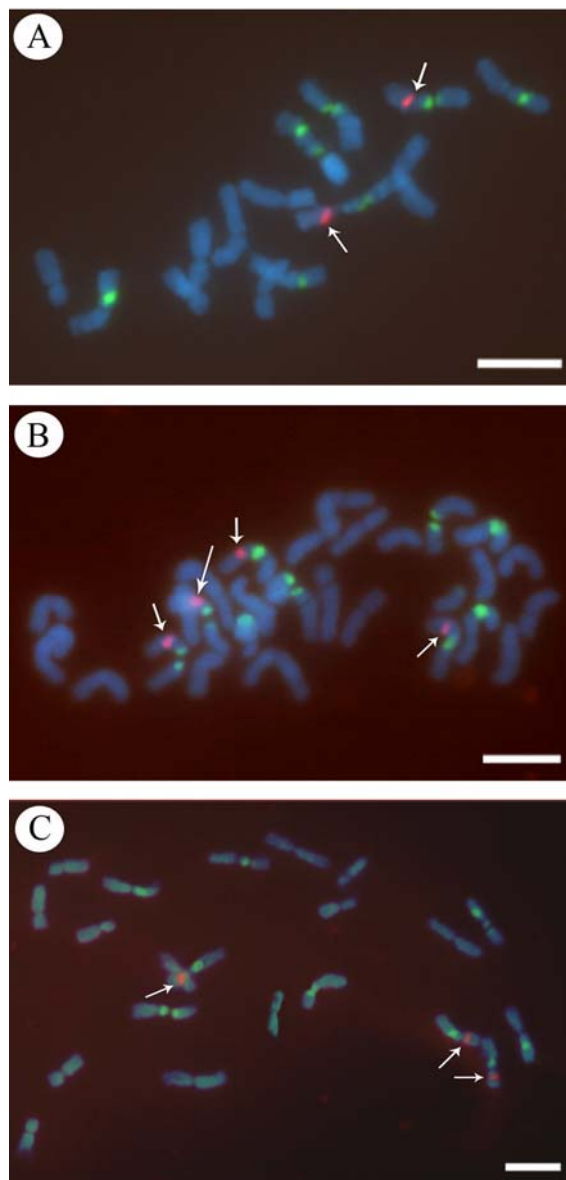


Figura 6 Localização dos sítios de rDNA 5S (vermelho) e sítios de rDNA 45S (verde) evidenciados por FISH em genótipos de *L. multiflorum* (A) Comum - planta 2: dois sinais (B) Barjumbo - planta 2: quatro sinais (C) ABARP - planta 15: três sinais. As setas evidenciam os sítios de rDNA 5S (barra: 5 μ m).

Ao avaliar sete taxa do gênero *Lolium* (*L. temulentum*, *L. remotum*, *L. persicum*, *L. rigidum* e *L. rigidum* var. *rothbollioides*, *L. multiflorum*, *L. perenne* e *L. rigidum* var. *rigidum*), Thomas et al. (1996) identificaram dois sítios de rDNA 5S para todos os taxa analisados. Ksiazczyk, Taciak e Zwierzykowski (2010) relataram dois sinais de rDNA 5S para a cultivar diploide Arka de *L. perenne* e quatro e cinco sinais para a cultivar tetraploide Solen. Lideikyte et al. (2008) também encontraram dois sinais 5S nas cultivares diploides (Bellem e Adin) de *L. multiflorum*. No entanto, para as cultivares tetraploides (Catalpa, Lotos e Melloa) o número de sinais variou de três a cinco.

A variabilidade de sinais de rDNA 5S, ao comparar diferentes trabalhos, parece ser dependente de um mecanismo ainda desconhecido. Uma das possíveis hipóteses é que o rDNA 5S é frequentemente localizado na heterocromatina pericentromérica que é tipicamente rica em elementos transponíveis, assim, um rearranjo mediado por transposons pode contribuir para a perda ou transposição de sequências de rDNA 5S (KSIAZCZYK; TACIAK; ZWIERZYKOWSKI, 2010).

Nos genótipos avaliados, os sítios de rDNA 5S parecem ser mais estáveis que os de rDNA 45S, onde as quebras e lesões promovem a fragmentação dos cromossomos e a ocorrência de um número maior de sítios do que o esperado. Esse fenômeno pode ter implicações na organização do genoma, pois pode resultar em novos rearranjos cromossômicos que impactarão na evolução do grupo, uma vez que novas espécies surgem por meio dos rearranjos cromossômicos.

Existem evidências de que os locos de rDNA podem mudar de posição no cromossomo sem a ocorrência de translocações (DUBCOVSKY; DVORAK, 1995), mas sim com a atividade de elementos transponíveis (HAYASAKI; MORIKAWA; LEGGET, 2001; RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a, 2004b). Em *Aegilops speltoides* é relatada a transposição dos locos de rDNA

ativados por transposons do tipo *En/Spm* (RASKINA; BELYAYEV; NEVO, 2004a).

Para tentar elucidar a variabilidade dos locos de rDNA 45S em *L. multiflorum*, investigações acerca da ocorrência de mecanismos epigenéticos e de elementos transponíveis fazem-se necessárias. Além disso, para averiguar a possibilidade da origem de novos cromossomos resultantes das quebras nas regiões do rDNA 45S, estudos futuros sobre atividade telomérica e neocentromérica são imprescindíveis. Nesse aspecto, também seria interessante avaliar a meiose desses genótipos, apesar de que estudos preliminares em genótipos de *L. multiflorum* mostraram meiose regular (KLEIJER, 1984; TECHIO et al., 2010) e altas taxas de viabilidade polínica (NUNES et al., 2012).

Diante de toda a variabilidade relatada para o rDNA 45S recomenda-se que a utilização desse loco em estudos evolutivos, taxonômicos e para construção de mapas físicos dos cromossomos, pelo menos para *Lolium*, seja feita com precaução, uma vez que há descontinuidade na linhagem de rDNA na escala evolutiva e o mesmo parece não se caracterizar como um marcador espécie-específico e estável citogeneticamente.

4 CONCLUSÕES

Não há variabilidade nos sítios de rDNA 5S, mas existe uma ampla variabilidade nos sítios de rDNA 45S, inclusive com a presença de mais de um sítio em um mesmo cromossomo. Esse sítio corresponde a uma região de fragilidade cromossômica, suscetível à quebras e geração de fragmentos cromossômicos nos genótipos de *L. multiflorum* avaliados.

Nem todos os sítios de rDNA 45S são ativos transcricionalmente e variação no número e tamanho de nucléolos, além de mecanismos de fusão nucleolar, ocorrem em *L. multiflorum*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo suporte financeiro a pesquisa e concessão de bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- ALTINKUT, A. et al. Ac-like transposons in populations of wild diploid *Triticeae* species: comparative analysis of chromosomal distribution. **Chromosome Research**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 307-317, Apr. 2006.
- ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. et al. Nucleolus formation in structurally reconstructed barley karyotypes with six satellite chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 62, n. 2, p. 111-117, 1977.
- BESENDORFER, V. et al. Chromosomal organization of ribosomal genes and NOR associated heterochromatin, and NOR activity in some populations of *Allium commutatum* Guss. (Alliaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 139, n. 1, p. 99-108, 2002.
- 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.
- 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.; RIBEIRO, M. A. M. V. Nucleolar organiser activity in *Lolium* and *Festuca*: 1., *Lolium multiflorum*, *Festuca arundinacea* and *Lolium-Festuca* Hybrids. **Heredity**, Cary, v. 56, n. 3, p. 311-317, June 1986.
- CASTILHO, A.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. **Genome**, Ottawa, v. 38, n. 1, p. 91-96, Feb. 1995.
- CIMPRICH, K. A. Fragile sites: a breaking up over a slowdown. **Current Biology**, London, v. 13, n. 6, p. 231-233, Mar. 2003.
- CONCONI, A. et al. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. **Cell**, Cambridge, v. 57, n. 5, p. 753-761, June 1989.

CUCO, S. M. et al. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 3, p. 220-228, 2005.

DARLINGTON, C. D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. London: Allen and Unwin, 1955. 519 p.

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.

DEBATISSE, M. et al. Common fragile site: mechanisms of instability revisited. **Trends in Genetics**, London, v. 28, n. 1, p. 22-32, Jan. 2012.

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.

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

HAYASAKI, M.; MORIKAWA, T.; LEGGET, J. M. Intraspecific 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.

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.

HUGHIES, S. E.; HAWLEY, R. S. Heterochromatin: a rapidly evolving species barrier. **Plos Biology**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. 1-4, Oct. 2009.

JENKIN, T. J.; THOMAS, P. T. The breeding affinities and cytology of *Lolium* species. **Journal of Botany**, London, v. 76, p. 10-12, 1938.

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

KONO, Y. et al. Distribution patterns of rDNAs and telomeres and chromosomal rearrangement between two cytotypes of *Lysimachia mauritiana* L. (Primulaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 64, n. 1, p. 91-98, 2011.

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

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.

LAWRENCE, R. J. et al. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 599-609, Feb. 2004.

LIDEIKYTĖ, L. et al. FISH assessment of ribosomal DNA sites in the chromosome sets of *Lolium*, *Festuca* and *Festulolium*. **Agriculture**, London, v. 95, p. 116-124, 2008.

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

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

MORALES, A. G.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype characterization reveals an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (LeguminosaePapilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 2, p. 277-288, Feb. 2012.

NICOLOFF, H. et al. Nucleolus formation in structurally reconstructed barley karyotypes with 6 satellite chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 62, p. 103-109, 1977.

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.

OCHS, R. L. et al. Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. **Chromosoma**, Berlin, v. 92, p. 330-336, 1985.

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

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.

RIEGER, R.; NICOLOFF, H.; ANASTASSOVA-KRIESTEVA, M. Nucleolar dominance in interspecific hybrids and translocation lines: a review. **Biologie Zentralblatt**, Stuttgart, v. 98, p. 385-398, 1979.

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.

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.

SHARMA, S. K. et al. Physical localization and probable transcriptional activity of 18S-5.8S-26S rRNA gene loci in some *Asiatic Cymbidiums* (Orchidaceae) from north-east India. **Gene**, Amsterdam, v. 499, n. 2, p. 362-366, May 2012.

SHISHIDO, R.; SANO, Y.; FUKUI, K. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 263, n. 2, p. 586-591, May 2000.

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.

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.

WARBOUTON, D.; ATWOOD, K. C.; HENDERSON, A. S. Variation in the number of genes rDNA among human acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite association. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 17, p. 221-230, 1976.

WARPEHA, K. M. F.; GILLILAND, T. J.; CAPESIUS, I. An evaluation of rDNA variation in species (ryegrass). **Genome**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 307-311, Apr. 1998.

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

ARTIGO 2

Morphology and Pollen Viability of *Lolium multiflorum* Lam.¹

¹Artigo publicado na Revista Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 36, n. 2, p. 180 -188, mar./abr., 2012.

ABSTRACT

Study and characterization of pollen grains are essential for different areas, especially taxonomy, genetic improvement, phylogeny, and paleobotany. As yet, there are no reports on pollen morphology of genotypes of naturalized *Lolium multiflorum* Lam., introduced cultivars or breeding populations, diploid or polyploid. We analyzed ten genotypes of annual ryegrass (*L. multiflorum* Lam) to the viability of pollen grains by using propionic carmine and Alexander's stain, while morphology was assessed by the acetolysis technique. Measures of polar axis (P), equatorial diameter (E), exine thickness, and analysis of pollen grains were obtained by scanning electron microscopy (SEM). All genotypes showed high rate of pollen viability (> 89%) for both stains. There were differences between genotypes in the following quantitative traits: polar axis, equatorial diameter, exine, endexine, ektexine, and P/E ratio. Pollen grains were characterized as small, monoporates (a single pore), with circular and non-prominent apertures. In addition to helping distinction of pollen grains, morphometric differences can be used later to compare ploidy levels, thus assisting in breeding programs of the species.

Keywords: Scanning electron microscopy. Ryegrass. *Lolium*. Acetolysis.

RESUMO

O estudo e a caracterização do grão de pólen são fundamentais para diferentes áreas, em especial, para a taxonomia, o melhoramento genético, a filogenia e a paleobotânica. Para genótipos de *Lolium multiflorum* Lam., naturalizados no Brasil, cultivares introduzidas ou populações de melhoramento, diploides e poliploides, não existem relatos sobre a caracterização morfológica. Nesse trabalho foram analisados dez genótipos de azevém anual (*L. multiflorum*) para a viabilidade dos grãos de pólen por coloração com os corantes carmim propiônico e Alexander e a morfologia por meio da técnica de acetólise, sendo obtidas medidas do eixo polar (P), do diâmetro equatorial (E), e da espessura da exina e análise dos grãos de pólen por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todos os genótipos avaliados apresentaram alta taxa de viabilidade polínica (>89%) para os dois corantes utilizados. Houve diferença entre os genótipos para os caracteres quantitativos eixo polar, diâmetro equatorial na vista equatorial, exina, endoexina, ectoexina e razão P/E. Os grãos de pólen foram caracterizados como pequenos, monoaperturados, com abertura não proeminente e com âmbito circular. As diferenças morfométricas entre os grãos de pólen podem auxiliar na distinção entre os mesmos e, posteriormente, serem utilizadas para comparação entre os níveis de ploidia, auxiliando assim, nos programas de melhoramento da espécie.

Palavras-chave: Microscopia de varredura. Azevém. *Lolium*. Acetólise.

1 INTRODUCTION

Lolium multiflorum Lam, known as annual ryegrass, belongs to the Poaceae family and is originally from the Mediterranean basin (southern Europe, northern Africa, and Asia Minor) from where it spread to Europe and North America. It had been already known in France in 1818 and in Switzerland in 1820, and was introduced in England in 1831 (NELSON; PHILLIPS; WATSON, 1997). The species was first cultivated in Italy, so it is also called Italian ryegrass (*L. italicum*).

Ryegrass is widely cultivated in many temperate countries where climatic conditions are favorable for its development, as it is a cold hardy plant (MORAES, 1963; ARAÚJO, 1967). In southern Brazil, ryegrass was probably introduced by Italian settlers in 1875 and is currently the largest temperate forage species grown to meet livestock feed demand in winter (ARAÚJO, 1978).

Despite great interest in the forage and its large variability among and within populations (TCACENCO, 1989; OLIVEIRA et al., 1997; CORREA et al., 2007; MITTELMANN et al., 2010) little has been done in terms of genetic improvement in the country. In addition to productivity, other ryegrass features must be improved, such as seasonal distribution of forage yield with adjustments to meet periods of greatest need and different production systems (FONTANELI; FONTANELI, 2000).

Recently, several tetraploid cultivars have been introduced in Brazil, with characteristics of agronomic interest, such as long cycle (MITTELMANN et al., 2004), but they have shown low capacity for natural re-seeding. Thus, offspring obtained from crossing diploid and tetraploid accessions of annual ryegrass are of interest for the breeding to the introduction of agronomic traits and the study of these offspring will lead to a better understanding of the reproductive process in these cultivars.

As yet, there are no reports on pollen morphology and viability in genotypes of naturalized *L. multiflorum*, introduced cultivars or breeding populations, diploid or polyploid. Thus, characterization of pollen grains is an important step for programs of genetic resource conservation and improvement, in order to complement basic studies of biological data that characterize genotypes. In addition, pollen viability data may correlate with meiotic abnormalities, assist in selection of genetic material, making it an additional tool in agriculture and biotechnology research.

Therefore, the objective of this work was to evaluate morphology and pollen viability of genotypes (parents and offspring) of *L. multiflorum*.

2 MATERIAL AND METHODS

Ten genotypes of annual ryegrass (*L. multiflorum* Lam) were evaluated (Table 1). The genotypes Comum, Barjumbo, INIA Titan and Avance are commercial cultivars available in Brazil, where samples for this study were derived from the Active Germplasm Bank of Ryegrass of Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado. The offspring resulted from crossing tetraploid mother plants and diploid fathers in a greenhouse, without emasculation. We used the ‘chance hybrids’ technique, in which a few plants of each cultivar are kept side by side and flowering is synchronized by cutting the earlier plant material. Only plants of the cultivar Barjumbo, Avance and INIA Titan were collected and they are the maternal plants of offspring.

Analysis of viability of pollen grains was estimated by their staining capacity by two colorimetric tests using 1% propionic carmine and Alexander’s stain. In propionic carmine tests, red-colored pollen grains were considered viable while those unstained were deemed inviable. Using Alexander’s stain, which contains malachite green and acid fuchsin, inviable pollen grains (aborted) stain green while viable pollen grains (not aborted) stain purple. In our tests, we evaluated 10 slides per genotype and 100 pollen grains per slide.

To analyze the morphology of pollen grains immediately after anthesis, anthers were collected, fixed in Carnoy (ethanol: propionic acid, 3:1), and stored at -20° C until time of use. Slides were prepared according to the Erdtman acetolytic method (1952). Then we evaluated five slides per genotype and measured polar axis (P), equatorial diameter (E), and exine thickness in 10 pollen grains per slide. The measurements were performed with software Image Tool 3:00 UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio) within seven days after acetolysis, in order to avoid changes in morphology and size of pollen grains. We defined P/E ratios to classify pollen

types according to Punt et al. (1999). Size of pollen grains was determined by measuring the polar axis, based on the terminology by Punt et al. (1999). Photomicrographs of pollen grains were obtained with a Nikon microscope from images captured by a FDX 35 camera connected to a microcomputer.

Table 1 Genotypes of *L. multiflorum*.

Genotypes	Origin	Expected ploidy
Comum	Local Population	2x
Avance	Introduced cultivar	4x
Barjumbo	Introduced cultivar	4x
INIA Titan	Introduced cultivar	4x
A41	INIA Titan x Comum	3x
A42	INIA Titan x Comum	3x
A44	INIA Titan x Comum	3x
A45	Avance x Comum	3x
A47	Avance x Comum	3x
ABARP	Barjumbo x Comum	3x

For analysis of scanning electron microscopy (SEM), anthers were prepared according to the standard protocol of the Laboratory of Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis (LME) of Federal University of Lavras (UFLA). Inflorescences were washed three times for 10 minutes in cacodylate buffer and post-fixed in osmium tetroxide for 1 hour at room temperature. They were then washed three times, dehydrated in acetone gradient (25%, 50%, 75%, 90%, and 100% for 10 minutes each). Next, the pollen grains were taken to a critical point dryer (CDP 030) and to a sputter coater (SCD 050), and were then analyzed by SEM-LEO EVO40.

Quantitative data were submitted to the analysis of variance and the Scott and Knott test ($p < 0.05$). Pollen viability data were obtained by two methods: variation among genotypes within colorimetric test, and variation

among colorimetric tests within each genotype. The analyses were performed with Sisvar program (FERREIRA, 2003).

3 RESULTS AND DISCUSSION

All genotypes showed high rate of pollen viability ($> 89\%$), regardless of the dye used for testing (Table 2 and Figure 1). Analysis of dyes within each genotype showed that Comum, A44, Avance, A45, and ABARP had no significant differences ($p < 0.05$) in viability with neither Alexander's stain nor propionic carmine. However, differences were found ($p > 0.05$) in the other genotypes (INIA Titan, A41, A42, A47 and Barjumbo).

The percentage of pollen viability ranged from 89.6% (A42) to 99.3% (INIA Titan) with an average of 93.02% with propionic carmine, while rates with Alexander's stain ranged from 90.4% (A44) to 97.5% (INIA Titan) with an average of 94.4%.

Viability rates estimated with propionic carmine showed that offspring A42, A44, and A41 (89.6%, 90.5%, 90.9%, respectively) showed lower viability ($p < 0.05$) than both parents INIA Titan (99.3%) and Comum (96.1%). A45 and A47 offspring (92.0%, 93.3%, respectively) and their parent Avance (93.9%) had equivalent rates, although offspring showed lower rates ($p < 0.05$) than parent Comum (96.1%). Parent Avance (mean 93.9%) showed a significant difference ($p < 0.05$) in pollen viability when compared with Comum diploid (96.1%). Barjumbo tetraploid (91.0%) and Comum diploid (96.1%) showed significant differences at 5% probability in their ABARP offspring (93.6%) (Table 2).

In tests using Alexander's stain, only A44 offspring (90.4%) showed lower viability ($p < 0.05$) than both parents Comum (93.4%) and INIA Titan (97.5%). A44, A42, and A41 offspring (90.4%, 93.2%, and 94.7%, respectively) showed differences between them ($p < 0.05$), as well as lower viability than parent INIA Titan (97.5%). However, when compared with parent Comum (93.4%) only A44 (90.4%) and A41 (94.7%) offspring showed significant

differences ($p < 0.05$). In the crossing between Avance (tetraploid) x Comum diploid, only A47 offspring (97.2%) had higher mean ($p < 0.05$) than both parents, while A45 offspring (92.9%) only differed from tetraploid parent Avance (95%), showing a lower mean ($p < 0.05$). ABARP offspring (94.7%) exceeded the viability of the diploid parent (93.4%) but did not differ from Barjumbo tetraploid parent (95.7%) ($p < 0.05$).

Table 2 Viability of pollen grains using colorimetric tests with propionic carmine and Alexander's stain in genotypes of *L. multiflorum*.

Genotypes	Carmine Propionic (%)	Alexander's stain (%)
Comum	96.1 c A	93.4 b A
INIA Titan	99.3 d B	97.5 d A
A41	90.9 a A	94.7 c B
A42	89.6 a A	93.2 b B
A44	90.5 a A	90.4 a A
Avance	93.9 b A	95.0 c A
A45	92.0 b A	92.9 b A
A47	93.3 b A	97.2 d B
Barjumbo	91.0 a A	95.7 c B
ABARP	93.6 b A	94.7 c A
Média	93.02	94.4

Different lowercase letters in the column: significant difference by Scott and Knott test ($p < 0.05$). Different capital letters in the line: significant difference by Scott and Knott test ($p < 0.05$).

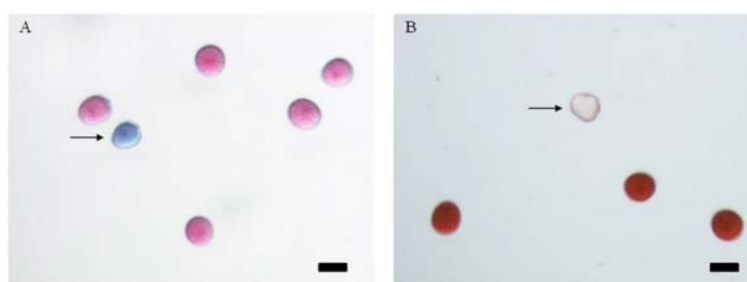


Figure 1 Pollen grains of *L. multiflorum* stained with Alexander's stain (A) and propionic carmine (B). The Arrow indicates inviable pollen grains. Bar = 50 μm .

Viability rates were deemed high for all genotypes (parents and offspring). Offspring definitely showed fertilization potential, and thus can be incorporated into breeding programs, as effectiveness of crossing depends on very fertile pollen donors. The high rate of functional pollen in these genotypes may be associated with meiotic regularity and regular collection timings (8:30 am-10:00 am) when anther dehiscence begins, implying that viability reaches its maximum.

The results suggest non-triploid offspring, as the viability rate of pollen grains was high. However, this information can only be confirmed by counting chromosomes and assessing the meiotic behavior. Meiotic studies have been accomplished on the species and showed a regular process with formation of seven ring bivalents (KLEIJER, 1984; JAUHAR, 1975; TECHIO et al., 2010).

Differences in viability among genotypes can be explained by the considerable variation in loss of pollen viability between individuals of a species and between samples of the same individual (TECHIO et al., 2006).

Pollen viability may vary greatly throughout its development. During flower opening pollen grains must be perfectly viable, as their viability and fertilization efficiency generally decrease as time progresses (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002).

As manifestation of genotypes occurs through male-female gamete contribution, high pollen viability increases the possibility of forming different allele combinations, and ultimately, to the genetic variability (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002). Thus, rates of pollen viability can be used to indicate the most favorable crossings.

Furthermore, pollen viability should be adequate to ensure seed production. In order to be widely used in production systems, offspring must produce a large numbers of viable seeds to meet the demand for extensive

grazing areas. Thus, production of fertile pollen grains is absolutely necessary (PAIVA, 2006).

Studies using acetocarmine 1% in 52 genotypes of Triticale, an intergeneric hybrid originated from crossing between tetraploid wheat and diploid rye, showed that the average percentage of viable pollen grains in the genotypes ranged from 68.6% to 98.8%. These values are considered high among genetically distinct genotypes (ZANOTTO et al., 2009). Acetocarmine 1% and propionic carmine 1% are widely used in routine analysis; however, they may be inadequate for some species, as thick exine of pollen grains can hamper dye penetration.

Measurements showed that all genotypes had pollen grains with polar axis (P) smaller than equatorial diameters (E), so that P/E ratios of genotypes Comum, A42, and A45 ranged from 0.9058 to 0.9078 μm . Pollen grains were classified as oblate spheroid, according to the classification proposed by Punt et al. (1999). The genotypes A41, A44, A47, ABARP, INIA Titan, Avance and Barjumbo showed a range of variation of 0.8384-0.8736 μm and sub-oblate pollen grains (Figure 2). This difference was statistically confirmed by the Scott-Knott test ($p < 0.05$) (Table 3). We can, thus, infer morphological differences between pollen grains only detected by measurements (Figure 3). This variation within a species can be explained by the harmomegathic process, in which pollen grains change shape to accommodate variation in the cytoplasm volume caused by changes in hydration, which may reflect in the morphology assessment.

The genotypes Comum, INIA Titan, Avance, Barjumbo, A44, A45, A47, and ABARP had thicker endexine (mean: 1.43 μm) than ectexine (mean: 1.11 μm). Only the genotypes A41 and A42 showed no significant differences ($p < 0.05$) in ectexine and endexine measures (Table 3).

According to Muller (1979), exine structure is related to protection, harmomegathic process, and reserve. In the past, it was suggested that electrostatic forces could be directly related to the outermost layer of the exine. Chaloner (1986) suggested that smooth pollen grains would lose their charge more quickly to achieve the same charge as the stigma. Galati and Rosenfeld (1998) reported that exine surfaces are electrically charged in the same way, as they have sporopollenin. This would cause mutual repulsion and enhanced pollen discharge, which could be considered a competitive advantage in fertilization.

Moreover, exine thickness is directly related to staining, as thicker exines hamper dye penetration. This may lead to incorrect assessments on unviability and reduce the efficiency of responses provided by colorimetric tests.

In relation to the polar axis, a characteristic that determines the size of pollen grains, all genotypes were characterized as small, however we found significant differences ($p < 0.05$) between genotypes. ABARP had the largest size (36.78 μm), A44, INIA Titan, A41, A47, Avance, Barjumbo, A45 had intermediate values (29.01, 29.97, 30.12, 30.15, 31.10, 33.35, 34.34 μm , respectively), and A42 and Comum had the smallest values (26.01 and 26.73 μm , respectively) (Table 3).

Number and size of pollen grains definitely influence competition, as these factors determine the area occupied on the stigma surface. To successfully reproduce, plants must disperse their resources appropriately to improve pollen grain size (small), germination capacity, and pollen tube growth (TEJASWINI, 2002). Considering this characteristic, Comum diploid and A42 offspring showed the best dispersion, as they were the smallest genotypes.

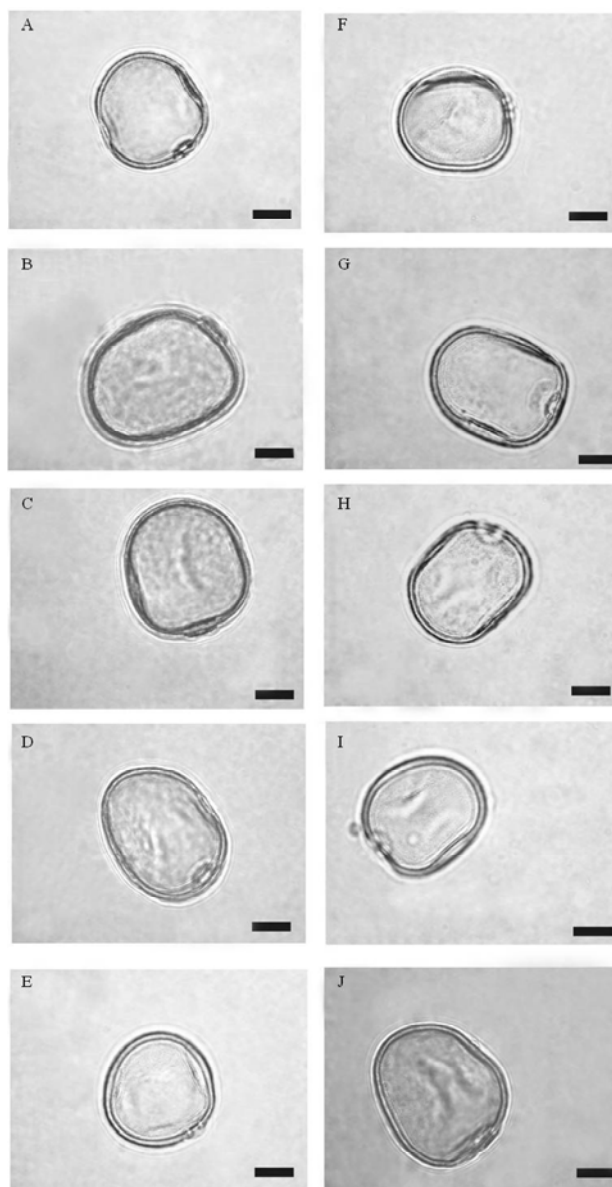


Figure 2 Polar and equatorial view of acetolyzed pollen grains of *L. multiflorum* genotypes (A) Comum, (B) Avance, (C) Barjumbo, (D) INIA Titan, (E) A41, (F) A42, (G) A44, (H) A45, (I) A47, (J) ABARP. Oblate spheroid: Comum (A), A42 (F), and A45 (H); Sub-oblate: the others. Bar=10 μ m.

Table 3 Mean values (in μm) of exine layers, polar axis, P/E ratios, and scope of pollen genotypes of *L. multiflorum*.

Genotypes	Ektexine	Endoexine	Exine	Polar axis (P)	Rations P/E	Scope
A44	1.06 A	1.31 B	2.38	29.01 b	0.83 a	Circular
ABARP	1.28 A	1.63 B	2.92	36.78 e	0.84 a	Circular
Barjumbo	1.12 A	1.39 B	2.51	33.35 d	0.86 a	Circular
A47	1.14 A	1.32 B	2.47	30.15 c	0.86 a	Circular
A41	1.14 A	1.19 A	2.33	30.12 c	0.87 a	Circular
Avance	1.09 A	1.63 B	2.73	31.10 c	0.87 a	Circular
INIA Titan	0.93 A	1.41 B	2.35	29.97 c	0.87 a	Circular
A42	1.24 A	1.27 A	2.51	26.01 a	0.90 b	Circular
Comum	1.18 A	1.32 B	2.51	26.73 a	0.90 b	Circular
A45	1.10 A	1.44 B	2.54	34.34 d	0.90 b	Circular

Means followed by same letter in columns do not differ statistically by Scott and Knott test ($p < 0.05$). Means followed by same letter in rows do not differ statistically by Scott and Knott test ($p < 0.05$).

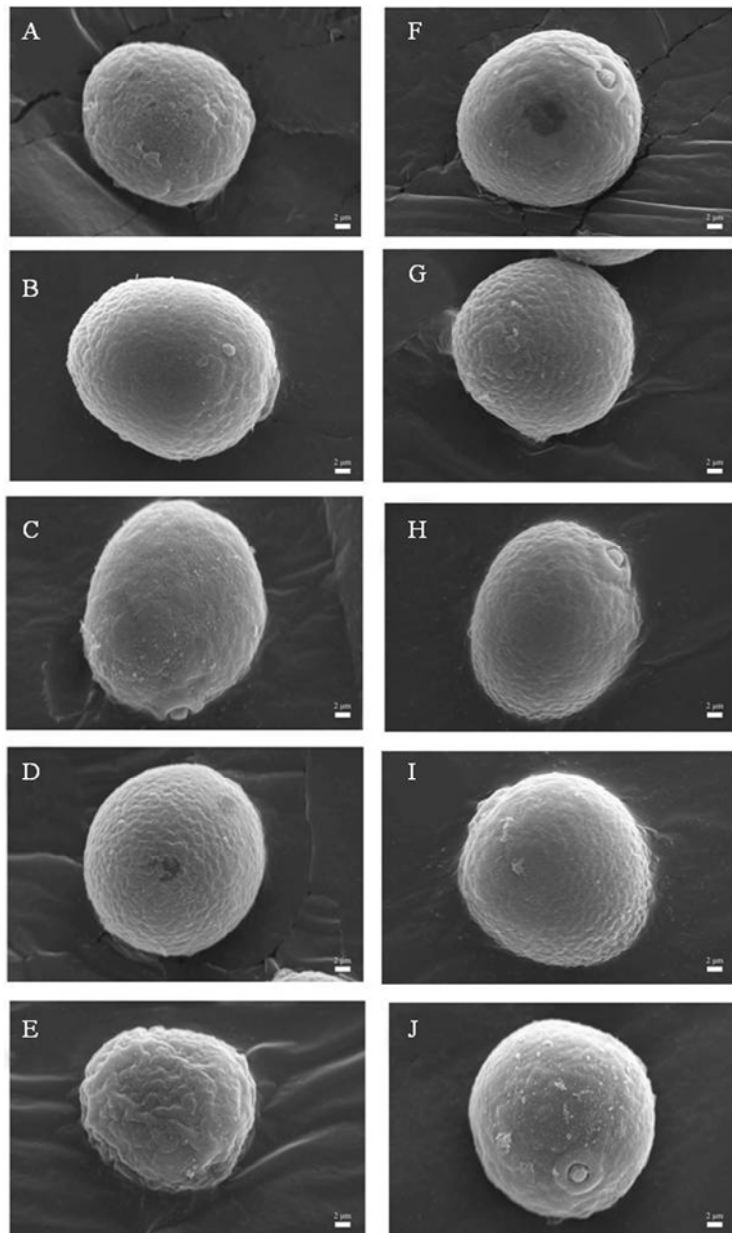


Figure 3 Pollen grains of *L. multiflorum* Lam in SEM: (A) Comum, (B) Avance, (C) Barjumbo, (D) INIA Titan, (E) A41, (F) A42, (G) A44, (H) A45, (I) A47, (J) ABARP. Bar = 2 μ m.

A negative correlation between pollen grain size and pollen tube length was reported in the family Caryophyllaceae. This suggests that it is more advantageous for a plant to produce a large number of small pollen grains than a small number of large grains, as small grains have a greater ability to compete (ability to germinate and produce large pollen tubes), which increases the reproductive adaptability (TEJASWINI, 2002).

Morphometric differences between genotypes can help distinguish them, and then be used to compare the levels of ploidy. This comparison may be based on the phenomenon gigas, in which plants with high ploidy levels are generally stronger and have larger stomata, flowers, pollen grains, and fruits when compared with plants of the same species showing lower ploidy level (SILVA; CALLEGARI-JACKES; ZANETTINI, 2000; SCHIFINO-WITTMANN, 2004; CAMPOS et al., 2009).

Based on scanning electron microscopy (SEM) analysis, pollen grains were characterized as monoporates (a single pore), with circular and non-prominent apertures (Figure 3).

Colpi are apertures with thin exine, where the pollen tube will emerge during fertilization (MIRANDA; ANDRADE, 1990). A great number of colpi increases the chances of successful emergence of the pollen tube, and consequently increasing the fertilization of egg cells. Thus, the number of colpi is an important feature for evolutionary inference. According to Miranda and Andrade (1990), pollen grains with only one aperture are more primitive than those with three apertures.

Given the characteristics presented here, pollen morphology can be useful in taxonomic and evolutionary studies of the genus *Lolium*.

4 CONCLUSIONS

The genotypes of *L. multiflorum* showed high rates of pollen viability. Pollen grains were characterized as small, monoporates with circular and non-prominent apertures and there were differences between genotypes in the quantitative traits.

In addition to helping distinction of pollen grains, morphometric differences can be used later to compare ploidy levels, thus assisting in breeding programs of the species.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, for financial support to the research and to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG for scholarship to the first author.

To professor Eduardo Alves (Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA) by contributions in the analysis of electron microscopy.

6 REFERENCES

- ARAÚJO, A.A. **Forrageiras para ceifa**. Porto Alegre: Sulina, 1967. 154p.
- ARAÚJO, A.A. **Forrageiras para ceifa: capineiras, fenação e ensilagem**. Porto Alegre: Sulina, 1978. 196p.
- CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SALGADO, C.C.; SANTOS, F.C.; COSTA, P.N.; SILVA, P.S.; ALVES, C.C.S.; VICCINI, L.F.; PEREIRA, A.V. *In vitro* induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. **Plant Breeding**. Berlin, v.128, p.101-104, 2009.
- CHALONER, W.G. Electrostatic forces in insect pollination and their significance in exine ornament. In: BLACKMORE S.; FERGUSON I.K. **Pollen and Spores**. Form and Function. London: Academic Press, 1986, v.12, p.103-108.
- CORREA, B. O. ; MITTELMANN, A.; STUMPF, M. T.; PERES, M. M.; DUARTE, P. R. Caracteres agrônômicos em populações locais de azevém no sul do Brasil. **Magistra**. Cruz das Almas, v.19, n.4, p. 274-282, 2007.
- ERDTMAN, V. **Pollen morphology and plant taxonomy**: angiosperms. Stockholm: Almqvist & Wilsell, 1952. 539p.
- FERREIRA, D.F. 2003. *Sisvar®. Versão 4.6 (Build 61)*; Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- 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.
- GALATI, B.G.; ROSENFELD, S. The pollen development in *Ceiba insignis* (Kunth) Gibbs & Semir ex *Chorisia speciosa* St. Hil. (Bombacaceae). **Phytomorphology**, Delhi, v.48, p.121-130, 1998.
- JAUHAR, P. P. Chromosome relationship between *Lolium* and *Festuca*. **Chromosoma**, Berlin, v. 52, p. 103-121, 1975.
- KLEIJER, G. Cytogenetic studies of crosses between *Lolium multiflorum* Lam. and *Festuca arundinacea* Schreb. The parents and the F1 hybrids. **Z Pflanzenzüchtg.**, [s.l], v. 93, p. 1-92, 1984.

- MIRANDA, M.M.B.; ANDRADE, T.A.P. **Fundamentos de palinologia**. Fortaleza: UFC, 1990. 99p.
- MITTELMANN, A.; LEDO, F.J.S.; POLI, C.H.E.C.; MORAES, C.O.C.; NESKE, M.Z. **Avaliação de populações de azevém quanto à produção de forragem**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2004. 12 p. (Embrapa Gado de Leite/Boletim de Pesquisa, 15).
- MITTELMANN, A.; MONTARDO, D.P.; CASTRO, C.M.; NUNES, C.D.M.; BUCHWEITZ, E.D.; CORREA, B.O. Caracterização agrônômica de populações locais de azevém na região sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n. 12, p.2527-2533, 2010.
- MORAES, Y.J.B. Cultura do azevém (*Lolium multiflorum*). In: ASSOCIAÇÃO GABRIELENSE DE MELHORAMENTO E RENOVAÇÃO DE PASTAGENS, 1963, São Gabriel. **Anuário...** São Gabriel: Associação Gabrielense de Melhoramento e Renovação de Pastagens, 1963. p.18-21.
- MULLER J. Form and function in angiosperm pollen. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.66, n.4, p.593-632, 1979.
- NELSON, L.R.; PHILLIPS, T.D.; WATSON, C.E. Plant breeding for improved production in annual ryegrass: In: ROUQUETTE, F.M.; NELSON, L.R. **Ecology, production, and management of *Lolium* for forage in the USA**. Madison: Crop Science Society of America, 1997, v.3, p.1-14.
- OLIVEIRA, J.A.; LINDNER, R.; BREGU, R.; GARCÍA, A.; GONZA'LEZ, A. Genetic diversity of westerwold ryegrass landraces collected in Northwest Spain. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, [s.l], v.44, p.479-487, 1997.
- PAIVA, E.A.A. **Meiose em híbridos hexaploides de Capim-Elefante e Milheto**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. **Glossary of pollen and spore terminology**. 1999. Available in: <<http://www.biol.ruu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>>. Access em: 10 jan. 2009.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.10, n.2, p.151-157. 2004.

SILVA, P.A.K.X.M.; CALLEGARI-JACKES, S.; ZANETTINI, M.H.B. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lind. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.105-111, jan./fev. 2000.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera, e viabilidade polínica em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

TCACENCO, F.A. Comparação de cultivares de azevém anual em Lages, Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, p.157-163, 1989.

TECHIO, V.H.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; PEREIRA, A.V. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v.28, n.1, p.7-12, jan./mar. 2006.

TECHIO, V. H.; MITTELMANN, A.; MARCIÓ, S.; PEREIRA, A. V. Meiotic and mitotic behaviour of B chromosomes of ryegrass. **Ciência rural**, v. 40, p. 83-88, 2010.

TEJASWINI. Variability of pollen grain features: a plant strategy to maximize reproductive fitness in two species of *Dianthus*? **Sexual Plant Reproduction**, Oklahoma, v.14. p.347-353, 2002.

ZANOTTO, M.; BRAMMER, S.P.; NASCIMENTO JUNIOR, A.; SCAGLIUSI, S.M. Viabilidade polínica como seleção assistida no programa de melhoramento genético de *Triticale*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, Edição Especial, p.2078-2082, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não há evidências claras de quais mecanismos podem estar envolvidos na variação dos locos de rDNA 45S em *L. multiflorum*, nem mesmo o porquê da ocorrência de mais de um sítio em um mesmo cromossomo ou da marcação pela sonda de rDNA 45S de um número superior de cromossomos ao esperado. Uma alternativa para tentar elucidar essas questões seria a utilização de sequências de transposons do tipo *En/Spm* e de uma investigação de ocorrência de mecanismos epigenéticos por meio de sequências específicas, com o intuito de observar se esses mecanismos estão envolvidos na ocorrência da variabilidade de sítios de rDNA 45S em *Lolium*.

A natureza frágil dos sítios 45S e sua capacidade de gerar fragmentos cromossômicos precisam de estudos mais elaborados, pois se esses fragmentos, apresentarem atividade centromérica de modo a se tornarem cromossomos verdadeiros haverá um desbalanço cromossômico, exceto se as quebras/lesões ocorrerem em homologia, o que é pouco provável. Por outro lado, se tais fragmentos não apresentarem atividade centromérica, os mesmos poderão ser perdidos, gerando assim, instabilidade cromossômica e ou genética. Ambas as situações, podem ter reflexos sobre as taxas de fertilidade dos indivíduos, promovendo a repadronização dos cromossomos, aumentando ou diminuindo o número de sítios de rDNAs ou reposicionando-os, fortes indicadores de mudanças genômicas microevolutivas com possível papel na especiação.

As variações cromossômicas observadas impossibilitaram a identificação precisa dos cromossomos, inclusive a construção de mapas físicos, de modo que não foi possível afirmar se existem cromossomos mais propensos às quebras/lesões do que outros. Estudos futuros com a utilização de sondas teloméricas em técnicas de FISH e identificação da atividade neocentromérica

nos fragmentos por meio de imunolocalização poderão auxiliar na elucidação da possível origem de novos cromossomos. Nesse aspecto, também seria interessante avaliar se a meiose desses genótipos é normal para analisar o comportamento dos cromossomos que sofrem quebras e lesões e dos fragmentos gerados. Uma outra linha de investigação seria interessante para averiguar se os relatos da presença de cromossomos B em *Lolium* feito por diversos autores se confirmam ou se tratam-se na verdade de fragmentos decorrentes das quebras e que foram considerados como Bs.

Diante de toda a variabilidade relatada para o rDNA 45S recomenda-se que a utilização desse loco em estudos evolutivos, taxonômicos e para construção de mapas físicos dos cromossomos, pelo menos para *Lolium*, seja feita com precaução, uma vez que há descontinuidade na linhagem de rDNA na escala evolutiva e o mesmo parece não se caracterizar como um marcador espécie-específico e estável citogeneticamente.