



MARCO TULIO MENDES FERREIRA

**RELAÇÃO ENTRE AS METILAÇÕES DO DNA E DA
HISTONA H3 COM O COMPORTAMENTO DOS SÍTIOS DE
rDNA 45S EM CROMOSSOMOS E NÚCLEOS
INTERFÁSICOS
DE *Lolium* E *Festuca***

LAVRAS – MG

2017

MARCO TULIO MENDES FERREIRA

**RELAÇÃO ENTRE AS METILAÇÕES DO DNA E DA HISTONA H3 COM O
COMPORTAMENTO DOS SÍTIOS DE rDNA 45S EM CROMOSSOMOS E
NÚCLEOS INTERFÁSICOS
DE *Lolium* E *Festuca***

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

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Co-orientadora: Dra. Andréa Mittelmann

LAVRAS – MG

2017

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

Ferreira, Marco Tulio Mendes.

Relação entre as metilações do DNA e da histona H3 com o comportamento dos sítios de rDNA 45S em cromossomos e núcleos interfásicos de *Lolium* e *Festuca* / Marco Tulio Mendes Ferreira. - 2017.

64 p. : il.

Orientador(a): Vânia Helena Techio.

Coorientador(a): Andréa Mittelmann

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Epigenética. 2. Complexo Lolium-Festuca. 3. Sítios frágeis.
I. Techio, Vânia Helena . II. Mittelmann, Andréa . III. Título.

MARCO TULIO MENDES FERREIRA

**RELAÇÃO ENTRE AS METILAÇÕES DO DNA E DA HISTONA H3 COM O
COMPORTAMENTO DOS SÍTIOS DE rDNA 45S EM CROMOSSOMOS E
NÚCLEOS INTERFÁSICOS DE *Lolium E Festuca***

**RELATIONSHIP BETWEEN DNA METHYLATION AND HISTONE H3
METHYLATION WITH THE BEHAVIOR OF THE 45S rDNA SITES IN
CHROMOSOMES AND INTERPHASE NUCLEUS OF *Lolium AND Festuca***

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

APROVADA em 26 de janeiro de 2017

Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos - UFRGS

Dr. Welison Andrade Pereira - UFLA

Profa. Dra. Vânia Helena Techio
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

*Aos meus pais Maria Ermelinda e Wander pelo apoio, carinho, dedicação e amor.
Aos meus irmãos Matheus e Múcio que, por serem mais velhos, me ensinaram o primeiro e real
sentido de amizade. Me mostraram com suas experiências diferentes formas de viver.*

As minhas tias e tios sempre presentes.

Aos meus primos pela convivência.

À minha sobrinha Duda e afilhada Helena pelo amor inocente e verdadeiro.

A minha família.

À minha namorada Ana Luisa por estar sempre ao meu lado.

À todos os amigos que, presentes ou não, são parte da minha vida.

À todos aqueles que de certa forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao programa de Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof^a Vânia Helena Techio, por ter aceitado o desafio da orientação, pela dedicação, confiança e, acima de tudo, o amor pela profissão.

À Laiane pelo apoio incondicional, ensinamentos, troca de experiências, atenção e pelo exemplo de dedicação.

Agradeço aos alunos da Graduação, Isabela Martinez e Matheus Zanon pela força e dedicação diária.

Aos professores e funcionários do DBI e da UFLA.

À Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado e à Embrapa Recursos Genéticos pelos recursos, em especial à pesquisadora Andréa Mittelman pela co-orientação.

À todos os amigos e amigas do Laboratório de Citogenética que fizeram o ambiente de trabalho mais agradável, pelo apoio, força e troca de experiências. Agradeço especialmente aos técnicos Felipe Fogaroli e Iara Silva que, além da amizade, contribuíram de forma especial para a realização deste trabalho.

Agradeço às pessoas mais importantes da minha vida que são meus pais Maria Ermelinda e Wander. Pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim, por todos os ensinamentos, orações e por serem minha base. A vocês dedico todo o meu amor.

À esse Wander, vulgo bigode, meu pai, por todas as conversas no café-da-manhã e no café-da-tarde e por ser o homem que ele é. Espero um dia ser pelo menos 50% desse homem.

Aos meus irmãos Matheus e Múcio pelo cuidado, atenção e por todas as experiências trocadas ao longo desses anos.

À minha grande família. A minha avó Eny pelas orações e preocupações de sempre. As minhas tias Miriam, Magda e Marisa por representarem o lado mais engraçado e o motivo pelo qual essa família é como é. Aos meus primos e primas. Por fim, em especial agradeço a meu avô Tide (in memoriam) por todos os domingos que passei a seu lado, por todas as risadas e possíveis beijos roubados durante o meu sono.

À minha namorada Ana Luisa, por compartilhar meus anseios e por ajudar a superá-los, por estar ao meu lado, por entender e aceitar minha dedicação ao que almejo, pelo amor dedicado, sorrisos, carinhos e sinceridade.

À todos os amigos e amigas de Lavras. Eles sabem...

A professora Eliane Kaltchuk e ao professor Welison Pereira por aceitarem o convite de participar da banca.

À sociedade por me possibilitar a oportunidade de estudo em uma Universidade Pública.

A todos que fizeram ou fazem parte da minha vida, meus sinceros agradecimentos.

Há homens que lutam um dia e são bons, há outros que lutam um ano e são melhores, há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida e estes são imprescindíveis.

Bertolt Brecht

RESUMO

As gramíneas pertencentes ao complexo *Lolium-Festuca* apresentam papel de destaque no cenário agropecuário brasileiro, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Elas são mundialmente conhecidas por suprir o déficit forrageiro característico do período de inverno nos países de clima temperado. Por estes e outros motivos, os estudos citogenéticos para as espécies foram impulsionados. Vários são os trabalhos que evidenciaram uma plasticidade do comportamento dos sítios de rDNA 45S, por exemplo, na variação do número e posição dos sítios, relacionados até pouco tempo à possível fragilidade dos loci que, consequentemente, justificava a presença de sítios estendidos e gaps nas metáfases. Essa organização estendida das regiões organizadoras do nucléolo pode ser avaliada em relação a sua atividade/acessibilidade transcricional por meio das alterações epigenéticas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da metilação nas citosinas (5-mCyt), diretamente relacionada ao silenciamento gênico, e da dimetilação da lisina 9 na histona H3 (H3K9me2), associada a estrutura heterocromática, nas diferentes conformações dos sítios de rDNA 45S, nos núcleos interfásicos e nos cromossomos metafásicos de dois genótipos de cada espécie de *Lolium perenne*, *L. multiflorum* e *Festuca arundinacea*. As técnicas de imunomarcacão foram realizadas em combinaçãõ com a FISH (hibridizaçãõ *in situ* fluorescente) para a localizaçãõ dos sítios de rDNA. As lâminas foram feitas com células meristemáticas pré-tratadas e não pré-tratadas a -4 °C, fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético, 3:1 v/v) e a imunodeteccãõ, realizada de forma indireta, via anticorpo primário anti-H3K9me2 *rabbit* policlonal e anti-5-metil-citosina *mouse* monoclonal. Estes foram detectados com anticorpo secundário anti-*rabbit* FITC-conjugado e *mouse* FITC-conjugado. A FISH foi realizada sequencialmente à imunomarcacão, utilizando sondas de rDNA 45S obtidas de *Triticum aestivum* L. (pTa 71). A partir da combinaçãõ destas duas técnicas pôde-se perceber uma relaçãõ direta entre as marcas epigenéticas e as diferentes conformações das RONS. Nos núcleos interfásicos foram observados predominantemente sítios intra e perinucleolares que, em sua maioria, estavam hipometilados e/ou hiper/hipometilados, descondensados ou parcialmente condensados. Os sítios extranucleolares apresentaram-se predominantemente hipermetilados para ambas as marcas epigenéticas e, consequentemente, eram vistos na forma de blocos condensados heterocromáticos. Nas metáfases foram evidenciados sítios hipermetilados, hipometilados e não metilados. Os sítios de rDNA 45S com gaps identificados nas metáfases estavam sempre hipometilados ou não metilados para H3K9 e também para 5-mCyt, o que justifica o estado descondensado e apto a transcrever. A frequência de sítios com gaps hipermetilados foi muito baixa. Assim, as diferenças estruturais visualizadas nestes sítios nas três espécies estudadas estão relacionadas diretamente com as marcas epigenéticas analisadas, justificando as diferentes conformações nos núcleos interfásicos e ao longo do ciclo celular.

Palavras-chave: Epigenética; Complexo *Lolium-Festuca*; H3K9m2; 5-mCyt; Sítios frágeis.

ABSTRACT

The grasses belonging to the *Lolium-Festuca* complex present a prominent role in the Brazilian agricultural scenery, mainly in the South and Southeast regions. They are known worldwide for supplying the forage deficit characteristic of winter in temperate countries. For these and other reasons, the cytogenetic studies for the species were stimulated. Several studies have demonstrated a plasticity of the 45S rDNA sites behavior, for example, variation in the number and position of the sites related the possible fragility of the loci, that, consequently, justified the presence of extended sites and gaps in the metaphases. This extended organization of the nucleolar organizing regions (NORs) can be evaluated in relation to its transcriptional activity/accessibility through epigenetic changes. Therefore, the objective of this study was to evaluate the influence of methylation on cytosine (5-mCyt), directly related to gene silencing, and the dimethylation of lysine 9 in histone H3 (H3K9me2), associated with heterochromatic structure, in the different conformations of the rDNA 45S sites, in the interphase nuclei and metaphase chromosomes of two genotypes of each species of *Lolium perenne*, *L. multiflorum* and *Festuca arundinacea*. Immunostaining techniques were performed in combination with FISH (fluorescent in situ hybridization) for the localization of the rDNA sites. The slides were made with pretreated and unpretreated meristemac cells, fixed in Carnoy (ethanol: acetic acid, 3: 1 v / v) and indirect immunodetection with the primary antibodies anti-H3K9me2 rabbit polyclonal and anti-5-methyl cytosine mouse monoclonal. The detection was done using secondary antibodies anti-rabbit FITC-conjugated and anti-mouse FITC-conjugated. FISH Technique was performed sequentially on immunostaining using 45S rDNA probes obtained from *Triticum aestivum* L. (pTa 71). From the combination of these two techniques it was possible to perceive a direct relation between the epigenetic marks and the different conformations of the NORs. In the interphase nuclei, predominantly intra and perinucleolar sites were observed, which were mostly hypomethylated and/or hyper/hypomethylated, decondensed or partially condensed. The extranuclear sites were predominantly hypermethylated for both epigenetic marks and, consequently, were seen in the form of heterochromatic condensed blocks. Hypermethylated, hypomethylated and non-methylated sites were evidenced in the metaphases. The 45S rDNA sites with gaps identified in the metaphases were always hypomethylated or unmethylated for H3K9 and also for 5-mCyt, which justifies the decondensed and able to the transcription. The frequency of sites with hypermethylated gaps was very low. Thus, the structural differences visualized in these sites in the three species studied are directly related to the analyzed epigenetic marks, justifying the different conformations in the interphase nuclei and throughout the cell cycle.

Keywords: Epigenetics; *Lolium-Festuca* complex; H3K9me2; 5-mCyt; Fragile sites.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1	Os gêneros <i>Lolium</i> e <i>Festuca</i> : caracterização geral	4
2.2	Citogenética e Sítios Frágeis nos Cromossomos do Complexo <i>Lolium-Festuca</i>	5
2.3	Modificações da cromatina e o estudo da expressão dos sítios de rDNA 45S	8
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Local	14
3.2	Material vegetal	14
3.3	Obtenção de meristemas e metáfases mitóticas	14
3.4	Imunolocalização da metilação do DNA (5-metil citosina – 5-mCyt).....	15
3.5	Imunolocalização da histona modificada – H3K9me2.....	15
3.6	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	16
3.7	Identificação dos nucléolos	17
4	RESULTADOS	18
4.1	Caracterização do status de metilação do DNA e da dimetilação H3K9 em sítios de rDNA 45S em núcleos interfásicos.....	20
4.2	Caracterização do status de metilação do DNA e da dimetilação da H3K9 em sítios de rDNA 45S em cromossomos metafásicos	25
5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43
	FIGURA SUPLEMENTAR	54

1 INTRODUÇÃO

As gramíneas, integrantes da família Poaceae, são as principais representantes das forragens e, portanto, são bastante empregadas para suprir a demanda alimentar dos rebanhos. O cultivo das forrageiras, por esses e outros motivos, apresenta papel de grande importância no cenário agropecuário brasileiro. O último Censo Agropecuário estimou que existem no Brasil aproximadamente 170 milhões de hectares de pastagens: 100 milhões são cultivadas e 70 milhões de ocorrência natural (IBGE, 2006). Destes, destaca-se o grupo de espécies pertencentes ao complexo *Lolium-Festuca* por incluir as gramíneas de inverno, importantes para o desenvolvimento da pecuária nas regiões Sul e Sudeste do país.

Lolium é composto por oito espécies diploides naturais ($2n=2x=14$), dentre as quais se destacam *L. perenne* L. (azevém perene) e *L. multiflorum* Lam. (azevém anual) pela importância econômica. *Lolium multiflorum*, de acordo com Carvalho e colaboradores (2010), pode ser considerada a forrageira mais importante para a região Sul do Brasil devido a seu alto valor nutritivo, alta capacidade de ressemeadura e fácil estabelecimento. *Lolium perenne*, por sua vez, praticamente não é utilizado como alimento para os rebanhos no Brasil (CARVALHO et al., 2010), porém sua produção é destacada na Europa e nos Estados Unidos. Este é, normalmente, cultivado em associação com espécies de *Festuca* (THOROGOOD, 2003).

Festuca apresenta ampla distribuição geográfica e um vasto número de espécies (MALIK; THOMAS, 1966; CLAYTON; RENVOIZE, 1986), destacando-se entre elas *F. arundinacea* Schreb. ($2n=6x=42$) e *F. pratensis* Huds. ($2n=2x=14$), por serem as mais cultivadas nos EUA. *Festuca arundinacea*, de acordo com Oliveira, Dutra e Moraes (2001), nas condições climáticas do Rio Grande do Sul, é a forrageira perene de maior persistência, produção e menor período de dormência.

A semelhança entre esses dois gêneros não se restringe apenas à importância como forrageiras, mas, sobretudo, por serem proximamente relacionados (MALIK; THOMAS, 1966). Esta proximidade genética permitiu a formação de um híbrido, o *Festulolium*, que reúne características de interesse para os programas de melhoramento (DINELLI et al., 2004). A análise citogenética dos híbridos tem despertado interesse, pois os cromossomos paternos se recombinam livremente (KOPECKÝ et al., 2008). O seu estudo constituiu um marco da aplicação das técnicas de hibridização *in situ* genômica (GISH) e de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que possibilitaram um melhor entendimento sobre a estrutura dos

cromossomos, comportamento, origem e a relação de parentesco entre elas (THOMAS et al., 1994; KSIĄŻCZYK et al., 2014), sendo usadas como modelo para muitos grupos de gramíneas, tais como, *Brachypodium* (WOLNY; HASTEROK, 2009), *Pennisetum* (REIS et al., 2014) e *Brachiaria* (PAULA et al., 2016).

A técnica de FISH utilizando sondas de rDNA 45S, evidenciou de seis a oito sinais em *L. multiflorum* (THOMAS et al., 1996; BUSTAMANTE et al., 2014) e cinco, seis e sete em *L. perenne* (THOMAS et al., 1996; KSIĄŻCZYK et al., 2010; ROCHA et al., 2016). *Festuca arundinacea*, apresenta menor número de sinais (quatro), mas maior variação cariotípica (THOMAS et al., 1997; MALIK; THOMAS, 1966), relacionada à poliploidia. Distintos rearranjos no padrão de distribuição dos sítios rDNA 45S são comuns entre espécies representantes destes dois gêneros (THOMAS et al., 1996, 1997, 2001; HARPER et al., 2004) e entre indivíduos da mesma espécie (KSIĄŻCZYK et al., 2010; HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2012; THOMAS et al., 2001; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

Huang et al. (2008) evidenciaram, por meio de FISH 45S, que uma das causas da variação no número de sinais era a formação de quebras e lesões nos cromossomos, exclusivamente nessas regiões que, geralmente, levavam à formação de fragmentos. Devido a esses eventos, os autores concluíram que esses sítios poderiam ser considerados sítios frágeis (SFs), já amplamente estudados em humanos (YUNIS; SORENG, 1984; DENISON et al., 2003), outros animais (RUIZ-HERRERA et al., 2004; SINGH; BARMAN, 2013) e em leveduras (RAVEENDRANATHAN et al., 2006; LEMOINE et al., 2005).

Em *L. perenne*, Huang e colaboradores (2009), associando a FISH 45S com análises em microscópio de força atômica (MFA) e deconvolução, demonstraram que alguns cromossomos que manifestavam o SF, mantinham uma fibra de DNA conectando o cromossomo a seu fragmento. Esse comportamento também foi confirmado por Rocha et al. (2015) e Bustamante et al. (2014) em genótipos diploides e poliploides de *L. perenne* e *L. multiflorum*, respectivamente.

Nessas espécies, foi observado que os SFs são positivos para marcação com cromomicina A3 (CMA) e podem ou não estar associados às bandas Ag- NOR (HUANG et al., 2012; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015). Em *L. perenne*, por exemplo, os sítios intactos mostraram pouca ou nenhuma marcação com o nitrato de prata e não houve a confirmação do número de bandas Ag-NOR com as marcações para FISH rDNA 45S, o que

pode indicar que nem todos os sítios se encontraram transcricionalmente ativos (HUANG et al., 2012). Nos casos de gaps ou quebras, que dividem o sítio em duas partes, foi observado que, muitas vezes, uma porção do sítio estava ativa e a outra, inativa. A variação no número de bandas Ag-NOR e no tamanho dos nucléolos também foi evidenciado, o que pode ser explicado pela expressão diferencial dos SFs que interferem na organização dos nucléolos e na inativação dos sítios de rDNA 45S (BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015).

Até então os SFs de rDNA 45S em *Lolium* eram tratados como regiões instáveis e aptas a formar lesões e quebras que poderiam estar associadas à instabilidade do cariótipo (HUANG et al., 2008; 2009; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015). Entretanto, Rocha et al. (2016) confirmaram que os SFs são resultantes da descondensação do DNA nos sítios de rDNA 45S em espécies de *Lolium*, *Festuca* e em *Festulolium*, e que sua ocorrência não promove a instabilidade no cariótipo.

Essa organização distendida do DNA, presente nos SFs mesmo em cromossomos metafásicos, pode ser avaliada em relação a sua atividade/acessibilidade transcricional por meio de alterações epigenéticas como metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas, tais como acetilação e metilação, que podem estar diretamente envolvidas na expressão/organização dos SFs, como observado em cromossomos humanos (COFFEE et al., 2002; WANG, 2006). As histonas, outras proteínas não histonas e alterações epigenéticas podem manter ou reestruturar a fibra de DNA que conecta o cromossomo ao presumível fragmento ou ainda reverter o estado de descondensação dos SFs (HUANG et al., 2008; 2009).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da metilação nas citosinas (5-mCyt), diretamente relacionada ao silenciamento gênico, e da dimetilação da lisina 9 na histona H3 (H3K9me2), associada a estrutura heterocromática, nas diferentes conformações dos sítios de rDNA 45S, nos núcleos interfásicos e nos cromossomos metafásicos de dois genótipos de cada espécie de *Lolium perenne*, *L. multiflorum* e *Festuca arundinacea*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os gêneros *Lolium* e *Festuca*: caracterização geral

Lolium e *Festuca* são gêneros representantes da família Poaceae, pertencentes à subfamília Pooideae e da tribo Poeae (JAUHAR, 1993). *Lolium* é um gênero pequeno, apresentando oito espécies diploides naturais com $2n=2x=14$ (CLAYTON; RENVOIZE, 1986) e algumas cultivares poliploides obtidas a partir da duplicação cromossômica induzida (POLOK, 2007; PEREIRA et al., 2014). Segundo Terrel (1968), as espécies pertencentes a esse gênero são distribuídas em dois grupos classificados de acordo com o modo de reprodução. O primeiro grupo inclui quatro espécies autógamas: *Lolium loliaceum*, *Lolium persicum*, *Lolium remotum* e *Lolium temulentum*. O segundo abrange as representantes alógamas: *Lolium perenne*, *Lolium rigidum* e *Lolium multiflorum* (LOOS, 1993; JAUHAR, 2012). Além desses dois grupos, *Lolium canariense* apresenta reprodução intermediária (porcentagem de reprodução cruzada entre 5 e 95%) (POLOK, 2007).

As mais importantes destas espécies de *Lolium*, também conhecidas como azevéns, são o azevém anual ou italiano (*L. multiflorum*) e o azevém perene (*L. perenne*) (JAUHAR, 2012). Estas duas espécies são mundialmente conhecidas por serem capazes de suprir o déficit forrageiro característico do período de inverno nos países de clima temperado (POLOK, 2007). Por apresentarem um alto teor proteico durante o período vegetativo, são amplamente utilizadas como alimento alternativo na bovinocultura em regiões que sofrem com os efeitos negativos causados pelo inverno nas forrageiras nativas (YAMADA et al., 2005).

O gênero *Festuca*, por sua vez, é um grupo maior. Ele apresenta aproximadamente 450 espécies (CLAYTON; RENVOIZE, 1986), que variam desde representantes diploides ($2n=2x=14$) a dodecaploides com $2n=12x=84$ (*F. summilusitana*) (ŠMARDA; STANČÍK, 2006; KOPECKÝ et al., 2008). Dentre todas essas, Jauhar (2012) considera *F. arundinacea* e *F. pratensis* como as mais importantes para a agricultura devido a tolerância à seca e ao estresse fisiológico causado por invernos rigorosos.

A proximidade entre os gêneros *Lolium* e *Festuca*, tanto morfológica quanto genômica, e a grande homeologia cromossômica entre algumas espécies (BULINSKA-RADOMSKA; LESTER, 1988; KSIAŻCZYK et al., 2014) possibilitou a formação de vários híbridos envolvendo principalmente o cruzamento entre *L. multiflorum* (4x) e *F. pratensis*

(4x), *L. multiflorum* (2x) e *F. arundinacea* (6x) e *L. perenne* (2x) com *F. pratensis* (2x), os quais são genericamente denominados Festulolium (KOPECKÝ et al., 2008). Tal fato levou os pesquisadores a concluírem que as espécies poderiam possuir origem monofilética (DARBYSHIRE, 1993; WIESNER et al., 1995). A partir dos cruzamentos, os programas de melhoramento de plantas passaram a utilizar o híbrido Festulolium, pois ele reúne características importantes de ambos os gêneros: a alta produção de forragem do *Lolium* e a resistência ao estresse ambiental da *Festuca* (DINELLI et al., 2004). A habilidade para produzir híbridos interespecíficos entre *Lolium* e *Festuca* e o sucesso comercial do Festulolium estimulou novas pesquisas sobre comportamento e estrutura desses genomas. Tais estudos revelaram a plasticidade dos genomas dos híbridos, principalmente em relação ao processo de recombinação e pareamento dos cromossomos homeólogos (KOPECKÝ et al., 2008).

2.2 Citogenética e Sítios Frágeis nos Cromossomos do Complexo *Lolium-Festuca*

Dentre os trabalhos citológicos desenvolvidos até a década de 90, destaca-se o trabalho de Malik e Thomas (1966) por ter sido pioneiro na apresentação do cariótipo de espécies do complexo *Lolium-Festuca*. No gênero *Lolium*, tanto para *L. perenne* quanto para *L. multiflorum*, foram descritos três pares de cromossomos submetacêntricos com constrições secundárias (regiões organizadoras do nucléolo – RONS). Além destes, foi identificado um par metacêntrico (maior em relação aos outros pares) e três pares menores (submetacêntricos) (MALIK; THOMAS, 1966). Rocha et al. (2015) relataram que *L. perenne* cv. Ellet apresenta sete cromossomos com sinais para rDNA 45S colocalizados com bandas CMA⁺. Nestes os sinais estão presentes no braço longo em homozigose nos pares 2, 3 e 5 e em hemizigose no par 1.

Malik e Thomas (1966) mostraram que *Festuca* apresenta uma maior variação cariotípica. *Festuca pratensis* apresenta quatro pares de cromossomos com constrições secundárias. Os sítios de rDNA 45S foram contabilizados nas cultivares diploides e autotetraploides dessa espécie por Książczyk et al. (2010). Em todos os acessos diploides foram encontrados dois sinais de rDNA 45S no par cromossômico 2, na constrição secundária. A cultivar autotetraploide apresentava quatro sinais de rDNA 45S nos quatro homólogos do cromossomo 2, também localizados na constrição secundária (KŚIAŻCZYK et al., 2010). Para algumas cultivares de *F. arundinacea* foram descritos até seis pares de

construções secundárias e um número menor de RONS, as quais foram detectadas por meio da coloração com nitrato de prata (Carnide et al., 1986) e usando FISH com sonda de rDNA 45S (THOMAS et al., 1997). Nessa espécie, existem dois pares de cromossomos com sítio de rDNA 45S, sendo que um par apresenta o sinal FISH 45S em posição intersticial, enquanto que no outro par, o sítio se encontra em posição terminal (THOMAS et al., 1997).

As regiões de rDNA 45S são consideradas geneticamente dinâmicas (HUANG et al., 2012; DVOŘÁČKOVÁ; FOJTOVÁ; JAFKUS, 2015), cuja consequência se reflete em um número variável de sinais FISH e diferentes distribuições destas em espécies proximalmente relacionadas. Em *L. multiflorum* foram observados seis a oito sítios de rDNA 45S (BUSTAMANTE et al., 2014) e cinco a sete sítios de rDNA 45S em *L. perenne* (KSIAŹCZYK et al., 2010). Em ambas as espécies eles estavam localizados na região intersticial do cromossomo. O sítio de rDNA 5S nessas espécies foi encontrado no braço curto do cromossomo em sintenia com um dos sítios de rDNA 45S, o qual está localizado no braço longo (THOMAS et al., 1996; BUSTAMANTE et al., 2014), mais especificamente no par três dos cromossomos de *L. perenne* (ROCHA et al., 2015). Devido a dinâmica dos sítios de rDNA 45S, variações podem ocorrer até mesmo dentro da mesma espécie, como relatado por Thomas et al. (2001) em *Lolium rigidum*. Esses autores, não observaram duas plantas com o mesmo padrão de distribuição dos sítios de rDNA 45S, havendo diferenças inclusive dentro do meristema de uma mesma raiz.

Uma ampla variação no número e posição dos sítios de rDNA 45S em *L. perenne* foi evidenciada no trabalho de Huang et al. (2008) que também constataram que as metáfases apresentavam número cromossômico maior do que o esperado, variando de 14 a 20. Dentre as 119 metáfases analisadas, 18 exibiam número normal -14- de cromossomos (15%), enquanto que metáfases com 15, 16, 17, 18, 19 e 20 ocorreram na maioria das células (85%). Ao aplicar a técnica de FISH utilizando sondas para rDNA 45S, os autores propuseram que quebras ocorriam dentro destes sítios e promoviam uma contagem cromossômica errônea, devido a presença de fragmentos cromossômicos decorrentes das quebras nos sítios de rDNA 45S. Isso foi corroborado ao constatarem que em células sem lesões ou quebras nas regiões de rDNA 45S, o número de cromossomos nas metáfases foi sempre 14 (HUANG et al., 2008). Para os autores, nas células que apresentaram mais de 14 cromossomos era possível observar lesões ou quebras que ocorriam em uma ou em ambas as cromátides irmãs. No segundo caso, o sinal estava dividido em dois, formando marcações terminais no cromossomo em si e no fragmento

cromossômico que foi gerado. A essa característica citológica, os autores definiram também como sítios frágeis (SFs) (HUANG et al., 2008), assim como descrito em cromossomos humanos.

Em cromossomos humanos, os SFs são considerados locais especialmente aptos a formar lesões não coradas, constrições ou quebras em uma ou ambas as cromátides em cromossomos metafásicos, que ocorrem espontaneamente devido a sua replicação tardia ou ainda devido à inibição parcial da síntese do DNA (RICHARDS, 2001; GLOVER, 2006). Além da sua ocorrência em mais de 120 regiões nos cromossomos humanos (BÜTTEL; FECHTER; SCHWAB, 2004), os SFs também foram relatados em macaco, peixe (RUIZ-HERRERA et al., 2004; SINGH; BARMAN, 2013) e em levedura (RAVEENDRANATHAN et al., 2006; LEMOINE et al., 2005).

Bustamante et al. (2014) e Rocha et al. (2015) caracterizaram os SFs espontâneos em acessos diploides e tetraploides de *L. multiflorum* e *L. perenne*, respectivamente. A caracterização se deu em cromossomos intactos, cromossomos com gaps e cromossomos com quebras. Nos intactos, apenas um sinal de rDNA 45S foi visualizado. Nos cromossomos com quebras ou gaps, o sinal ocorreu em apenas um dos lados ou em ambos na lesão, variando na intensidade e no tamanho do sinal.

Posterior a 2008, utilizando o microscópio de força atômica (MFA) e deconvolução, Huang et al. (2009) detectaram uma fina fibra de DNA conectando uma ou ambas as cromátides de alguns cromossomos com seu fragmento, originado pela manifestação do SF de rDNA 45S em *L. perenne*. Foi constatado nesse trabalho que a fibra de DNA que conecta o cromossomo e seu fragmento possui aproximadamente 60 nm, porém essa espessura não é uniforme ao longo da mesma. Tal variação pode indicar que a cromatina nesse local possivelmente apresenta diferentes graus de condensação. Ainda para esses autores, falhas na maquinaria de condensação da cromatina nas regiões de rDNA 45S são responsáveis pela expressão dos SFs. Bustamante et al. (2014), utilizando sondas de rDNA 45S em microscopia de fluorescência, também observaram que alguns cromossomos de *L. multiflorum* com SF apresentavam essa fibra de DNA.

No trabalho de Rocha et al. (2016) com *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* e *Festuca arundinacea*, por meio de FISH utilizando sondas de rDNA 45S e marcação do tipo YOYO, a fibra de DNA foi visualizada em algumas metáfases conectando todos os ditos “fragmentos” ao cromossomo de origem. Tal constatação permitiu que os autores concluíssem que os sítios

de rDNA 45S em *Lolium*, *F. arundinacea* e nos híbridos *Festulolium* não são instáveis e, portanto, não trazem instabilidade cariotípica. A estabilidade foi confirmada, uma vez que não foram observadas alterações significativas do conteúdo de DNA constatado pela citometria de fluxo e pela ausência de micronúcleos, indicando que o material genético não estava sendo eliminado. Ainda de acordo com Rocha et al. (2016), os SFs não resultam em mudanças nos cariótipos, pois os sítios estendidos de rDNA 45S são, possivelmente, recondensados durante as fases subsequentes do ciclo celular.

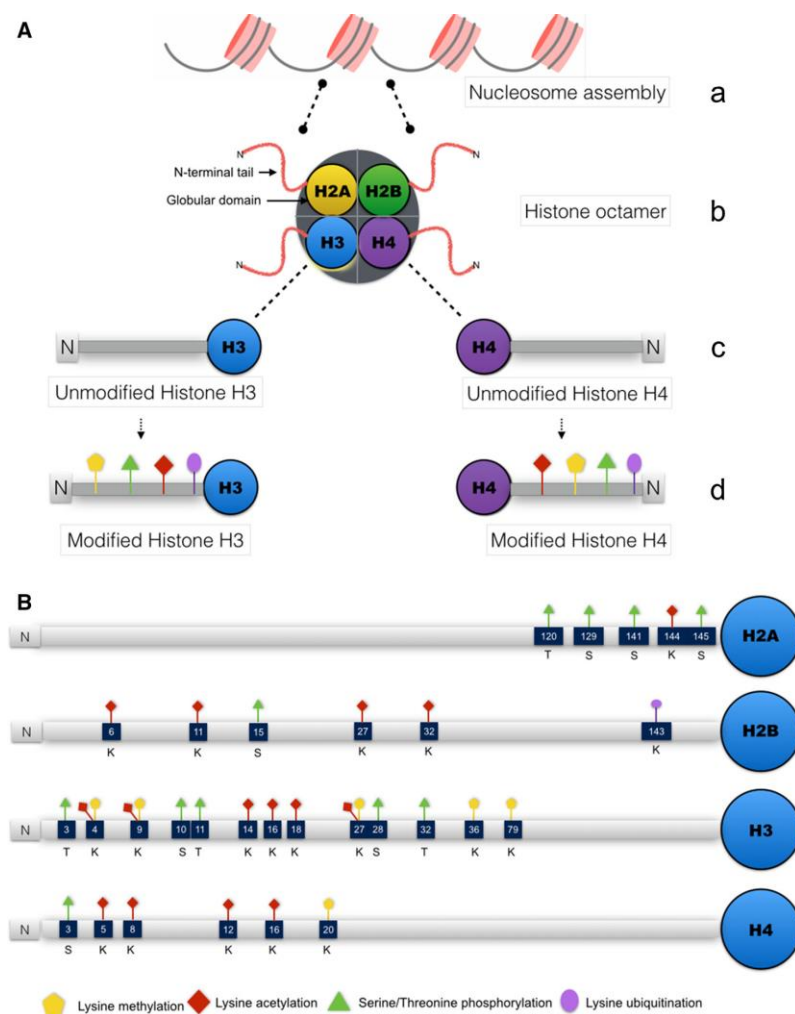
Durante o processo de condensação do DNA proteínas histônicas e não histônicas podem ajudar a manter o fragmento conectado ao cromossomo ou ainda modificações epigenéticas podem interferir no grau de condensação da cromatina das sequências de rDNA 45S, resultando na manifestação dos SFs (HUANG et al., 2008; 2009; ROCHA et al., 2015). As fibras de cromatina descondensadas podem formar uma conformação aberta e susceptível a eventos de alta eficiência transcricional, como descrito por Chambeyron e Bickmore (2004). Tal eficiência pode ser averiguada por meio do uso de técnicas de imunolocalização para marcação de histonas e metilação do DNA, no qual pode-se constatar diferentes estados da cromatina, evidenciando atividade ou inatividade gênica (JIN et al., 2008).

2.3 Modificações da cromatina e o estudo da expressão dos sítios de rDNA 45S

No núcleo das células eucariotas, a fita de DNA está associada a octâmeros de histonas formando os nucleossomos, que posteriormente, em um grau mais avançado de condensação, formará a cromatina e os cromossomos. Esse empacotamento da molécula de DNA pode ser considerado uma importante aquisição evolutiva por permitir que as células eucariotas acomodem cadeias mais longas de DNA (ZHANG, 2012). Nesse processo de condensação cromatídica, a molécula de DNA e as histonas podem sofrer certas modificações, alterando as propriedades da cromatina e, como consequência, de todos os processos que ela está submetida, por exemplo, na regulação e expressão de determinados genes (ZHANG, 2012). Para Zhang (2012), os processos que afetam a estrutura da cromatina podem ser divididos em dois grupos. O primeiro é aquele que altera a estrutura da molécula de DNA (metilação do carbono 5 do anel de citosina) e o segundo altera os resíduos de aminoácidos das caudas das histonas (H2A, H2B, H3 e H4) por meio de metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, deaminação e isomerização de prolina (FIGURA 1) (SHARMA, et al., 2015; ZHANG, 2012; CHEN et al., 2010; KOUZARIDES, 2007). Todas

estas modificações são chamadas de epigenéticas e podem afetar a expressão do gene na meiose ou na mitose, sem alterar a sequência do DNA (ZHANG, 2012; HOUBEN et al., 2007; FUCHS et al., 2006; LEWIN, 2004). Houben et al. (2007) consideram as histonas como superfícies complexas de interações proteína-proteína reguladas por diversas modificações pós-traducionais como as ditas anteriormente. Elas controlam epigeneticamente a regulação de genes ao alterar a configuração da cromatina no decorrer dos ciclos celulares (ZHANG, 2012).

Figura 1 – Representação organizacional da cromatina e histonas modificadas.



Legenda: Diagrama A representando a cromatina organizada com histonas modificadas. (a) típico nucleossomo formado pela fita de DNA e histonas. (b) octâmero de histona que se apresenta em pares formados pelos 4 tipos de proteínas histônicas (H2A, H2B, H3 e H4); cauda N-terminal formada por resíduos de aminoácidos nas possíveis posições sujeitas as modificações pós-traducionais como a metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação. (c) Cauda N-terminal da histona H3 e H4 sem modificações. (d) Histonas H3 e H4 modificadas. Diagrama B apresenta as posições das caudas N-terminais das histonas das plantas aptas a sofrer modificações pós-traducionais como a metilação,

acetilação, fosforilação e ubiquitinação. Fonte: SHARMA et al., 2015.

O controle epigenético sobre a regulação gênica pode acontecer por meio de alguns mecanismos (ALLIS et al., 2007). Todos eles levam à alteração da estrutura da cromatina, influenciando as interações histona-DNA e histona-histona (SHARMA et al., 2015). De acordo com Allis et al. (2007), os mecanismos que alteram as propriedades da cromatina, por meio das modificações pós-traducionais das histonas (HPTMs), podem acontecer de forma direta ao afetar a acessibilidade à cromatina ou as HPTMs podem interferir na ligação de moléculas efetoras, impedindo a associação de proteínas com a cromatina e com a histona.

As modificações das histonas (COSTA; PACHECO, 2013) e a metilação do DNA (GEHRING; HENIKOFF, 2007) levam a cromatina à uma conformação tanto de eucromatina como de heterocromatina. Em ambos os casos, para que a fibra do DNA assuma determinado grau de empacotamento um complexo enzimático precisa ser recrutado para que a dinâmica da cromatina sofra alteração (ALLIS et al., 2007).

A metilação do DNA normalmente está associada ao silenciamento gênico. Nesse processo, a enzima DNA metiltransferase adiciona um grupo metil (-CH₃) no carbono 5 do anel da citosina. Esta é a modificação mais comum do DNA dentro dos organismos eucariotos, chegando a abranger cerca de 3 a 8% das citosinas nos vertebrados e de 6 a 30% nas plantas (CHEN; LI, 2004). Nas plantas com flores existem três caminhos para a metilação do DNA: sequências CG, CHG e CHH (em que H pode aparecer com A, C ou T). Para cada uma das três sequências é necessário sinal específico com a interação de parceiros proteicos também diferentes (ZHANG, 2012). De acordo com Finnegan et al. (1996, 1998), a metilação do DNA está envolvida em vários processos nas plantas superiores, incluindo a regulação e expressão de genes durante seu desenvolvimento e na organização da cromatina. A hipermetilação dos dinucleotídeos CG leva a perda da expressão do gene (LUCZAK; JAGODZINSKI, 2006), enquanto que a hipometilação dos mesmos dinucleotídeos está normalmente associada com o aumento da expressão gênica em animais (LIDDLE; JIRTLE, 2006).

A metilação das histonas ocorre na cauda de aminoácidos, preferencialmente, na lisina e arginina. Tal processo está relacionado com silenciamento gênico, mas também pode representar marcas de ativação no DNA. Em plantas modelo, por exemplo *Arabidopsis*, quatro lisinas são metiladas, todas elas localizadas na H3, especificamente na H3K4, H3K9, H3K27 e H3K36 (JOHNSON et al., 2004). A metilação desse aminoácido presente na cauda N-terminal da H3 pode ser mono, di ou trimetilada, sendo que a dimetilação da lisina 9 na

histona H3, de acordo com Zhang (2012), é uma marca de silenciamento heterocromático. Fuchs et al. (2006) apontam que muitas das modificações que são marcas das histonas são características de eucromatina (H3K4me2) e outras de heterocromatina (H3K9me1-2, H3K27me1 e H4K20me1).

A acetilação das histonas ocorre pela adição do grupo acetil aos aminoácidos presentes na cauda N-terminal. Isso acontece, principalmente, na lisina que é a modificação que apresenta maior potencial para descondensar a cromatina, tornando o DNA mais acessível aos fatores de transcrição (JASENCAKOVA et al., 2000, 2003; KOUZARIDES, 2007).

Zhang (2012) afirma que as regiões genômicas com diferentes padrões de expressão – ativamente transcritas ou silenciadas – estão associadas com diferentes combinações de modificações epigenéticas, muitas vezes relacionadas a condensação da cromatina, que facilitam ou impedem a ligação de fatores de transcrição específicos a determinados genes. Um exemplo desse processo ocorre nas regiões de rDNA 45S em plantas. Estes são sítios que quando transcritos e processados codificam os rRNA 18S, 5.8S, 28S que formam as subunidades ribossômicas 40S e 60S, juntamente com os transcritos do rDNA 5S, nos organismos eucariotos. Estas subunidades associadas com proteínas ribossomais dão origem aos ribossomos (LEWIN, 2004). Os genes rDNA 45S se encontram altamente repetidos nesses sítios e, portanto, precisam de estratégias para sua regulação. Dentre elas destaca-se o ajuste do número de genes rDNA ativos por meio do controle da atividade da RNA polimerase I, a partir da alteração do grau de transcrição de cada gene ou ajustando o número dos que estão envolvidos no processo. A atividade epigenética influenciada, por exemplo, por fatores externos, atua diretamente na funcionalidade dos fatores de transcrição, aumentando a complexidade do controle da regulação gênica (MCSTAY; GRUMMT, 2008).

Heitz foi o primeiro pesquisador a relacionar a região de rDNA 45S com a estrutura nucleolar (1931, apud SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). Anos mais tarde, McClintock (1934) denominou essas regiões de “organizadoras do nucléolo” e as definiu como regiões específicas do cromossomo responsáveis pela formação do nucléolo na intérfase.

Os genes ribossomais são transcritos pela RNA polimerase I (Pol I) formando duas estruturas que são encontradas em qualquer nucléolo, o componente fibrilar denso (DFC) e o componente granular (GC). No DFC estão os pré-rRNAs recém-sintetizados e várias proteínas. No GC estão partículas pré-ribossomais quase completas que serão destinadas para

o citoplasma. Um terceiro componente, o centro fibrilar (FC), é encontrado no nucléolo de quase todos os metazoários, com exceção de alguns eucariotos inferiores. Este componente, quando presente, está cercado pelo DFC e é na fronteira entre os dois que se dá a transcrição múltipla dos genes de pre-rRNA (OLSON; DUNDR; SZE BENI, 2000). A biogênese do rRNA envolve uma série de reações e processos pós transcricionais que culminam com a formação e maturação das subpartículas ribossomais 18S, 5.8S e 28S. Uma quarta partícula, o rDNA 5S, é formada a partir da transcrição, pela RNA polimerase III, de sequências também em tandem localizadas fora das RONS. Esta, quando processada, é transportada para o interior do nucléolo onde em associação com as outras partícula formam as subunidades ribossomais que serão transportadas para o citoplasma (STEPIN'SKI, 2014).

Muitos são os trabalhos que utilizaram FISH com sondas de rDNA 45S, associada a técnicas de imunocitogenética, e evidenciaram uma direta correlação entre o número de “cistrons” ribossomais e seu nível de transcrição (CAPERTA et al., 2002). As RONS ativas se encontram descondensadas durante a mitose e apresentam a cromatina com uma estrutura distinta, muitas vezes evidenciada pela formação das constrições secundárias no cromossomo metafásico. McStay e Grummt (2008) afirmam que a maior evidencia de que a constrição secundária está relacionada com atividade transcricional dos sítios de rDNA é que a presença da Pol I junto com outros fatores de transcrição que continuam associados as RONS, o que explicaria a visualização das bandas Ag-NOR nos cromossomos metafásicos. Ainda para estes autores, as RONS inativas são indistinguíveis da heterocromatina que as rodeia, diferente daquelas ativas, que apresentam a cromatina em uma conformação descondensada, ou seja, um rDNA acessível. O controle destes sítios é realizado por meio de mecanismos epigenéticos, passíveis de identificação por meio de técnicas de imunolocalização. Um exemplo disso foi evidenciado no trabalho de Paula et al. (2016), com gramíneas do gênero *Brachiaria*, em que as regiões organizadoras do nucléolo não foram marcadas com H3K4me2, fracamente marcadas com H3K9me2 e oscilando em marcadas e não marcadas para 5-metilcitosina, evidenciando, portanto, que nem todas as RONS estão ativas e que existe um controle epigenético regulando suas atividades.

Os sítios de rDNA 45S são dinâmicos, o que frequentemente resulta em um número variável de cópias e uma distribuição não constante destas regiões entre espécies proximamente relacionadas e até mesmo dentro dos organismos de uma mesma espécie (HUANG et al., 2012). A habilidade dos sítios de rDNA 45S de sofrerem quebras e formar

gaps (lesões), de acordo com Ragland et al. (2008), está associada com a inibição parcial da atividade replicacional do DNA, já que em condições normais estes sítios não estão propensos a sofrerem quebras (RICHARDS, 2001; GLOVER, 2006).

Huang et al. (2012) estudaram a estabilidade dos sítios de rDNA 45S em milho, arroz, cevada e sorgo tratados com um inibidor transcricional (Actinomicina-D) e um inibidor replicacional (Afidicolina). A Actinomicina-D induziu um estresse transcricional que provocou uma conformação cromatídica mais descondensada nos sítios de rDNA 45S, devido a uma redução da metilação do DNA no local e aumento de marcas características de conformação eucromáticas como a hiperacetilação de histonas H4 e dupla metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me2). Essas modificações epigenéticas, de acordo com Huang e colaboradores (2012), podem impedir que a cromatina se condense de forma organizada o que possibilita o aparecimento dos SFs de rDNA 45S.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Material vegetal

Os genótipos estudados foram: *L. multiflorum* cv. Ponteio (genótipos C7 e C2 com $2n=2x=14$) obtidos no Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado, Juiz de Fora-MG/Pelotas-RS e *L. perenne* cv. Ellet (genótipos C10 e C20 com $2n=2x=14$) cedidos pela Embrapa Recursos Genéticos, Brasília-DF. Sementes de *F. arundinacea* cv. Rizomat (genótipos C2 e 6 com $2n=6x=42$), foram adquiridas comercialmente.

3.3 Obtenção de meristemas e metáfases mitóticas

As raízes foram obtidas a partir de diferentes sementes germinadas a 10° C em B.O.D, em caixas revestidas com papel filtro umedecido com água destilada. Aproximadamente após 20 dias, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato e terra vegetal na proporção 3:2 e mantidas em casa de vegetação. Após o estabelecimento em casa de vegetação, as plantas foram transferidas para potes com água para otimizar a obtenção de raízes.

Para obtenção de c-metáfases, as raízes coletadas foram coletadas e tratadas em água gelada por 24 horas, conforme Książczyk et al. (2010). Para fins de análise do ciclo celular, uma amostra não foi submetida ao bloqueio mitótico. Posteriormente, as raízes foram fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético/ 3:1) e armazenadas em temperatura ambiente por, aproximadamente, três dias. Após essa etapa, as raízes foram armazenadas a -4°C para posterior aplicação da técnica FISH ou foram usadas imediatamente na técnica de imunolocalização. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento apresentada por Guerra e Souza (2002). As raízes foram previamente digeridas em uma mistura de enzimas celulase-pectinase pH 7,5 na proporção 100:200, a 37 °C em câmara úmida. O tempo de digestão variou entre as espécies, sendo de, aproximadamente, 2 horas em *Festuca arundinacea* e 1 hora e 50 minutos para as espécies de *Lolium*.

3.4 Imunolocalização da metilação do DNA (5-metil citosina – 5-mCyt)

A marcação da 5-mCyt foi realizada seguindo os passos descritos no trabalho de Suzuki et al. (2010) com algumas modificações. As lâminas recém-preparadas foram primeiramente desnaturadas em formamida 70%/SSC 2X a 85°C, por 1 minuto e 45 segundos. Posteriormente elas foram desidratadas em série alcoólica (70/90/100%) e então foram secadas ao ar. O material foi bloqueado em BSA 1% por 30 minutos em temperatura ambiente e câmara úmida. Após 30 minutos, o anticorpo primário anti-5-mCyt (mouse monoclonal, Millipore), diluído em BSA 3% na proporção 1:200, foi aplicado. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 37 °C, por 1 hora. As lâminas foram lavadas em PBS 1X, três vezes, por 5 minutos em plataforma agitadora. Posteriormente foi aplicado o anticorpo secundário (anti-mouse IgG TRITC-conjugado), diluído em BSA 1% na proporção 1:200, por 1 hora a 37 °C em câmara úmida escura. Após a imunomarcação, as lâminas foram lavadas em PBS 1X, 2 vezes, dentro de uma cubeta escura na plataforma agitadora, por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas na série alcoólica (70/90/100%), um minuto cada e secadas ao ar. Ao final, elas foram montadas e contrastadas em Vectashield com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol). As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 nos comprimentos de onda de excitação/emissão 550/575 para o TRITC e de 358/461 para o DAPI.

3.5 Imunolocalização da histona modificada – H3K9me2

A técnica de imunodeteção para H3K9me2 foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Chelysheva et al. (2013), com algumas modificações. No primeiro dia, as lâminas recém-preparadas pela técnica de esmagamento foram levadas ao micro-ondas imersas em tampão sódio citrato (pH 6), por 30 segundos a 800w de potência e imediatamente transferidas para Tampão Fosfato Salino (PBS 1X) por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram então incubadas em 100 µL de BSA 10%, durante 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. O anticorpo primário anti-H3K9me2 (rabbit policlonal IgG, Millipore) já diluído (1:100) em BSA 3% foi aplicado nas lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida por 24 horas, a 4° C.

No segundo dia, as lâminas foram lavadas em PBS 1X, três vezes, por cinco minutos na plataforma agitadora. Posteriormente o anticorpo secundário (anti-rabbit IgG-conjugado) já

diluído em BSA 3% na proporção 1:100 foi aplicado nas lâminas. Estas foram incubadas em câmara úmida e escura, a 37° C, por 1 hora. Após a imunomarcção, as lâminas foram lavadas em PBS 1X por duas vezes, por 10 minutos na plataforma agitadora. Posteriormente, as lâminas foram montadas e contrastadas em Vectashield® com DAPI. As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para o DAPI e 495/515 para a FITC (isotiacianato de fluorosceína). Essa técnica foi aplicada em lâminas feitas com raízes bloqueadas e não bloqueadas.

3.6 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A FISH foi realizada sequencialmente à imunolocalização. Para isso, foram usadas como sondas as sequências de rDNA 45S (pTa 71 de *Triticum aestivum* L.) marcadas previamente com digoxigenina por meio da reação de *nick-translation*.

A preparação cromossômica foi desnaturada com 100µL de formamida 70% em SSC 2x, por 1 minuto e 40 segundos a 85°C em estufa. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em série alcoólica (70%, 90% e 100%) dentro do freezer, por 1 minuto cada. 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 mantida no gelo por 5 minutos e aplicada sobre as lâminas desnaturadas que foram incubadas por, no mínimo, 16 horas, a 37°C, em câmara úmida para que ocorresse a hibridização.

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

As lâminas foram montadas em Vectashield® com DAPI e avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 com câmara monocromática refrigerada nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 358/461 para DAPI e as sondas foram visualizadas nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 490/525 para FITC e 550/575 para o TRITC.

3.7 Identificação dos nucléolos

Com o objetivo de identificar precisamente os nucléolos foi empregada a técnica de coloração com nitrato de prata em lâminas do ciclo celular, conforme proposta por Guerra e Souza (2002) com adaptações. Sobre a preparação cromossômica foi colocada uma tela de nylon, na qual foi adicionada 1 gota de solução coloidal (2% gelatina incolor, 2% ácido fórmico) e 2 gotas de solução de nitrato de prata 50% previamente filtrada. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 72°C, de 2 a 7 minutos e posteriormente lavadas com água destilada e desidratadas em série alcoólica (70%, 80% e 100%), por 5 minutos. As lâminas foram observadas em microscópio de campo claro (Zeiss) modelo Axio com câmera AxioCam ICc1 acoplada.

4 RESULTADOS

A avaliação do número de sítios de rDNA 45S mostrou que há variações entre os genótipos de *L. multiflorum* cv. Ponteio e entre os genótipos de *L. perenne* cv. Ellet. Para *F. arundinacea* cv. Rizomat, o número de sítios foi constante em ambos os genótipos avaliados (TABELA 1).

Em *L. multiflorum* cv. Ponteio, genótipo C7, foram avaliadas 16 células em intérfase e 24 em metáfase. Com exceção de dois núcleos interfásicos que apresentaram cinco sítios, para todos os demais foram quantificados quatro sítios (TABELA 1). No genótipo C2, foram observados sete sítios de rDNA 45S em sete núcleos interfásicos e em seis metáfases (TABELA 1). Todos os sítios, em ambos genótipos, estavam em posição intersticial nos cromossomos.

L. perenne cv. Ellet, genótipo C10, apresentou seis sítios em oito núcleos interfásicos e 11 metáfases mitóticas. No genótipo C20, dentre os seis núcleos interfásicos quantificados, três apresentaram sete sítios e três, oito sítios. Para as 12 metáfases analisadas, foram observados sete sítios de rDNA 45S (TABELA 1). Em ambos genótipos, todos os loci estavam também em posição intersticial.

Os genótipos C2 e 6 da cv. Rizomat de *F. arundinacea* apresentaram, invariavelmente, quatro sítios em 16 núcleos interfásicos e 21 metáfases mitóticas (TABELA 1), sendo dois sítios em posição terminal e dois em posição intersticial nos cromossomos.

Tabela 1 – Nível de ploidia, número cromossômico, número de sítios de rDNA 45S e marcas epigenéticas (5-mCyt e H3K9me2) avaliadas em metáfases mitóticas e núcleos interfásicos de *F. arundinacea* cv. Rizomat, *L. multiflorum* cv. Ponteio e *L. perenne* cv. Ellet.

Número de sítios de rDNA 45S						
Espécie/cv/genótipo	Nível de ploidia	2n	5-mCyt		H3K9me2	
			Núcleo interfásico	Metáfase mitótica	Núcleo interfásico	Metáfase mitótica
<i>F. arundinacea</i> cv. Rizomat C2	6x	42			4/28* (7)**	4/40 (10)
<i>F. arundinacea</i> cv. Rizomat 6	6x	42	4/36 (9)	4/44 (11)		
<i>L. multiflorum</i> cv. Ponteio C7	2x	14	4/32 (8)	4/40 (10)	4/24 (6) e 5/10 (2)	4/56 (14)
<i>L. multiflorum</i> cv. Ponteio C2	2x	14	7/49 (7)	7/42 (6)		
<i>L. perenne</i> cv. Ellet, C20	2x	14	7/21 (3) e 8/24 (3)	7/84 (12)		
<i>L. perenne</i> cv. Ellet, C10	2x	14			6/48 (8)	6/66 (11)

* Número total de sítios de rDNA 45S contabilizados ** Entre parênteses, número de células avaliadas

Fonte: Do autor (2017)

4.1 Caracterização do status de metilação do DNA e da dimetilação da H3K9 em sítios de rDNA 45S em núcleos interfásicos

Nos núcleos interfásicos foram observados sítios de rDNA 45S em posição extranucleolar, perinucleolar e intranucleolar. Estes sítios foram classificados como hipometilados ou hipermetilados para as marcas epigenéticas H3K9me2 (TABELA 2 e FIGURA 2) e 5-mCyt (TABELA 3 e FIGURA 3). Alguns sítios localizados na cromatina intranucleolar e perinucleolar foram categorizados como hiper/hipometilados por apresentarem-se parcialmente hipermetilados e hipometilados (FIGURA 2, letras K-L, seta amarela e FIGURA 3, letras C-D/G-H, seta e ponta de seta amarela). Os sítios em posição perinucleolar, muitas vezes, apresentavam uma região estendida, projetada para o interior do nucléolo, a qual apresentava-se hipometilada tanto para H3K9me2 (FIGURA 2, letra C, ponta de seta branca) quanto para 5-mCyt (FIGURA 3, letras G-H, ponta de seta branca).

Em *L. multiflorum* cv. Ponteio, C7 e C2, foram avaliados 32 e 49 sítios de rDNA 45S, respectivamente, para a marca da 5-mCyt. A marca da H3K9me2 foi analisada somente para o genótipo C7 em 34 sítios (TABELA 1). Há um predomínio de sítios posicionados na periferia dos nucléolos ou na cromatina intranucleolar (acima de 90%) dos núcleos avaliados (TABELAS 2 e 3). Destes, há uma maior tendência para hipometilação da H3K9me2 (61,77%) e também da 5-mCyt (56,25% e 63,26% para os genótipos C7 e C2, respectivamente). Todos os sítios em posição extranucleolar estavam hipermetilados para ambas as marcas epigenéticas (TABELAS 2 e 3; FIGURAS 2 e 3, setas abertas azuis).

As marcas para 5-mCyt foram avaliadas em 45 sítios distribuídos em seis núcleos interfásicos do genótipo C20 da cv. Ellet de *L. perenne*. Para a H3K9me2 foram 48 sítios em oito núcleos interfásicos avaliados no genótipo C10 (TABELA 1). Nesta espécie há também uma maior ocorrência dos sítios peri e intranucleolares. Cerca de 71 e 69% desses sítios estavam hipo e hiper/hipometilados na lisina 9 da histona H3 e no DNA, respectivamente (TABELAS 2 e 3; FIGURAS 2 e 3). Dentre os oito sítios extranucleolares, apenas um estava hipometilado para 5-mCyt no genótipo C20 (TABELA 2).

Na cv. Rizomat de *F. arundinacea*, as marcas da 5-mCyt foram analisadas em 36 sítios (nove núcleos) do genótipo 6 e a H3K9me2 em 28 sítios (sete núcleos) do

genótipo C2 (TABELA 1). Novamente, a maioria dos sítios (acima de 85%) estava localizada na cromatina intranucleolar ou perinucleolar. Destes, cerca de 93% e 81% estavam hipo ou hiper/hipometilados na lisina 9 na histona H3 e no DNA, respectivamente (TABELAS 2 e 3). Todos os sítios localizados na cromatina extranucleolar estavam hipermetilados para ambas as marcas epigenéticas (TABELAS 2 e 3; FIGURAS 2 e 3, ponta de seta aberta azul).

Tabela 2 – Posição e status da dimetilação da lisina 9 na histona H3 (H3K9me2) dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos de *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7), *L. perenne* cv. Ellet (C10) e *F. arundinacea* cv. Rizomat (C2).

	Posição/Grau H3K9me2	Posição	Hiper/		% Total	
			Hipermetilados	Hipometilados		
G E N Ó T I P O	<i>F. arundinacea</i> Rizomat C2	Extranucleolares	2	0	7,15%	
		Perinucleolares	0	6	25%	
		Intranucleolares	0	18	67,85%	
	Total de sítios: 28	% Total	7,15%	85,70%	7,15%	100%
	<i>L. multiflorum</i> Ponteio C7	Extranucleolares	3	0	8,82%	
		Perinucleolares	3	8	50%	
		Intranucleolares	0	13	41,18%	
	Total de sítios: 34	% Total	17,65%	61,77%	20,58%	100%
	<i>L. perenne</i> Ellet C10	Extranucleolares	6	0	12,5%	
		Perinucleolares	7	8	39,58%	
Intranucleolares		1	20	47,92%		
Total de sítios: 48	% Total	29,16%	58,34%	12,5%	100%	

Fonte: Do autor (2017)

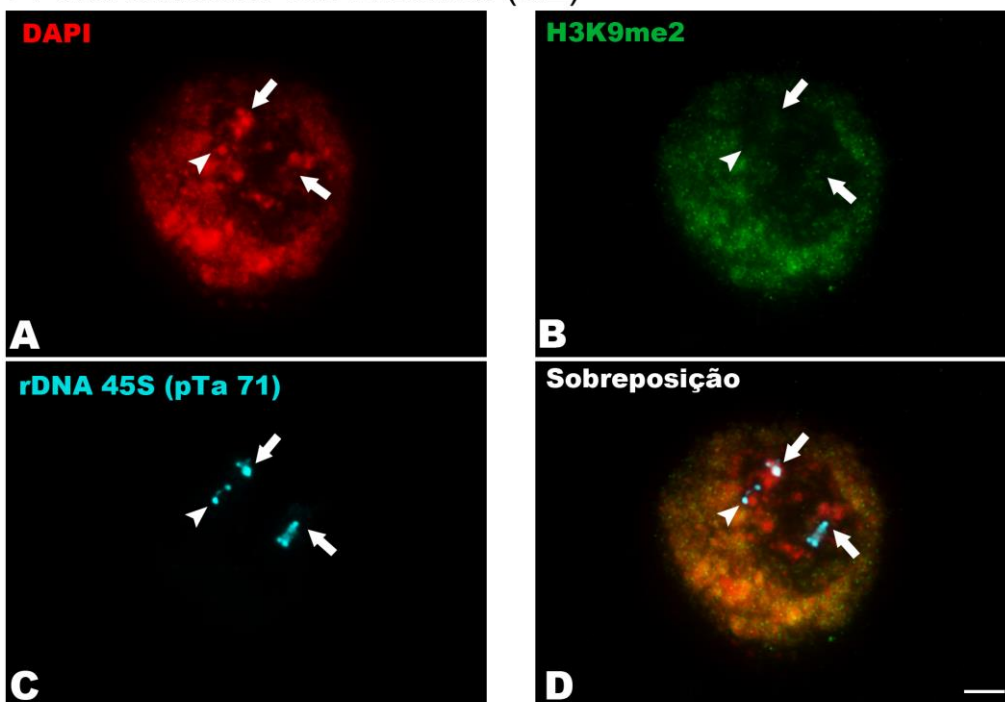
Tabela 3 – Posição e status de metilação das citosinas (5-mCyt) dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos de *L. multiflorum* (Ponteio C7 e C2), *L. perenne* (Ellet C20) e *F. arundinacea* (Rizomat 6).

	Posição/Grau 5-mCyt	Posição	Hipermetilados	Hipometilados	Hiper/ hipometilados	% Total
G E N Ó T I P O S	<i>F. rundinacea</i> Rizomat 6	Extranucleolares	5	0	0	13,89%
		Perinucleolares	2	11	8	58,33%
		Intranucleolares	0	7	3	27,78%
	Total de sítios: 36	% Total	19,44%	50%	30,56%	100%
	<i>L. multiflorum</i> Ponteio C2	Extranucleolares	3	0	0	6,12%
		Perinucleolares	2	23	8	67,34%
		Intranucleolares	0	8	5	26,54%
	Total de sítios: 49	% Total	10,20%	63,26%	26,54%	100%
	<i>L. multiflorum</i> Ponteio C7	Extranucleolares	1	0	0	3,13%
		Perinucleolares	5	15	4	75%
		Intranucleolares	0	3	4	21,87%
	Total de sítios: 32	% Total	18,75%	56,25%	25%	100%
<i>L. perenne</i> Ellet C20	Extranucleolares	7	1	0	17,78%	
	Perinucleolares	6	7	5	40%	
	Intranucleolares	1	13	5	42,22%	
Total de sítios: 45	% Total	31,12%	46,66%	22,22%	100%	

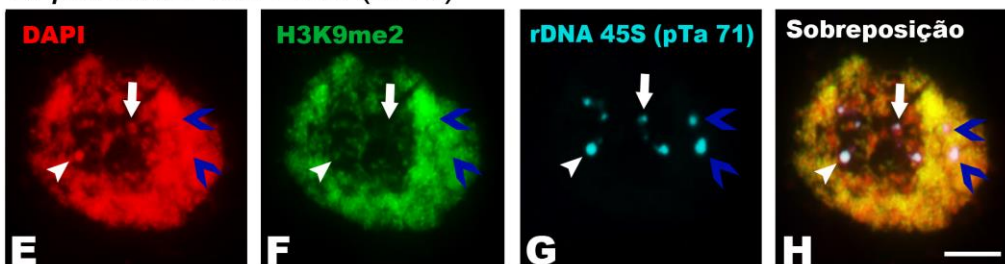
Fonte: Do autor (2017)

Figura 2 – Posição e status de metilação dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos para H3K9me2 nas espécies estudadas.

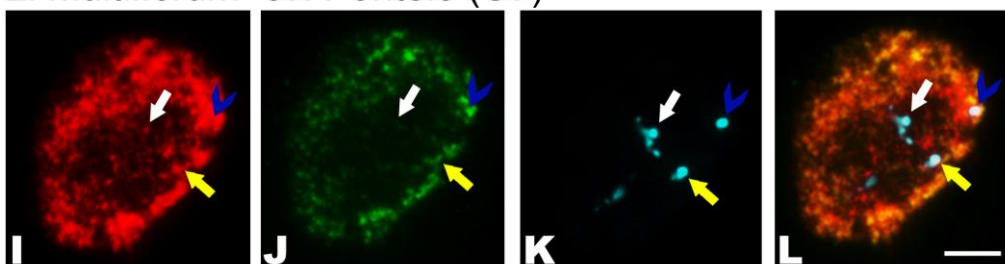
F. arundinacea cv. Rizomat (C2)



L. perenne cv. Ellet (C10)



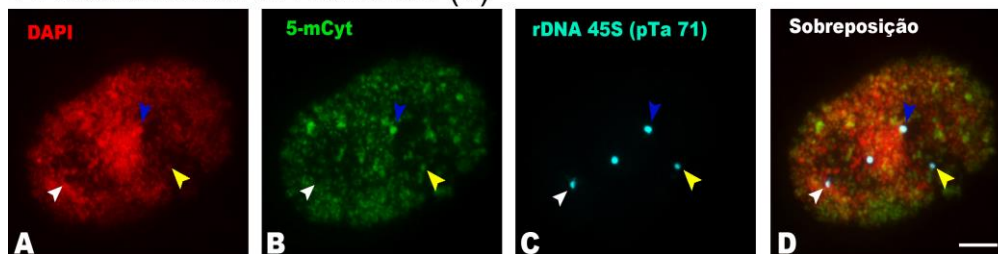
L. multiflorum cv. Ponteio (C7)



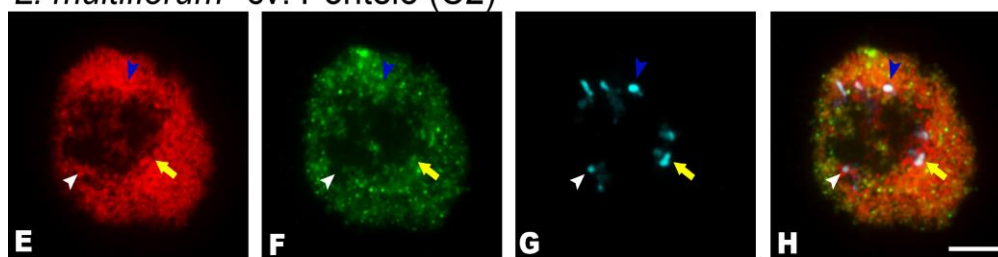
Legenda: Sítios de rDNA 45S: setas brancas - intranucleolares hipometilados (A-D; E-H; I-L); pontas de seta brancas - perinucleolares hipometilados (A-D; E-H); setas amarelas - sítio perinucleolares hiper/hipometilados (I-L), letra L evidencia fração hipometilada do sítio que se projeta para o interior do nucléolo; pontas de seta abertas azuis - extranucleolares hipermetilados (E-H; I-L). Barra: 5 μ m. Fonte: Do autor (2017).

Figura 3 – Posição e status de metilação dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos para 5-mCyt nas espécies estudadas.

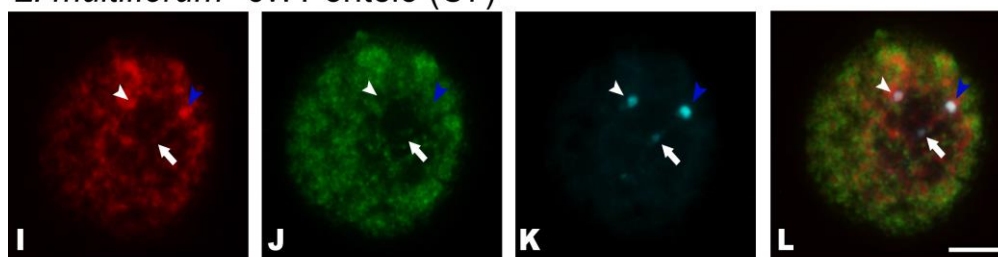
F. arundinacea cv. Rizomat (6)



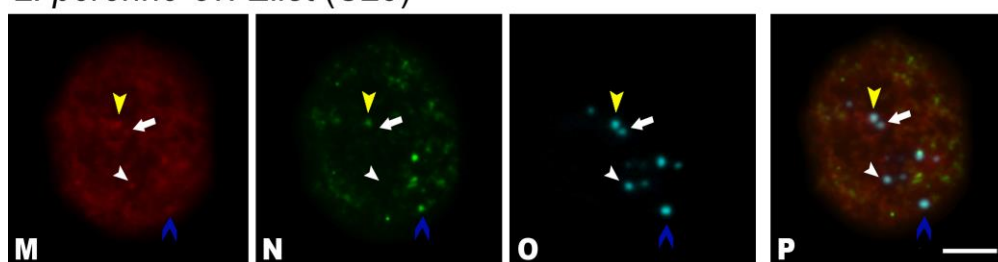
L. multiflorum cv. Ponteio (C2)



L. multiflorum cv. Ponteio (C7)



L. perenne cv. Ellet (C20)

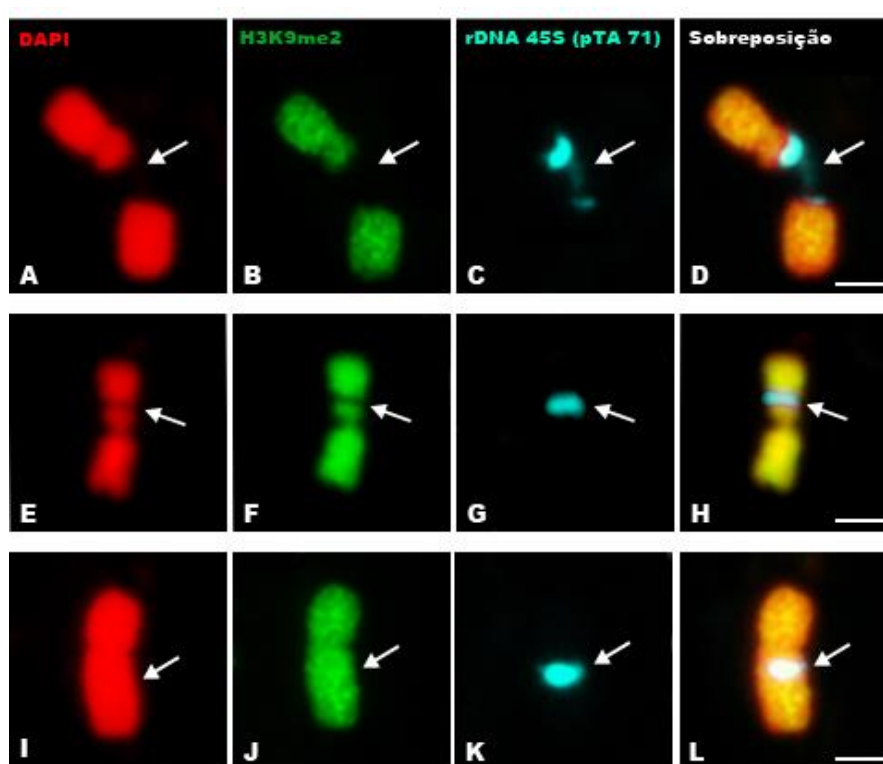


Legenda: Sítios de rDNA 45S: setas brancas - sítios intranucleolares hipometilados (I-K; M-P); pontas de seta brancas - perinucleolares hipometilados (A-D; E-H; I-L; M-P); setas amarelas - perinucleolares hiper/hipometilados (E-H), letra G evidencia fração hipometilada do sítio que se projeta para o interior do nucléolo; pontas de seta amarelas - intranucleolares hiper/hipometilados (M-P); ponta de seta azuis - perinucleolares hipermetilados (A-D; E-H; I-L); ponta de setas abertas azuis - extranucleolares hipermetilados (M-P). Barra: 5 μ m. Fonte: Do autor (2017).

4.2 Caracterização do status de metilação do DNA e da dimetilação da H3K9 em sítios de rDNA 45S em cromossomos metafásicos

Para padronizar a caracterização epigenética dos sítios de rDNA 45S dos cromossomos metafásicos foram estabelecidos três status para a metilação do DNA e da H3K9: hipermetilados, hipometilados e não metilados, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Caracterização dos sítios de rDNA 45S conforme o status de metilação para 5-mCyt e H3K9me2 em cromossomos metafásicos.



Legenda: Sítios de rDNA 45S: estendido não metilado (A-D); com gap hipometilado (E-H); condensado hipermetilado (I-L). Setas indicam a localização dos sítios de rDNA 45S nos diferentes cromossomos. Barra: 2 μ m. Fonte: Do autor (2017).

Todos os sítios classificados como hipermetilados para a H3K9me2 encontravam-se condensados (intactos) nas três espécies/genótipos avaliados. A hipometilação, por sua vez, foi observada em sítios intactos e sítios com gaps (TABELA 4). Muitas vezes, os sítios com gaps apresentavam a fibra de cromatina estendida (FIGURA 5, E-L). Para *F. arundinacea* cv. Rizomat (C2) foram evidenciados tanto sítios condensados/intactos (20%) como sítios com gaps (12,5%)

não metilados nos cromossomos metafásicos (TABELA 4). Em *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7) e *L. perenne* cv. Ellet (C10), todos os sítios com gaps não apresentavam alto grau dimetilação na lisina 9 da histona H3 (FIGURA 5 e TABELA 4).

Tabela 4 – Porcentagem das categorias de sítios de rDNA 45S nas metáfases mitóticas e de *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7), *L. perenne* cv. Ellet (C10) e *F. arundinacea* cv. Rizomat (C2) em relação ao status de dimetilação da lisina 9 da histona (H3K9me2).

		<i>F. arundinacea</i> cv. Rizomat (C2)		<i>L. multiflorum</i> cv. Ponteio (C7)			<i>L. perenne</i> cv. Ellet (C10)	
H3K9me2		Tipos de sítios						
Hipermetilado	Gaps	0,00%	5,00%	Gaps	0,00%	44,64%	Gaps	0,00%
	Cond.*	5,00%		Cond.*	44,64%		Cond.*	27,27%
Hipometilado	Gaps	17,50%	62,50%	Gaps	33,92%	39,28%	Gaps	15,15%
	Cond.*	45,00%		Cond.*	5,36%		Cond.*	45,46%
Não metilado	Gaps	12,50%	32,50%	Gaps	16,08%	16,08%	Gaps	12,12%
	Cond.*	20,00%		Cond.*	0,00%		Cond.*	0,00%
Total de sítios		40		56			66	

Cond.*: condensados

Fonte: Do autor (2017)

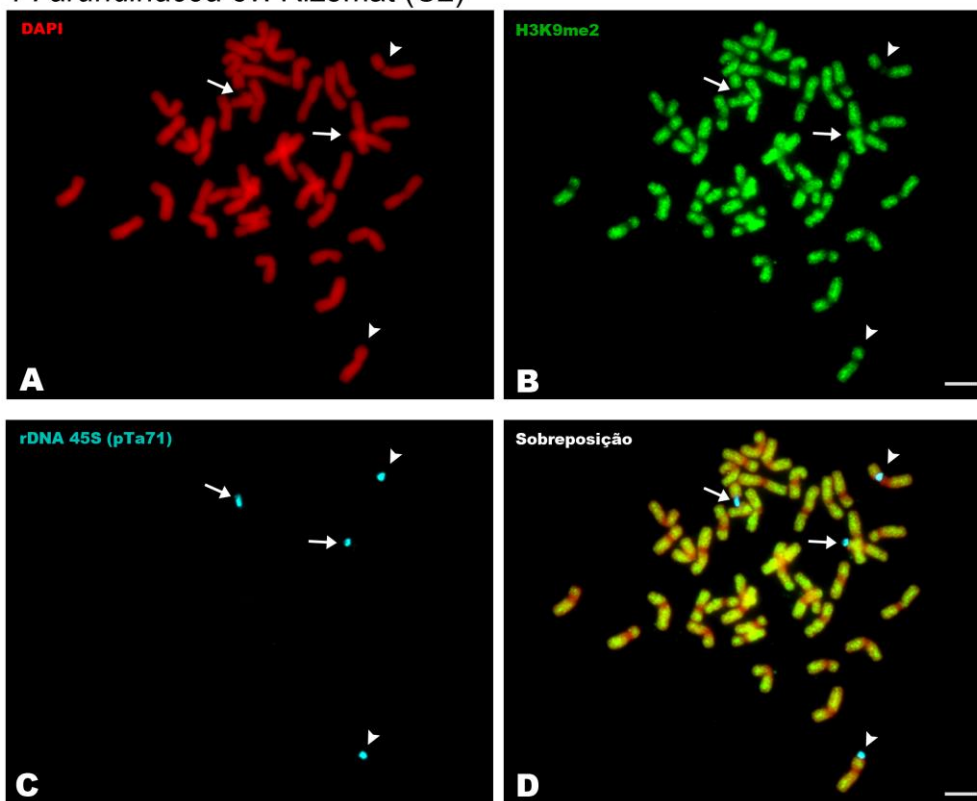
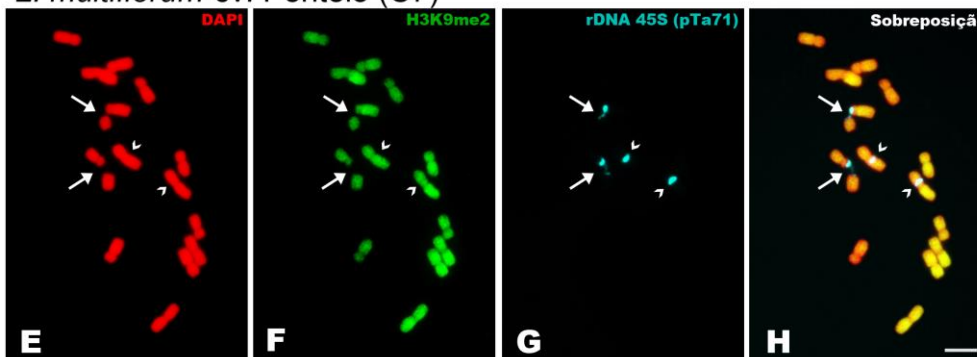
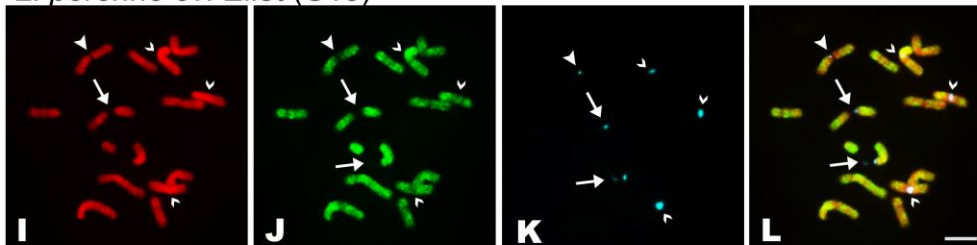
Especificamente para *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7), a frequência de hipermetilação via H3K9me2 (44,64%) variou de um a dois sítios/célula, com predominância de dois hipermetilados. Os outros 5,36% dos sítios condensados encontraram-se hipometilados, variando também de um a dois sítios, com predominância de um. Dentre os sítios com gaps, 33,92% estavam hipometilados e 16,08% não metilados (TABELA 4). A variação de ocorrência para ambos foi de um a dois sítios/célula, com predominância de dois hipometilados e dois e três não metilados.

A hipermetilação da H3K9 para *L. perenne* cv. Ellet (C10), evidenciada em 27,27% dos sítios condensados, variou de um a três/célula, com predominância de um sítio de rDNA 45S hipermetilado. Dos sítios intactos 45,46% estavam hipometilados, variando de um a cinco sítios, com maior frequência de dois hipometilados/célula. Os demais sítios apresentavam gaps em estado hipometilado (15,15%) ou não metilado (12,12%) (TABELA 4). A variação dos sítios hipometilados e não metilados foi de um a dois/célula com predominância de um hipometilado e dois sem metilação.

Para *F. arundinacea* cv. Rizomat (C2), dentre os sítios condensados, 5%

estavam hipermetilados e ocorreram em apenas um sítio em posição terminal; 45% estavam hipometilados e variaram de um a quatro/metáfase, com predominância de um (intersticial) e três sítios (dois terminais e um intersticial). Outros 20% dos sítios intactos não apresentavam metilação e variaram de um a três, com predominância de dois sítios (dois intersticiais ou um intersticial e um terminal). Dentre os 30% dos sítios com gaps, 17,5% estavam hipometilados e 12,5% não metilados (TABELA 4). Para ambos os casos, houve uma variação de um a dois sítios/célula, com maior ocorrência de um intersticial.

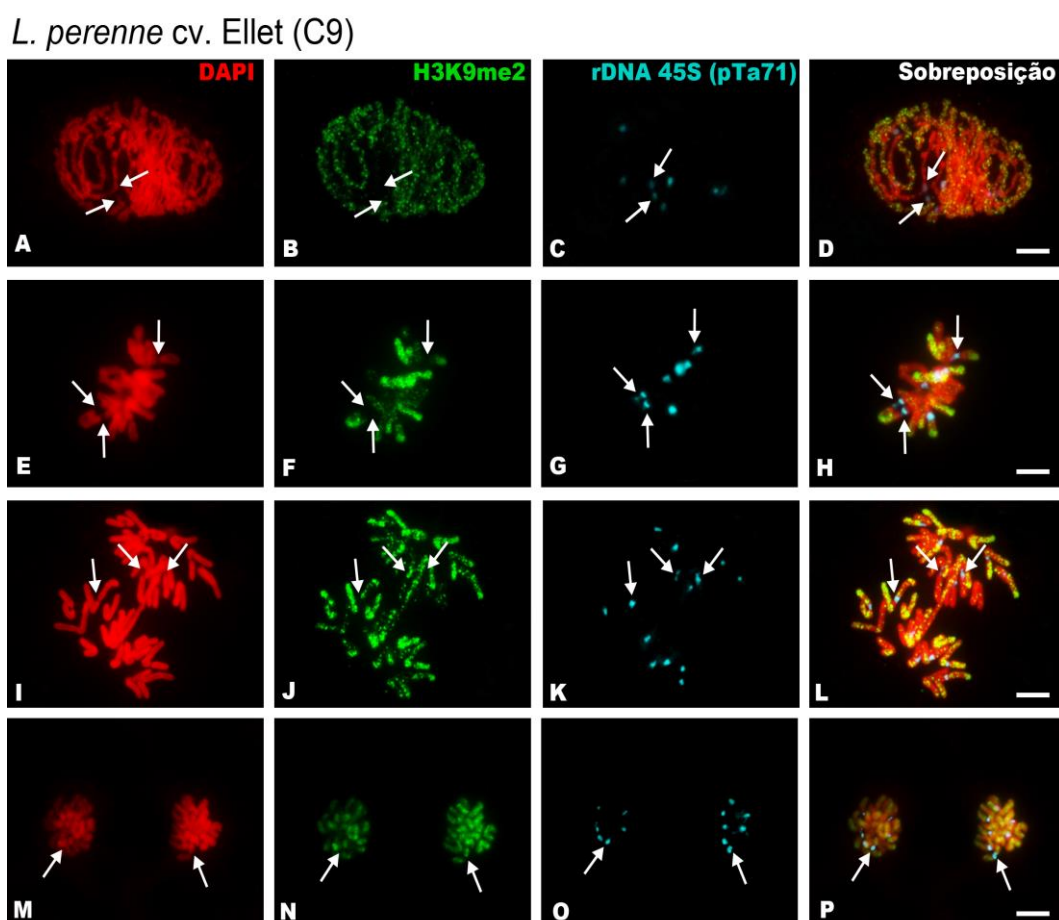
Figura 5 – Exemplos de conformações e diferentes status de metilação para H3K9me2 nos sítios de rDNA 45S em *F. arundinacea* cv. Rizomat (C2), *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7) e *L. perenne* cv. Ellet (C10).

F. arundinacea cv. Rizomat (C2)*L. multiflorum* cv. Ponteio (C7)*L. perenne* cv. Ellet (C10)

Legenda: Sítios de rDNA 45S: setas - não metilados; pontas de setas - hipometilados; pontas de seta abertas - hipermetilados; A-D: ponta de seta - sítio terminal condensado hipometilado; I-L: setas - RONS não metilados estendidos; ponta de seta - hipometilado com gap; pontas de seta abertas - condensados hipermetilados. Barra: 5µm. Fonte: Do autor (2017).

Em uma análise para se certificar da expressão dos sítios de rDNA 45S no ciclo celular, observou-se a imunomarcação da H3K9me2 em *L. perenne* cv. Ellet. Essa avaliação possibilitou a identificação de sítios com gaps hipometilados, evidenciando a manutenção desse estado epigenético ao longo de todo o ciclo celular (FIGURA 6). A coloração com nitrato de prata (Ag-NOR) evidenciou nucléolos até a pró-metáfase (FIGURA SUPLEMENTAR, A-B).

Figura 6 – Manutenção do estado epigenético hipometilado para marcas de H3K9me2 nos sítios de rDNA 45S com gaps ao longo do ciclo celular de *L. perenne* cv. Ellet (C9).



Legenda: Setas evidenciam sítios de rDNA 45S com gaps, hipometilados para H3K9me2 em (A-D): prófase; (E-H): metáfase; (I-J): anáfase e (M-P): telófase. Barra: 5µm. Fonte: Do autor (2017).

Em relação às marcas de 5-mCyt, todos os sítios hipermetilados encontravam-se condensados nos cromossomos das espécies/genótipos analisados (FIGURA 7 e TABELA 5). Entretanto, também foram observados sítios condensados/intactos

hipometilados (FIGURA 7 e TABELA 5). Os sítios com gap, por sua vez, sempre foram encontrados em estado hipometilado ou não metilados, exceto para *F. arundinacea* cv. Rizomat (6), onde não foram evidenciados sítios não metilados (FIGURA 7 e TABELA 5).

Tabela 5 – Porcentagens das formas de ocorrência dos sítios de rDNA 45S nas metáfases de *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7 e C2), *L. perenne* cv. Ellet (C20) e *F. arundinacea* cv. Rizomat (6) em relação ao nível de 5-mCyt.

	Forma	Hipermetilados	Hipometilados	Não metilados
<i>F. arundinacea</i> cv. Rizomat 6	Gaps	0,0%	2,27%	0,0%
	Condensados	18,18%	79,55%	0,0%
Total de sítios: 44	% Total	18,18%	81,82%	0,0%
<i>L. multiflorum</i> cv. Ponteio C7	Gaps	0,0%	27,5%	7,5%
	Condensados	50,0%	15,0%	0,0%
Total de sítios: 40	% Total	50,0%	42,5%	7,5%
<i>L. multiflorum</i> cv. Ponteio C2	Gaps	0,0%	42,86%	2,39%
	Condensados	23,80%	30,95%	0,0%
Total de sítios: 42	Total	23,80%	73,81%	2,39%
<i>L. perenne</i> cv. Ellet C20	Gaps	0,0%	22,62%	14,29%
	Condensados	25,0%	38,09%	0,0%
Total de sítios: 84	% Total	25,0%	60,71%	14,29%

Fonte: Do autor (2017)

Em *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7), que possui dois loci de rDNA/célula, 65% dos sítios evidenciados estavam condensados, dos quais 50% estavam hipermetilados, variando de um a quatro sítios/célula, com predominância de dois. Entre os sítios hipometilados, 15% deles condensados, a variação foi de um a dois sítios/célula com a mesma frequência de ocorrência. Os outros 35% dos sítios de rDNA 45S apresentavam gaps, dos quais 27,5% estavam hipometilados variando de um a dois sítios/célula, como maior frequência de dois hipometilados, e 7,5% não metilados, com variação também de um a dois sítios/célula com a mesma frequência de ocorrência (TABELA 5).

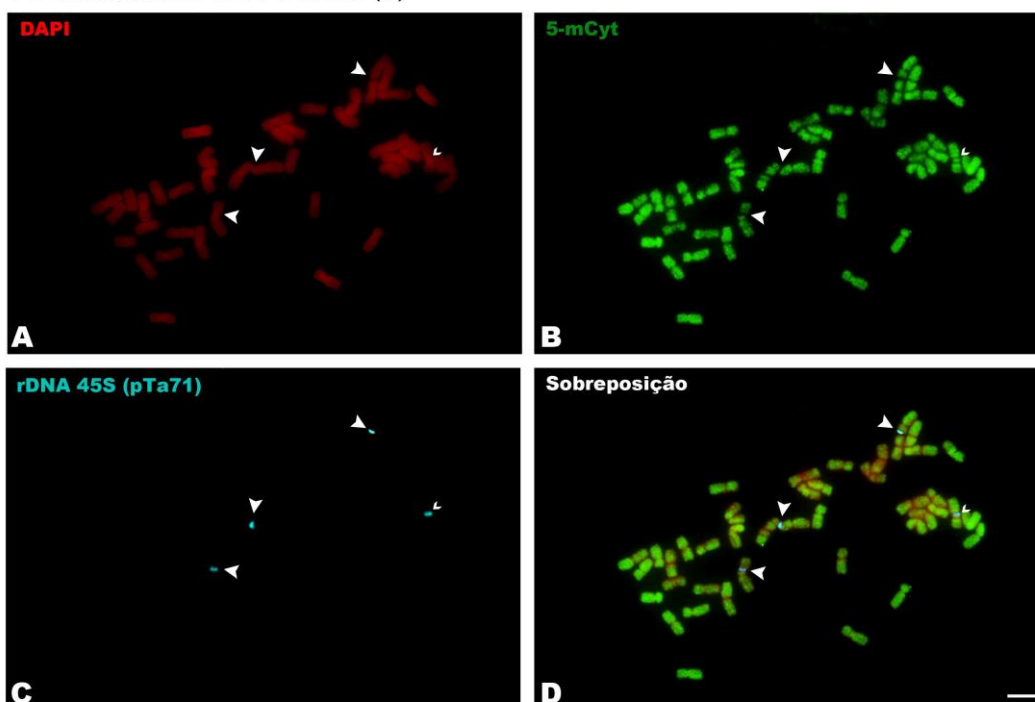
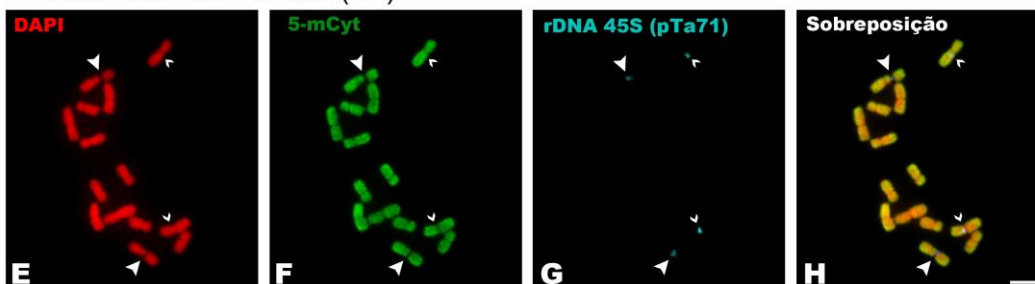
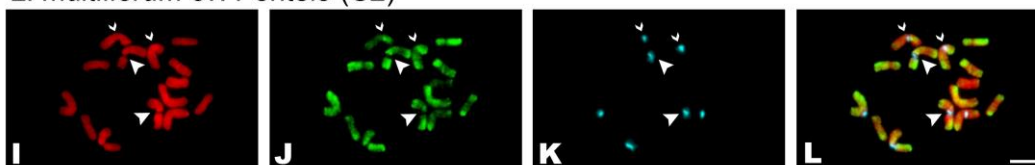
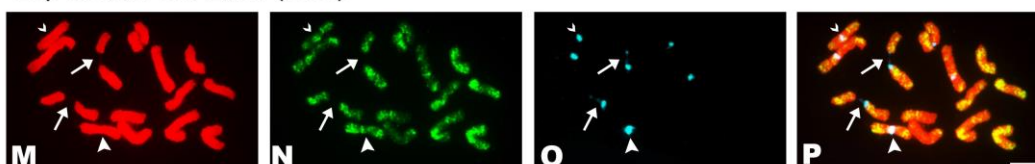
O genótipo C2 da cultivar Ponteio de *L. multiflorum*, com sete sítios de rDNA

45S/célula, apresentou resultados diferentes do genótipo C7. Dentre os 54,75% dos sítios condensados, 23,80% foram caracterizados como hipermetilados, variando entre um, dois e quatro sítios/célula, com predominância de dois apresentando essa condição. Os outros 30,95% dos sítios condensados apresentaram-se hipometilados, com variação de dois (predominante) a quatro sítios. Dos sítios com gaps (45,25%), 42,86% estavam hipometilados e variavam entre um, três (predominante) e quatro; 2,39% correspondiam a apenas um sítio não metilado dentre todas as metáfases (TABELA 5).

A hipermetilação via 5-mCyt para os cromossomos de *L. perenne* cv. Ellet (C20), evidenciada em 25% dos sítios condensados, variou de um a três sítios/célula, com predominância de dois sítios hipermetilados. Os outros 38,09% dos sítios condensados estavam hipometilados, variando de um a cinco sítios/célula, com maior frequência de três. Os 36,91% restantes dos sítios foram evidenciados na forma de gaps e mostraram-se hipometilados (22,62%) e não metilados (14,29%). A variação dos sítios hipometilados foi de um a quatro/célula, sendo a predominância de um, dois e quatro. Para os não metilados, esse número foi de um a três sítios/célula (TABELA 5).

Para *F. arundinacea* cv. Rizomat (6), 18,18% dos sítios condensados estavam hipermetilados e variaram de um (número predominante e em posição terminal no cromossomo) a dois sítios (um em posição terminal e um intersticial) e 79,55% estavam hipometilados e variaram de dois a quatro/célula, com predominância de quatro sítios (dois em posição terminal e dois intersticiais). Um único sítio (2,27%) na forma de gap hipometilado foi evidenciado intersticialmente no cromossomo (TABELA 5).

Figura 7 – Exemplos de conformações e diferentes status de metilação para 5-mCyt nos sítios de rDNA 45S em *F. arundinacea* cv. Rizomat (6), *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7 e C2) e *L. perenne* cv. Ellet (C20).

F. arundinacea cv. Rizomat (6)*L. multiflorum* cv. Ponteio (C7)*L. multiflorum* cv. Ponteio (C2)*L. perenne* cv. Ellet (C20)

Legenda: sítios de rDNA 45S: pontas de seta - hipometilados; pontas de seta abertas - hipermetilados; setas - não metilados; I-L: pontas de seta - hipometilados em formato de gaps; M-P: setas - não metilados estendidos; ponta de seta - hipometilados condensados; ponta de seta aberta - hipermetilado condensado. Barra: 5µm. Fonte: Do autor (2017).

5 DISCUSSÃO

A variação no número de sítios de rDNA 45S observada em *Lolium perenne* e *L. multiflorum* corrobora com as descrições de outros autores (THOMAS et al., 1996; KSIĄŻCZYK et al., 2010; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015), exceto o relato de quatro sinais para *L. multiflorum*, cuja citação é inédita. Para os dois genótipos (C2 e 6) de *F. arundinacea* cv. Rizomat, a descrição de quatro sítios também já foi relatada na literatura (THOMAS et al., 1997).

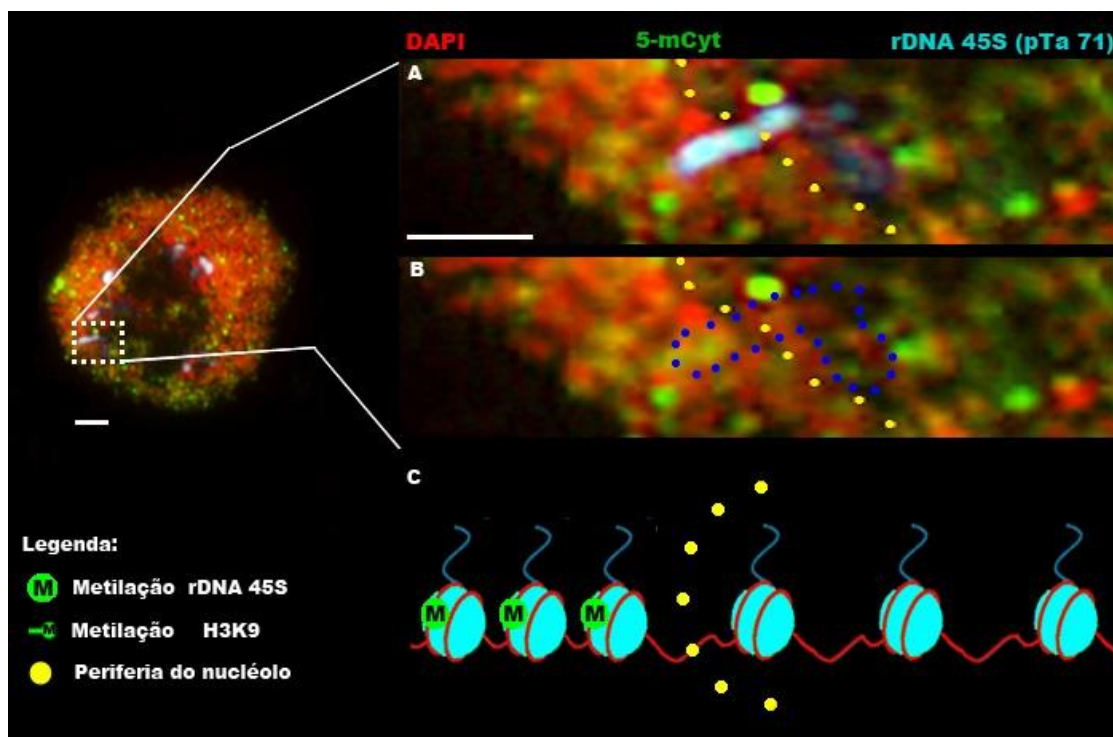
As variações intraespecíficas para o número de sítios foram atribuídas, muitas vezes, à fragilidade cromossômica dos sítios de rDNA 45S descrita em *Lolium perenne* por Huang e colaboradores (2008; 2009; 2012), em *L. multiflorum* por Bustamante et al. (2014) e em *Festuca arundinacea* e nos híbridos *Festulolium* (ROCHA et al., 2016). Os sítios frágeis foram descritos como regiões aptas a sofrerem quebras e lesões, levando conseqüentemente a perda de material genético, a alteração no número e intensidade de sinais de rDNA 45S (HUANG et al., 2008; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015). Entretanto, a evidência de que não ocorre quebra cromossômica e perda de material genético, proposta por Rocha e colaboradores (2016), permitiu que outras hipóteses fossem levantadas para se explicar o fenômeno da variação no número de sítios, tais como eventos de transposição gênica, rearranjos cromossômicos e a permuta desigual (DUBCOVSKY; DVORAK, 1995; SCHUBERT; WOBUS, 1985; THOMAS; HARPER; MORGAN, 2001). A variação numérica dos sítios de rDNA 45S, não relacionada aos SFs, também foi evidenciada em outras plantas, por exemplo, *Brachiaria* (NANI et al., 2016) e *Allium* (SCHUBERT; WOBUS, 1985).

Nos núcleos interfásicos, a variação numérica dos sítios de rDNA 45S dentro de um mesmo genótipo observada em *L. multiflorum* cv. Ponteio (C7) e em *L. perenne* cv. Ellet (C20) pode ser explicada pela parcial descondensação dos blocos heterocromáticos, separando-o em dois menores, os quais permanecem conectados por uma fina fibra de DNA, permitindo a transcrição dos genes ribossomais. Essa observação já foi feita por Rocha et al. (no prelo) também em núcleos interfásicos de *L. perenne*, *L. multiflorum* e *Festuca arundinacea*, mas também em *Brassica juncea* (MALUSZYNSKA; HESLOP-HARRISON, 1993) e em trigo (LEITCH et al., 1992). Nas duas cultivares de *Lolium* avaliadas no nosso estudo, estes sítios descondensados

estavam sempre localizados na periferia e/ou no interior do nucléolo, mostrando uma relação direta com a expressão gênica.

Para todos os genótipos analisados há um predomínio de sítios condensados e descondensados localizados na região peri e intranucleolar e estes estão ou hipometilados ou hiper/hipometilados para a H3K9me2 e 5-mCyt, o que condiz com estado transcricionalmente ativo destes sítios de rDNA 45S que, juntamente com alguns complexos proteicos, formam o nucléolo (PIKAARD, 2002). Shaw, Rawlins e Highett (1993) mostraram em ervilha que os blocos heterocromáticos perinucleolares de rDNA 45S podem sofrer uma descondensação, projetando-se para o interior do nucléolo. Para que isso aconteça é necessário que o sítio sofra uma redução no grau de metilação e, conseqüentemente, na sua organização heterocromática. Esse comportamento dos sítios localizados nos limites do nucléolo foi melhor caracterizado por Neves et al. (2005). Esses autores relataram que a região condensada nos promotores gênicos apresenta alto nível de metilação do DNA, assim como uma hipermetilação das histonas. Em contrapartida, a parte descondensada, que adentra o nucléolo, apresenta as citosinas dos promotores não metiladas e as histonas hipometiladas, também observado em nosso estudo, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 – Sítio de rDNA 45S perinucleolar hiper/hipometilado nas citosinas em *L. multiflorum* cv. Ponteio (C2). A. Sítio de rDNA 45S perinucleolar com região descondensada adentrando o nucléolo; B. Delimitação do sítio de rDNA 45S com as regiões hiper/hipometiladas evidenciadas; C. Representação esquemática da modulação da cromatina em estado condensado (hipermetilado) e descondensada no interior do nucléolo (hipometilado). Barra: 1µm.



Fonte: Do autor (2017).

Especificamente para 5-mCyt, um trabalho realizado com espécies do gênero *Citrus* evidenciou que os sítios de rDNA 45S descondensados encontravam-se hipometilados, enquanto que os blocos hipermetilados condensados não estavam associados ao nucléolo (extranucleolares) (MARQUES et al., 2011). Em nosso estudo, de forma semelhante, para todas as espécies avaliadas, a grande maioria dos sítios extranucleolares estavam hipermetilados para 5-mCyt e também para H3K9me2. A colocalização das marcas de 5-mCyt e H3K9me2 nos sítios de rDNA 45S em núcleos interfásicos também foi demonstrada em outras espécies, tais como *Citrus clementina* (MARQUES et al., 2011) e *A. thaliana* (LAWRENCE et al., 2004)

A alta porcentagem de sítios caracterizados em *L. perenne*, *L. multiflorum* e *F. arundinacea* como hiper/hipometilados, ou seja, que apresentavam uma parte do sítio hipermetilada e a outra parte, hipometilada, pode ser justificada pela regulação do cistron gênico de rDNA 45S, visto que estes são altamente repetitivos e redundantes no genoma das plantas. A regulação da atividade dos genes ribossomais pode se dar por meio da supressão de todo o locus, ou seja, em todos os genes presentes na repetição, ou ainda por meio da desativação de apenas alguns genes dentro do mesmo loci, por meio, por exemplo, da intercalação de estados metilados e não metilados

(ELLIS et al., 1990).

A regulação desses genes pode acontecer em dois níveis diferentes, primeiro por meio do controle do acesso da RNA polimerase I aos sítios ativos (GRUMMT; PIKKARD, 2003) e, segundo, por meio do controle do número de genes de rDNA que estão em estado ativo e inativo, ou seja, um controle de dosagem. Em relação ao acesso da RNA polimerase I, nos eucariotos, há um controle da frequência de iniciação do processo de transcrição, presumivelmente dos genes que já se encontram em uma conformação descondensada e acessível à maquinaria de transcrição e não pela regulação da condensação e descondensação de vários genes ribossomais (GRUMMT; PIKKARD, 2003).

O controle de dosagem, amplamente descrito em híbridos e alopoliploides com dominância nucleolar, foi claramente evidenciado no trabalho desenvolvido por Lawrence e colaboradores (2004). Esses autores constataram, por meio da técnica de ChiP, que os genes ativos e dominantes de rDNA 45S no híbrido *Arabidopsis suecica* (*A. arenosa* x *A. thaliana*), advindos de *A. arenosa*, se associaram às marcas do tipo H3K4me2 (regiões eucromáticas) e também de H3K9me2 (regiões heterocromáticas). Este resultado sugere que somente parte das RONS de *A. arenosa* estão ativas, enquanto que o restante do sítio, presumivelmente em excesso, se encontra associado a marca de H3K9me2 (LAWRENCE et al., 2004).

De acordo com Chandrasekhara et al. (2016), para *A. thaliana*, o controle seletivo dos genes de rDNA que serão silenciados não se dá pelas diferenças nas sequências gênicas, mas sim pela existência de transposons associados à RON de determinado cromossomo. Para estes autores, o processo de heterocromatinização se inicia a partir do local onde os elementos transponíveis estão concentrados e possivelmente se estende por toda a RON, silenciando o loci. Muitas são as evidências que relacionam o importante papel de manutenção da estrutura silenciada da cromatina nos sítios de rDNA com estabilidade dessas sequências (SANTORO, 2011). Outros mecanismos pelos quais os genes rDNA tem sido seletivamente silenciados envolvem diferenças nas sequências gênicas que afetam o posicionamento dos nucleossomos (FELLE et al., 2010) ou o anelamento de bases dos RNAs regulatórios não codantes (PREUSS et al., 2008; SANTORO et al., 2010).

A comparação entre os resultados obtidos nesse estudo com aqueles obtidos

por Rocha et al. (2015) com coloração com nitrato de prata (bandamento Ag-NOR) para *L. perenne* cv. Ellet mostra que há um menor percentual de sítios ativos identificados pelas marcas epigenéticas de metilação na lisina 9 da histona H3 e na citosina. No estudo de Rocha et al. (2015), dentre sete sítios de rDNA 45S, foram identificados seis RONS ativos nas metáfases, o que indica uma utilização de aproximadamente 85% da capacidade de transcrição nessa espécie. Essa diferença entre as técnicas pode ser justificada pela maior precisão da imunolocalização para a identificação dos sítios aptos a transcrever. A marcação com nitrato de prata é a prova de ocorrência do processo de transcrição dos sítios na intérfase e evidencia, na metáfase, a existência de proteínas que ainda estão nas RONS, mas não consegue diferenciar os sítios de rDNA 45S que estão parcialmente ativos. Além disso, acordo com Dobigny et al. (2003), o nitrato de prata pode se ligar em outras regiões que não são RONS, mais especificamente a locais com alta densidade de heterocromatina, sendo, portanto, menos confiável.

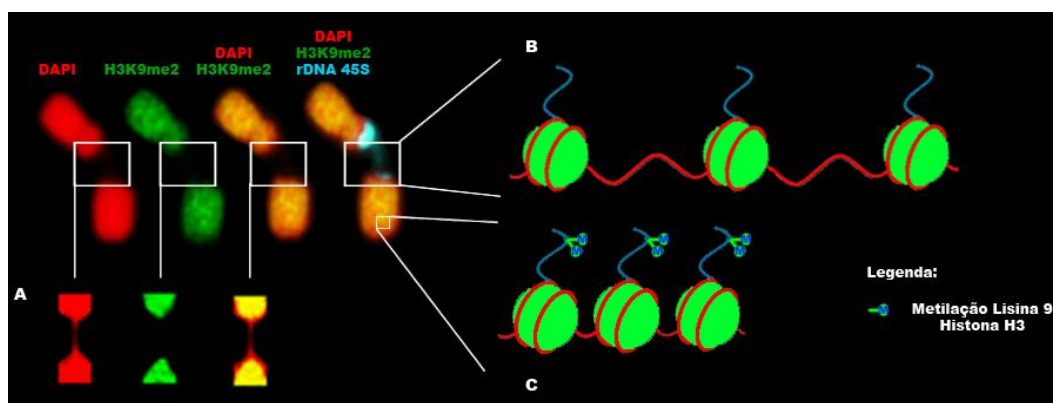
Sítios de rDNA 45S intranucleolares condensados hipermetilados como observado em *L. perenne*, também foram relatados nos trabalhos realizados em trigo (LEITCH et al., 1992; MORAIS-CECILIO et al., 2000; SILVA et al., 2008). Esses sítios, de acordo com Silva et al. (2008), referem-se a genes transcricionalmente inativos, justificando o alto grau de metilação das citosinas e o estado condensado proporcionado pela hipermetilação das histonas H3K9.

Nas metáfases mitóticas, os sítios com gaps e com cromatina estendida hipometilados e não metilados na H3K9 e na citosina eram, geralmente, DAPI- e CMA⁺ (ROCHA et al., 2016). Alguns autores como Heliot et al. (1997) mostraram que RONS nas metáfases se apresentam dez vezes menos compactadas do que uma cromatina condensada e medem 60-80 nm de diâmetro, similar ao observado por Huang et al. (2009) para os sítios estendidos nos cromossomos metafásicos de *L. perenne* cv. Accent. A presença de sítios estendidos com ocorrência natural nas metáfases também foi evidenciada em outras plantas, tais como *Citrus*, *Jatropha curcas*, *Nicotiana* e *Rhynchospora* (LAN et al., 2016; MARQUES et al., 2011; GONG et al., 2013; LIM et al., 2000; VANZELA et al., 1998).

Esses sítios de rDNA 45S com gap ou com fibra de DNA estendida presentes nos cromossomos metafásicos e que apresentam hipometilação ou não metilação, tanto

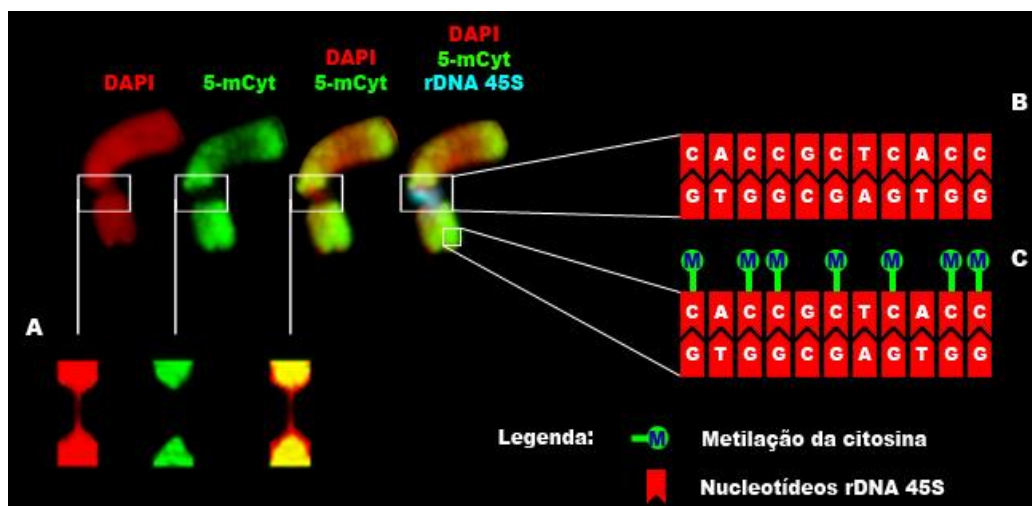
para H3K9 (FIGURA 9) quanto para citosina (FIGURA 10), estão aptos à transcrição. A mesma relação entre os baixos níveis de metilação das citosinas do DNA e das histonas (H3K9me2) com a descondensação dos sítios de rDNA no complexo *Lolium-Festuca*, foi observada em *Citrus* por Marques e colaboradores (2011). Esses autores encontraram sítios de rDNA descondensados e transcricionalmente ativos frequentemente associados com a hipometilação do DNA e da H3K9, enquanto que os sítios silenciados condensados estavam hipermetilados para ambas as marcas.

Figura 9 – Cromossomo individualizado com sítio de rDNA 45S não metilado e outra região cromossômica hipermetilada para H3K9. A: sítio de rDNA 45S com fibra de cromatina estendida não metilado; B: Representação esquemática da disposição dos nucleossomos no sítio de rDNA com fibra de cromatina estendida (descondensado e hipometilado) C: Representação esquemática da disposição dos nucleossomos no sítio de rDNA condensado e hipermetilado.



Fonte: Do autor (2017).

Figura 10 – Cromossomo individualizado com sítio de rDNA 45S não metilado e outra região cromossômica hipermetilada para 5-mCyt. A: sítio de rDNA 45S com gap não metilado; B: sítio de rDNA não metilado; C: região do cromossomo com as citosinas hipermetiladas



Fonte: Do autor (2017).

Huang e colaboradores (2012), ao estudarem a origem espontânea dos sítios frágeis em *Lolium*, induziram plantas de milho, cevada e arroz ao estresse transcricional por meio do tratamento com ActD e evidenciaram o aparecimento de sítios estendidos, assim como uma redução nos níveis de metilação do DNA (via sequenciamento bissulfito), dimetilação da H3K9 e um aumento nos níveis de acetilação na H4K5/H3K9 e dimetilação H3K4 por meio da técnica de ChiP. Para os autores esta caracterização epigenética resultou na incapacidade da cromatina se condensar normalmente, o que contribuiu para o aparecimento dos SFs na forma de sítios estendidos.

O status condensado/intacto dos sítios de rDNA associado com as hipermetilações do DNA e da H3K9 em cromossomos de *Lolium* e *Festuca* também foi evidenciado para outras espécies (MARQUES et al. 2011; GONG et al., 2013; LIM et al., 2000). A relação de dependência entre a metilação do DNA e a metilação da H3K9 foi descrita para o fungo filamentosso *Neurospora crassa* (TAMARU; SELKER, 2001; TAMARU et al., 2003) e de forma parcial para *A. thaliana* (JACKSON et al., 2002). A forma como essa relação é estabelecida dentro do genoma ainda não foi completamente elucidada. Um possível mecanismo que explica essa relação parte do pressuposto que a metilação da H3K9, catalisada pela enzima histona metiltransferase SUVH4/KYP, inicia pelo recrutamento, por meio de sinalização, da Cromometilase 3 (CMT3) que promove então a metilação do DNA (JACKSON et al., 2004; HE; CHEN; ZHU, 2011). A família de proteínas do tipo SUVH apresenta um domínio N-terminal SRA no qual se liga a citosina metilada (RAJAKUMARA et al., 2011). Essa

ligação permite que as metiltransferases adicionem o grupo metil às lisinas localizadas na posição nove da histona H3 (SAZE et al., 2012). Uma possível proteína que consegue também recrutar, a partir da identificação das histonas H3 metiladas, as DNA metiltransferases é a HP1 (Proteína da Heterocromatina 1), funcionando como outra rota possível para a metilação do DNA (FUKS; HURD; KOUZARIDES, 2003).

No ciclo celular, a manutenção do estado hipometilado para H3K9me2, visualmente percebido nos sítios de rDNA 45S com gaps e a presença do nucléolo até a pro-metáfase permitiu levantar duas hipóteses. A primeira é que, como já citado anteriormente e em outros trabalhos, a hipometilação do sítio favorece o estado ativo e apto à transcrever (MARQUES et al., 2011; HUANG et al., 2012). A manutenção desse estado epigenético dos sítios, assim como a conformação descondensada dos mesmos, pode evidenciar ainda uma possível atividade transcricional nas fases posteriores do ciclo celular, mesmo com a ausência de nucléolo, que é a prova visual de que alguns sítios de rDNA 45S estão ativos e transcrevendo e os pré-mRNAs sendo processados (OLSON; DUNDR; SZEBINI, 2000; STEPIŃSKI, 2014; HERNANDEZ-VERDUN, 2011).

A atividade dos sítios de rDNA durante as fases do ciclo celular, sem a formação de nucléolo foi constatada no estudo desenvolvido por Sirri, Roussel e Harnandez-Verdun (2000; 2002) trabalhando com célula HeLa. Eles conseguiram associar a ativação dos sítios com a inibição, via tratamento com roscovitina, do complexo cdc2-ciclina-B quinase, normalmente associado com a repressão dos genes ribossomais no ciclo celular. Nesse contexto, em todas as fases do ciclo celular foi evidenciada atividade transcricional dos sítios de rDNA, porém não foi constatado o processamento dos pré-mRNAs, ou seja, o transcrito se acumulou, não houve a formação das subunidades ribossomais e as proteínas não foram recrutadas, não havendo, portanto, a formação de nucléolo. Esses pré-mRNAs não processados podem ser importantes para a reconstrução da estrutura nucleolar nos próximos ciclos, já que dentre os vários modelos que explicam a nucleologênese, na maioria dos casos, um material pré-montado é necessário (VERHEGGEN et al., 1998). Tal fenômeno foi reportado em células de plantas e animais onde os pré-mRNAs foram importados da célula mãe para a célula filha durante a mitose, sendo estes transcritos não processados visualizados nos corpos pré-nucleolares (MEDINA; CERDIDO; FENÁNDEZ-

GÓMEZ, 1995; JIMÉNEZ-GARCIA et al., 1994). A necessidade de transcrição dos sítios de rDNA 45S ao longo de praticamente todo o ciclo celular, inclusive na fase S, já foi discutida por Dvořáčková, Fojtová e Jafkus (2015) como um mecanismo promotor de instabilidade para estes sítios, visto que a maquinaria de replicação e transcrição podem se sobrepor. Os autores, porém, apontam para a existência de um complexo mecanismo que assegura a transcrição sempre no mesmo sentido da replicação, evitando, portanto, a colisão.

A segunda hipótese está relacionada com a estrutura de heterocromatina presente nos sítios altamente repetitivos em tandem de rDNA 45S. Os sítios ativos, hipometilados para 5-mCyt e H3K9me2, que estão descondensados e transcrevendo na intérfase, contribuem para a formação das subunidades dos ribossomos e, conseqüentemente, a estrutura nucleolar (GUETG; SANTORO, 2012). No presente trabalho, os nucléolos foram visualizados até pró-metáfase o que indica que as RONS começam a se recondensar a partir dessa fase. A recondensação, pós transcrição e replicação dos sítios heterocromáticos é tardia e mais lenta (SAKOWICZ; OLSZEWSKA, 1997; GUSTAFSON; DERA; PETROVIC, 1988; FLAVELL, O'DELL; THOMPSON, 1997) o que pode ser uma explicação para a presença de sítios com gaps na c-metáfase, assim como proposto por Vanzela e colaboradores (1998) para *Rhynchospora pubera* e *R. riedeliana*, e também nas fases posteriores do ciclo celular. Tal condição justificaria a visualização dos diferentes tipos de sítios identificados para as espécies analisadas, inclusive os sítios condensados hipometilados. Sítios estendidos, com gaps ou condensados seriam diferentes estados do processo de recondensação, assim como proposto por Rocha e colaboradores (no prelo), os quais ainda não sofreram uma hipermetilação para ambas as marcas analisadas, como pôde ser evidenciado no presente estudo para espécies pertencentes ao complexo *Lolium-Festuca*.

6 CONCLUSÕES

Para todos os genótipos analisados houve variação no número de sítios de rDNA 45S, exceto para *F. arundinacea*.

Nos núcleos interfásicos, há uma relação direta entre a posição dos sítios de rDNA 45S com a atividade gênica, o que pôde ser evidenciando pelas marcas epigenéticas.

A metilação do DNA e a dimetilação da H3K9 tem papel fundamental no processo de determinação/manutenção do estado de condensação dos sítios de rDNA 45S, também associados à ocorrência dos SFs, nas espécies do complexo *Lolium-Festuca* nas c-metáfases e no ciclo celular, consequentemente, na aptidão ou não dos mesmos para transcrever.

As marcas epigenéticas estão diretamente associadas com as diferentes conformações dos sítios de rDNA 45S nos núcleos interfásicos e nas metáfases.

REFERÊNCIAS

- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T.; REINBERG, D.; CAPARROS, M. L. **Epigenetics**. New York: Cold Spring Harbor, 502 p. 2007.
- BULINSKA-RADOMSKA, Z.; LESTER, R. N. Intergeneric relationships of *Lolium*, *Festuca* and *Vulpia* (Poaceae) and their phylogeny. **Plant Syst. Evol.** 159:217–227, 1988.
- BUSTAMANTE, F.O.; TECHIO, V.H.; ROCHA, L.C.; TORRES, G.A.; DAVIDE, L.C.; MITTELMANN, A. Distribution of rDNA in diploid and poliploid *Lolium multiflorum* Lam. reveals fragile sites in 45S rDNA region. **Crop Science**, 2014.
- BÜTTEL, I.; FECHTER, A.; SCHWAB, M. Common fragile sites and cancer: targeted cloning by insertional mutagenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1028, n. 1, p. 14-27, 2004.
- CAPERTA, A. D.; NEVES, N.; MORAIS-CECÍLIO, L.; MALHÓ, R.; VIEGAS, W. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. **Journal of cell science**, v. 115, n. 14, p. 2839-2846, 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**, v. 56, p. 311-317, 1986.
- CARVALHO, P. C. F. ; SANTOS, D. T.; GONÇALVES, E. N. ; MORAES, A.; NABINGER, C. Forrageiras de Clima Temperado. In: Dilermando Miranda da Fonseca; Janaina Azevedo Martuscello. (Org.). **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, v. 1, p. 494-537, 2010.
- CHAMBEYRON, S.; BICKMORE, W.A. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. **Genes Dev** 18: 1119–1130, 2004.
- CHANDRASEKHARA, C.; MOHANNATH, G.; BLEVINS, T.; PONTVIANNE, F.; PIKAARD, C. S. Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in Arabidopsis. **Genes & development**, v. 30, n. 2, p. 177-190, 2016.
- CHELYSHEVA, L. A.; GRANDONT, L.; GRELON, M. Immunolocalization of meiotic proteins in Brassicaceae: Method 1. In: PAWLOWSKI, W. P.; GRELON, M.; ARMSTRONG, S. **Plant Meiosis: Methods and Protocols**. New York: Springer Science+Business Media, p.238, 2013.
- CHEN, M.; SHAOLEI, L. V.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. **Development Growth & Differentiation**, v. 52, p. 555 – 566, 2010.

- CHEN, T.; LI, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. **Current topics in developmental biology**, v. 60, p. 55-89, 2004.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A.; Genera graminum. **Grasses of the World. Kew bulletin additional series**, v. 13, 1986.
- COFFEE, B.; ZHANG, F.; CEMAN, S.; WARREN, S. T.; REINES, D. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 4, p. 923-932, 2002.
- COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.
- DENISON, S. R.; SIMPER, R. K.; GREENBAUM, I. F. How common are common fragile sites in humans: interindividual variation in the distribution of aphidicolin-induced fragile sites. **Cytogenetic and genome research**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 2003.
- DARBYSHIRE, S.J. Realignment of *Festuca* subgenus *Schedonorus* with the genus *Lolium* (Poaceae). - **Novon** 3: 239-243, 1993.
- DINELLI, G.; BONETTI, A.; MAROTTI, I.; MINELLI, M.; CATIZONE, P. Characterization of Italian populations of *Lolium* spp. resistant and susceptible to diclofop-methyl by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), **Weed Sci.**, 52, pp. 330–340, 2004.
- DOBIGNY, G.; OZOUF-COSTAZ, C.; BONILLO, C.; VOLOBOUEV, V. “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. **Cytogenetic and genome research**, v. 98, n. 1, p. 75-77, 2003.
- DUBCOVSKY, J.; DVORAK, J. Ribosomal-RNA multigene loci – nomads of the Triticeae genomes. **Genetics**, v.140, p. 1367-1377, 1995.
- DVOŘÁČKOVÁ, M.; FOJTOVÁ, M.; FAJKUS, J. Chromatin dynamics of plant telomeres and ribosomal genes. **The Plant Journal**, 2015.
- ELLIS, T. N.; DELSENY, M.; LEE, D.; BURCHAM, K. W. Methylated and undermethylated rDNA repeats are interspersed at random in two higher plant species. **Plant molecular biology**, v. 14, n. 1, p. 73-80, 1990.
- FELLE, M.; EXLER, J. H.; MERKL, R.; DACHAUER, K.; BREHM, A.; GRUMMT, I.; LÄNGST, G. DNA sequence encoded repression of rRNA gene transcription in chromatin. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 16, p. 5304-5314, 2010.
- FINNEGAN, E. J.; GENGER, R. K.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. DNA methylation in plants. **Annual review of plant biology**. v. 49, n. 1, p. 223-247, 1998.
- FINNEGAN, E. J.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, v. 93, n. 16, p. 8449-8454, 1996.

FLAVELL, R. B.; O'DELL, M.; THOMPSON, W. F. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. **Journal of molecular biology**, v. 204, n. 3, p. 523-534, 1988.

FUCHS, J.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. Chromosomal histone modification patterns: From conservation to diversity. **Trends in plant science**, London, v. 11, n. 4, p. 199-208, 2006.

FUKS, F.; HURD P. J.; DEPLUS, R.; KOUZARIDES, T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 9, p. 2305-2312, 2003.

GEHRING, M.; HENIKOFF, S. DNA methylation dynamics in plant genomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1769, n. 5, p. 276-286, 2007.

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

GONG, Z.; XUE, C.; ZHANG, M.; GUO, R.; ZHOU, Y.; SHI, G. Physical localization and DNA methylation of 45S rRNA gene loci in *Jatropha curcas* L. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e84284, 2013.

GRUMMT, I; PIKAARD, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 8, p. 641-649, 2003.

GUETG, C.; SANTORO, R. Formation of nuclear heterochromatin: the nucleolar point of view. **Epigenetics**, v. 7, n. 8, p. 811-814, 2012.

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

GUSTAFSON, J. P.; DERA, A. R.; PETROVIC, S. Expression of modified rye ribosomal RNA genes in wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 11, p. 3943-3945, 1988.

HARPER, J. A.; THOMAS, I. D.; LOVATT, J. A.; THOMAS, H. M. Physical mapping of rDNA sites in possible diploid progenitors of polyploid *Festuca* species. **Plant Systematics and Evolution**, v. 245, n. 3-4, p. 163-168, 2004.

HE, X. J.; CHEN, T.; ZHU, J. K. Regulation and function of DNA methylation in plants and Animals. **Cell research**, v. 21, p. 442-465, 2011.

HELIOT, L.; KAPLAN, H.; LUCAS, L.; KLEIN, C.; BEORCHIA, A.; DOCO-FENZY, M; MENAGER, M.; THIRY, M.; O'DONOHUE, M.; PLOTON, D. Electron

tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. **Molecular biology of the cell**, v. 8, n. 11, p. 2199-2216, 1997.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. **Nucleus**, v. 2, n. 3, p. 189-194, 2011.

HOUBEN, A.; DEMIDOV, D.; CAPERTA, A. D.; KARIMI, R.; AGUECI, F.; VLASENKO, L. Phosphorylation of histone H3 in plants - A dynamic affair. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1769, p. 308 – 315, 2007

HUANG, J.; MA, L.; SUNDARARAJAN, S.; FEI, S.; LI, L. Visualization by atomic force microscopy and FISH of the 45S rDNA gaps in mitotic chromosomes of *Lolium perenne*. **Protoplasma**, v. 236, 59–65, 2009.

HUANG, J.; MA, L.; YANG, F.; FEI, S.; LI, L. 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**, v. 3, p.e 2167, 2008.

HUANG, M.; LI, H.; ZHANG, L.; GAO, F.; WANG, P.; HU, Y.; YAN, S.; ZHAO, L.; ZHANG, Q.; TAN, J.; LIU, X.; HE, S.; LI, L. Plant 45S rDNA Clusters Are Fragile Sites and Their Instability Is Associated with Epigenetic Alterations. **PLoS One**. v. 7, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sidra – Banco de dados agregados. Brasília: IBGE, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

JACKSON, J. P.; JOHNSON, L.; JASENCAKOVA, Z.; ZHANG, X.; PEREZBURGOS, L.; SINGH, P. B.; CHENG, X.; SCHUBERT, I.; JENUWEIN, T.; JACOBSEN, S. E. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. **Chromosoma**, v. 112, p. 308–315, 2004.

JACKSON, J. P.; LINDROTH, A. M.; CAO, X.; JACOBSEN, S. E. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 556-560, 2002.

JASENCAKOVA, Z.; MEISTER, A.; WALTER, J.; TURNER, B. M.; SCHUBERT, I. Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. **The Plant Cell**, v. 12, n. 11, p. 2087-2100, 2000.

JASENCAKOVA, Z.; SOPPE, W. J.; MEISTER, A.; GERNAND, D.; TURNER, B. M.; SCHUBERT, I. Histone modifications in *Arabidopsis*—high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. **The Plant Journal**, v. 33, n. 3, p. 471-480, 2003.

JAUHAR, P. P. Cytogenetics of the Festuca-Lolium complex: Relevance to breeding.

Springer-Verlag, Berlin. 1993.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics of the Festuca-Lolium complex: relevance to breeding**. Springer Science & Business Media, 2012.

JIMÉNEZ-GARCÍA, L. F.; SEGURA-VALDEZ, M. D. L.; OCHS, R. L.; ROTHBLUM, L. I.; HANNAN, R.; SPECTOR, D. Nucleologenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 5, n. 9, p. 955-966, 1994.

JIN, W.; LAMB, J. C.; ZHANG, W.; KOLANO, B.; BIRCHLER, J. A.; JIANG, J. Histone modifications associated with both A and B chromosomes of maize. **Chromosome research**, v. 16, n. 8, p. 1203-1214, 2008.

JOHNSON, L.; MOLLAH, S.; GARCIA, B. A.; MURATORE, T. L.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; JACOBSEN, S. E.; Mass spectrometry analysis of Arabidopsis histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 22, p. 6511-6518, 2004.

KOPECKÝ, D.; LUKASZEWSKI, A. J.; DOLEZEL, J. Cytogenetics of Festulolium (*Festuca x Lolium* hybrids). In: PUERTAS, M. J.; NARANJO, T. **Reviews in Plant cytogenetics**, (Reprint of Cytogenetics and Genome Research, v. 120, n. 3-4, 2008). Switzerland: Karger, p. 370-383, 2008.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, p. 693 – 705, 2007.

KSIĄŻCZYK, 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**, v. 51, n. 4, p. 449-460, 2010.

KSIĄŻCZYK, T.; ZWIERZYKOWSKA, E.; MOLIK, K.; TACIAK, M.; KRAJEWSKI, P.; ZWIERZYKOWSKI, Z. Genome-dependent chromosome dynamics in three successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* × *Lolium perenne* hybrid. **Protoplasma**, p. 1-12, 2014.

LAN, H.; CHEN, C. L.; MIAO, Y.; YU, C. X.; GUO, W. W.; XU, Q.; DENG, X. X. Fragile Sites of ‘Valencia’ Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Chromosomes Are Related with Active 45s rDNA. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0151512, 2016.

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular cell**, v. 13, n. 4, p. 599-609, 2004.

LEITCH, A. R.; MOSGOLLER, W.; SHI, M.; HESLOP-HARRISON, J. S. Different patterns of rDNA organization at interphase in nuclei of wheat and rye. **Journal of**

Cell Science, v. 101, n. 4, p. 751-757, 1992.

LEMOINE, F. J.; DEGTYAREVA, N. P.; LOBACHEV, K.; PETES, T. D. Chromosomal translocations in yeast induced by low levels of DNA polymerase: a model for chromosome fragile sites. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 587-598, 2005.

LEWIN, B. **Genes VIII**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004. 1027p.

LIDDLE, R. A.; JIRTLE, R. L. Epigenetic silencing of genes in human colon cancer. **Gastroenterology, Philadelphia**, v. 131, p. 960-962, 2006.

LIM, K. Y.; KOVARIK, A.; MATÝÁSEK, R.; BEZDĚEK, M.; LICHTENSTEIN, C. P.; LEITCH, A. R. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. **Chromosoma**, v. 109, n. 3, p. 161-172, 2000.

LOOS, B. P. Allozyme variation within and between populations in *Lolium* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 188, p. 101-113, 1993.

LUCZAK, M. W.; JAGODZINSKI, P. P. The role of DNA methylation in cancer development. **Folia histochemica et cytobiologica**, Warszawa, v. 44, p. 143-154, 2006.

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

MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. **Genome**, v. 36, n. 4, p. 774-781, 1993.

MARQUES, A.; FUCHS, J.; MA, L.; HECKMANN, S.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. Characterization of eu- and heterochromatin of Citrus with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. **Cytogenetic and genome research**, v. 134, n. 1, p. 72-82, 2011.

McCLINTOCK, B. The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, Viena, v. 21, p. 294-328, 1934.

MCSTAY, B.; GRUMMT, I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 24, p. 131-157, 2008.

MEDINA, F. J.; CERDIDO, A.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, M. E. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. **Experimental cell research**, v. 221, n. 1, p. 111-125, 1995.

MORAIS-CECILIO, L.; DELGADO, M.; JONES, R. N.; VIEGAS, W. Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. **Chromosome Research**, v. 8, n. 4, p. 341-351, 2000.

NANI, T. F.; PEREIRA, D. L.; SOUZA SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Physical Map of Repetitive DNA Sites in spp.: Intravarietal and Interspecific polymorphisms. **Crop Science**, Madison, v.56, p. 1-15, 2016.

NEVES, N. et al. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 104-111, 2005.

OLIVEIRA, J. C. P.; DUTRA, G. M.; MORAES, C. O. C. **Alternativas forrageiras para sistemas de produção pecuária**. Embrapa Pecuária Sul, 2001.

OLSON, M. O. J.; DUNDR, M.; SZEBENI, A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. **Trends in cell biology**, v. 10, n. 5, p. 189-196, 2000.

PAULA, C. M. P.; SOUZA SOBRINHO, F.; TECHIO, V. H. Chromosomal distribution of H3K4me2, H3K9me2 and 5-methylcytosine: variations associated with polyploidy and hybridization in Brachiaria (Poaceae). **Plant Cell Reports**, p. 1-11, 2016.

PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. T. M.; DAVIDE, L. C.; PASQUAL, M.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Chromosome duplication in *Lolium multiflorum* Lam. **Crop Breeding and applied Biotechnology**. V. 14, n. 4, p. 251-255, 2014.

PIKAARD, C. S. Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. **The Arabidopsis Book**, p. e0083, 2002.

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

PREUSS, S. B.; COSTA-NUNES, P.; TUCKER, S.; PONTES, O.; LAWRENCE, R. J.; MOSHER, R.; KASSCHAU, K.D.; CARRINGTON, J. C.; BAULCOMBE D. C.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. **Molecular cell**, v. 32, n. 5, p. 673-684, 2008.

RAGLAND, R.L.; GLYNN, M.W.; ARLT, M.F.; GLOVER, T.W. Stably transfected common fragile site sequences exhibit instability at ectopic sites. **Gene Chromosome Canc**, v. 47, p. 860-872, 2008.

RAJAKUMARA, E.; LAW, J.A.; SIMANSHU, D.K; VOIGT, P.; JOHNSON, L.M.; REINBERG, D.; PATEL, D. J.; JACOBSEN, S. E. A dual flip-out mechanism for 5mC recognition by the *Arabidopsis* SUVH5 SRA domain and its impact on DNA methylation and H3K9 dimethylation in vivo. **Genes Dev**, v. 25, p. 137-152, 2011.

- RAVEENDRANATHAN, M.; CHATTOPADHYAY, S.; BOLON, Y. T.; HAWORTH, J.; CLARKE, D. J.; BIELINSKY, A. K. Genome-wide replication profiles of S-phase checkpoint mutants reveal fragile sites in yeast. **The EMBO journal**, v. 25, n. 15, p. 3627-3639, 2006.
- REIS, G. B.; MESQUITA, A. T.; TORRES, G. A.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; VANDER PEREIRA, A.; DAVIDE, L. C. Genomic homeology between *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum* (Poaceae). **Comparative Cytogenetics**, Sofia, v. 3, n. 3, p. 31-41, 2014.
- RICHARDS, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 6, p.339-45, 2001.
- ROCHA, L. C.; BUSTAMANTE, F. O.; DUARTE, R. A. S.; TORRES, G. A.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, v. 252, p. 451-460, 2015.
- ROCHA, L. C.; JANKOWSKA, M.; FUCHS, J.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H.; HOUBEN, A. Decondensation of chromosomal 45S rDNA sites in *Lolium* and *Festuca* genotypes does not result in karyotype instability. **Protoplasma**, p. 1-8, 2016.
- ROCHA, L. C.; SILVA, G. A.; BUSTAMANTE, F.; SILVEIRA, R. A. D.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Dynamics of 45S rDNA sites in the cell cycle: fragile sites and chromosomal stability in *Lolium* and *Festuca*. **Genetics and molecular research**. No prelo.
- RUIZ-HERRERA, A.; GARCIA, F.; FRÖNICKE, L.; PONSÀ, M.; EGOZCUE, J.; CALDÉS, M. G.; STANYON, R. Conservation of aphidicolin-induced fragile sites in *Papionini* (Primates) species and humans. **Chromosome Research**, v. 12, n. 7, p. 683-690, 2004.
- SAKOWICZ, T.; OLSZEWSKA, M. J. DNA content, interphase AgNOR-area, number of 3HrDNA hybridization signals and the methylation level in coding rDNA sequence in different organs of *Lupinus luteus* L. **Genetica**, v. 99, n. 1, p. 67-72, 1997.
- SANTORO, R. The epigenetics of the nucleolus: structure and function of active and silent ribosomal RNA genes. In: **The Nucleolus**. Springer New York, 2011. p. 57-82.
- SANTORO, R.; SCHMITZ, K. M.; SANDOVAL, J.; GRUMMT, I. Intergenic transcripts originating from a subclass of ribosomal DNA repeats silence ribosomal RNA genes in trans. **EMBO reports**, v. 11, n. 1, p. 52-58, 2010.
- SAZE, H.; TSUGANE, K.; KANNO, T.; NISHIMURA, T. DNA methylation in plants: Relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposons inactivation. **Plant Cell Physiol**, v. 53, p. 766-784, 2012.

- SCHUBERT, I.; WOBUS, U. In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, v. 92, p. 143-148, 1985.
- SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus Organizer Regions and Nucleoli. **Human Genetic**, New York, v. 63, p. 89-99, 1983.
- SHARMA, S. K.; YAMAMOTO, M.; MUKAI, Y. Immuno-cytogenetic manifestation of epigenetic chromatin modification marks in plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 291-301, 2015.
- SHAW, P.; RAWLINS, D.; HIGHETT, M. Nuclear and nucleolar structure in plants. **John Innes Review–The Chromosome**, p. 161-171, 1993.
- SILVA, M.; PEREIRA, H. S.; BENTO, M.; SANTOS, A. P.; SHAW, P.; DELGADO, M.; NEVES, N.; VIEGAS, W. Interplay of ribosomal DNA loci in nucleolar dominance: dominant NORs are up-regulated by chromatin dynamics in the wheat-rye system. **PLoS One**, v. 3, n. 12, 2008.
- SIRRI, V.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. **The Journal of cell biology**, v. 156, n. 6, p. 969-981, 2002.
- SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. **The Journal of cell biology**, v. 148, n. 2, p. 259-270, 2000.
- SINGH, M.; BARMAN, A. S. Chromosome breakages associated with 45S ribosomal DNA sequences in spotted snakehead fish *Channa punctatus*. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 1, p. 723-729, 2013.
- ŠMARDA, P.; STANČÍK, D. Ploidy Level Variability in South American Fescues (*Festuca* L., Poaceae): Use of Flow Cytometry in Up to 5 ½-Year-Old Caryopses and Herbarium Specimens. **Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2006.
- STEPIŃSKI, Dariusz. Functional ultrastructure of the plant nucleolus. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1285-1306, 2014.
- SUZUKI, G.; SHIOMI, M.; MORIHANA, M. Y.; MUKAI, Y. DNA methylation and histone modification in onion chromosomes. **Genes Gent Syst**, v. 85, p. 377-382, 2010.
- TAMARU, H.; SELKER, E. U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 414, n. 6861, p. 277-283, 2001.
- TAMARU, H.; ZHANG, X.; MCMILLEN, D.; SINGH, P. B.; NAKAYAMA, J. I.; GREWAL, S. I.; C. DAVID ALLIS; CHENG, X.; SELKER, ERIC U. Trimethylated

lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. **Nature genetics**, v. 34, n. 1, p. 75-79, 2003.

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

THOMAS, H. M.; MORGAN, W. G.; MEREDITH, M. R.; HUMPHREYS, M. W.; LEGGETT, J. M. Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* by genomic in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, n. 8, p. 909-913, 1994.

THOMAS, H. M.; HARPER, J. A.; MEREDITH, M. R.; MORGAN, W. G.; THOMAS, I. D.; TIMMS, E.; KING, I. P. Comparison of ribosomal DNA sites in *Lolium* species by fluorescence in situ hybridization. **Chromosome Research**, v.4, p.486-490, 1996.

THOMAS, H. M.; HARPER, J.A.; MEREDITH, M.R.; MORGAN, W.G.; KING, I.P. Physical mapping of ribosomal DNA sites in *Festuca arundinacea* and related species by in situ hybridization. **Genome**, v. 40, p. 406–410, 1997.

THOMAS, H. M.; HARPER, J.A.; MORGAN, W. Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. **Chromosome Re**, 9: 585-590, 2001.

THOROGOOD, D. Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Turfgrass biology, genetics, and breeding**. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ, p. 75-106, 2003.

VANZELA, A. L. L.; CUADRADO, A.; JOUVE, N.; LUCEÑO, M.; GUERRA, M. Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Chromosome Research**, v. 6, n. 5, p. 345-350, 1998.

VERHEGGEN, C.; LE PANSE, S.; ALMOUZNI, G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Presence of pre-rRNAs before activation of polymerase I transcription in the building process of nucleoli during early development of *Xenopus laevis*. **The Journal of cell biology**, v. 142, n. 5, p. 1167-1180, 1998.

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

WIESNER, I.; SAMEC, P.; NAŠINEC, V. Identification and relationships of cultivated accessions from *Lolium-Festuca* complex based on RAPD fingerprinting. **Biologia plantarum**, v. 37, n. 2, p. 185-195, 1995.

WOLNY, E.; HASTEROK, R. Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. **Annals of Botany** 104: 873–881, 2009.

YAMADA, T.; FORSTER, J. W.; HUMPHREYS, M. W.; TAKAMIZO, T. Genetics

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

YUNIS, J. J.; SORENG, A. L. Constitutive fragile sites and cancer. **Science**, v. 226, n. 4679, p. 1199-1204, 1984.

ZHANG, X. **Chromatin modifications in plants**. Springer Vienna, p. 237-255, 2012.

FIGURA SUPLEMENTAR

Figura suplementar – Coloração com Nitrato de Prata (Ag-NOR) em *L. multiflorum* cv. Ponteio 9 evidenciado a presença de nucléolo até a pró-metáfase.

L. multiflorum - Ponteio 9



Legenda: Letras A e B: prófase e pró-metáfase, respectivamente, com a presença do nucléolo; Letra C: metáfase sem nucléolo. Barra: 5µm Fonte: Do autor (2017).