



BEATRIZ PANEGASSI DE SOUZA

**PERFIL DOS SÍTIOS DE rDNA 35S DE *LOLIUM
MULTIFLORUM* LAM. APÓS O USO DO INIBIDOR
TRANSCRICIONAL ACTINOMICINA D**

LAVRAS-MG

2019

BEATRIZ PANEGASSI DE SOUZA

**PERFIL DOS SÍTIOS DE rDNA 35S DE *LOLIUM MULTIFLORUM* LAM.
APÓS O USO DO INIBIDOR TRANSCRICIONAL ACTINOMICINA D**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharel.

Dra. Laiane Corsini Rocha

Orientadora

Dra. Vânia Helena Techio

Coorientadora

LAVRAS-MG

2019

BEATRIZ PANEGASSI DE SOUZA

**PERFIL DOS SÍTIOS DE rDNA 35S DE *LOLIUM MULTIFLORUM* LAM.
APÓS O USO DO INIBIDOR TRANSCRICIONAL ACTINOMICINA D**

**PROFILE OF *LOLIUM MULTIFLORUM* LAM. rDNA 35S SITES AFTER
ACTINOMYCIN D TRANSCRIPTION INHIBITOR USAGE**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 05 de dezembro de 2019.

Prof. Dra. Vânia Helena Techio DBI/UFLA

Dra. Laiane Corsini Rocha DBI/UFLA

Ms. Marco Túlio Mendes Ferreira DBI/UFLA

Dra. Laiane Corsini Rocha

Orientadora

Dra. Vânia Helena Techio

Coorientadora

LAVRAS-MG

2019

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, por possibilitar minha formação.

À FAPEMIG e ao CNPq pela concessão de bolsas de estudo.

À professora Vânia, por ter me acolhido no Laboratório de Citogenética, proporcionado oportunidades incríveis e por toda a experiência que isso me trouxe.

Ao grupo da Citogenética, por todo aprendizado e risadas compartilhadas, em especial a Ana Luisa pelas conversas, pelas piadas e por todo apoio que me deu.

Ao Marco, que sempre esteve disposto a me ajudar em tudo que eu precisei.

À Laiane, por ter sido uma ótima orientadora e amiga! Obrigada por ter contribuído tanto para minha formação, você é uma ótima profissional e eu te admiro demais.

Aos amigos de graduação Jonathan, Vitória e Ana Luiza por caminharem comigo desde o início e por compartilharem tudo de bom e de ruim que a graduação tem a oferecer.

Às meninas da República Tomara Que Caia, que me receberam em Lavras como parte da família, carrego um pedacinho de cada uma de vocês comigo. Medina e Amana, obrigada por terem sido tão maravilhosas comigo!

Ao Luiz, meu irmão de vida. Você não imagina o quanto eu te admiro e tudo que você significa pra mim. Que nossa amizade seja sempre tão boa quanto tem sido, e que eu possa acompanhar suas conquistas sempre de perto! Amo você Xinxá.

À Franciely, que têm me acompanhado nesses últimos períodos, me dando forças, abrigo e conselhos. Obrigada por ser essa mulher incrível e estar ao meu lado todos os dias, em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Lívia e Letícia, que são tudo pra mim e me inspiram a ser uma pessoa cada dia melhor. Vocês são a melhor coisa da minha vida.

Aos meus pais, por nunca medirem esforços ao me ajudar, por serem sempre tão presentes, sempre tão atenciosos e maravilhosos! Sou extremamente grata por toda a confiança que vocês têm em mim. Obrigada por acreditarem no meu sonho e por torna-lo possível, eu amo vocês incondicionalmente.

RESUMO

No gênero *Lolium*, o número, distribuição e comportamento dos sítios rDNA 35S têm sido bastantes estudados. Os sítios de rDNA 35S de *Lolium multiflorum* Lam., apresentam “gaps” na cromatina dos cromossomos e em núcleos interfásicos e metáfases mitóticas, fato este que tem sido associado à expressão da fragilidade, denominados sítios frágeis (SF), relacionada à intensa atividade transcricional. A actinomicina D (ActD), um inibidor transcricional, permite manipular a expressão desses sítios de rDNA para melhor entender a biologia dessa região. Para avaliar os efeitos da inibição da transcrição com ActD sobre os sítios de rDNA 35S de *L. multiflorum*, utilizou-se a marcação dos sítios de rDNA 35S via Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) e a coloração Ag-NOR para visualizar os nucléolos. Para isso, sementes dessa espécie foram previamente germinadas e tratadas com ActD nas concentrações de 15 e 30ug/mL durante 48h. Parte do experimento foi mantido como controle negativo. Foram avaliadas metáfases/prometáfases quanto ao número de sítios rDNA 35S e quanto à presença de lesões (gap/constricção), também foram analisados os números de sinais 35S em núcleos interfásicos. Quanto aos nucléolos, contabilizou-se o número de nucléolos por núcleo e a proporção da área nucleolar em relação à área total do núcleo. O número de nucléolos não apresentou ampla diferença em relação ao tratamento controle. Já a porcentagem de área nucleolar foi afetada nas concentrações usadas, sendo aumentada quando dois nucléolos estavam presentes na concentração de 30 e diminuída quando havia três nucléolos, isso quando comparados a área de um e dois nucléolos/núcleo. Nos núcleos interfásicos, tanto o controle quanto a concentração de 15ug/mL apresentaram maior número de sinais de rDNA 35S, mas esse aumento foi mais pronunciado na concentração de 30ug/mL. Quanto aos sítios de rDNA 35S observados em prometáfase/metáfase, houve uma maior porcentagem de lesões (gaps e constricções) na concentração de 30ug/mL, seguida pela concentração de 15ug/mL e, por fim, pelo controle. O conjunto de resultados indicam que o tratamento com ActD promoveu alterações sutis em *L. multiflorum*, em relação à estudos anteriores realizados com outras espécies de gramíneas. Técnicas mais apuradas, como a PCR quantitativa, poderão trazer respostas mais concretas quanto ao nível de inibição transcricional causada pelas diferentes concentrações de ActD nos sítios de rDNA 35S de *L. multiflorum*.

Palavras-chave: Gene ribossomal; Sítios frágeis; Organização nucleolar.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1 Características gerais e importância do gênero <i>Lolium</i>	6
2.2 Características citogenéticas e aspectos dos sítios de rDNA 35S de <i>Lolium</i>	7
2.3 A importância dos genes ribossomais e os sítios frágeis em humanos e em plantas.....	9
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Local.....	12
4.2 Material vegetal.....	12
4.3 Tratamento com Actinomicina D.....	13
4.4 Preparo das lâminas, coloração com nitrato de prata e avaliação.....	13
4.5 Análises citogenéticas.....	13
4.5.1 Obtenção de C-metáfases.....	13
4.5.2 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	14
5 RESULTADOS	14
6 DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Lolium multiflorum Lam. ($2n=2x=14$) é uma gramínea nativa da bacia do Mediterrâneo, mas com ampla distribuição em regiões de clima temperado. Tal espécie, também conhecida como azevém, possui características agrônômicas de interesse, como elevada produtividade, alto valor nutritivo e fácil estabelecimento, tornando-o adequado para a pecuária. (TERREL, 1968; POLOK, 2007).

Tipicamente *L. multiflorum* apresenta seis sítios rDNA 35S, localizados na região intersticial do braço longo dos cromossomos, podendo ocorrer variações de cinco a oito entre genótipos (THOMAS et al., 1996; BUSTAMANTE et al., 2014). Os sítios de rDNA 35S estão entre as regiões mais amplamente estudadas em eucariotos (ROA; GUERRA, 2012). As pesquisas sobre o número, distribuição e comportamento dos sítios de rDNA 35S em espécies do gênero *Lolium* L. mostram que elas podem ser utilizadas como um bom modelo para o entendimento da expressão dos genes ribossomais. Estudos têm relatado que, nas espécies desse gênero, os sítios de rDNA 35S costumam ser vistos nos núcleos interfásicos e nas metáfases mitóticas apresentando “gaps” na cromatina e nos cromossomos sendo, por esse motivo, inicialmente tratados como sítios frágeis (SFs) (HUANG et al., 2008; 2009; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015; ROCHA et al., 2016; ROCHA et al., 2017a; 2017b). Quando não há manifestação da fragilidade, os sítios de rDNA 35S são considerados intactos, condensados e com sinais FISH 35S íntegros (HUANG et al., 2008; 2009; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015; ROCHA et al., 2016; ROCHA et al., 2017a; 2017b). A ocorrência dos gaps nos sítios de rDNA 35S de plantas têm sido associada à intensa atividade transcricional, a qual foi verificada por meio da coloração com nitrato de prata (Ag-NOR) e por marcas epigenéticas (HOWELL E BLACK, 1980; HUANG et al., 2012; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015; FERREIRA et al., 2018).

A manipulação da maquinaria da transcrição pode ser feita pelo uso de compostos químicos. Uma das drogas mais utilizadas para a inibição da transcrição é a actinomicina D (ActD) (BENSAUDE, 2011) que atua diretamente inibindo a elongação dos transcritos no rDNA 35S dependente de RNA Polimerase I, levando à interrupção da biogênese dos ribossomos (PERRY; KELLEY, 1970).

Huang et al. (2012), com a intenção de averiguar a relação entre as alterações epigenéticas envolvidas na expressão de sítios frágeis, testaram actinomicina D (ActD, inibidor transcricional) em gramíneas como milho, arroz, cevada e sorgo e observaram que a ActD promoveu altas proporções de quebras e lesões nos sítios de rDNA 35S. Acompanhado a isso,

os autores relataram a diminuição de histonas H3K9ac, H3K9me2, consistente com a descondensação, hipometilação de sequencias C-G e presença de histonas γ H2AX, uma variante da histona H2A fosforilada que serve como uma marca para detectar quebras na dupla fita do DNA. O mesmo padrão de metilação foi observado por Ferreira et al. (2018) em *L. multiflorum* e *L. perenne* não submetidos a tratamentos de inibição transcricional. Huang et al. (2012) também realizaram experimentos com ActD em *Lolium* e, embora os autores tenham relatado os efeitos em células tratadas com esta droga, não foram realizadas quantificações acerca destes efeitos.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar, em células de *Lolium multiflorum* Lam., os efeitos dos tratamentos com actinomicina D (ActD) sobre os sítios de rDNA 35S através da FISH, bem como a organização nucleolar empregando coloração com nitrato de prata (Ag-NOR).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais e importância do gênero *Lolium*

No gênero *Lolium* L. (família Poaceae Barnhart. Tribo Poeae Brown.) encontram-se oito espécies de gramíneas forrageiras, que são divididas em dois grupos de acordo com o modo de reprodução. O primeiro grupo é constituído de quatro espécies autógamas (*L. loliaceum* Bory e Chaub., *L. temulentum* L., *L. persicum* Boiss e Hohen., *L. remotum* Schrank.) e o segundo de três espécies alógamas (*L. perenne* L., *L. multiflorum* Lam., *L. rigidum* Gaudich). Há uma exceção, a espécie *L. canariense* Steud., que apresenta modo de reprodução intermediário com moderado grau de fertilização cruzada (TERREL, 1968; POLOK, 2007).

Estas gramíneas forrageiras, são nativas da bacia do Mediterrâneo (Europa Ásia Temperada e Norte da África) mas com ampla distribuição em regiões de clima temperado. Dentre elas destaca-se *L. multiflorum* ($2n=2x=14$), também conhecida como azevém anual, que apresenta boas características agrônômicas, como alto valor nutritivo, fácil estabelecimento e elevada produtividade. Tais características tornam-no um azevém adequado para a pecuária, com destaque para sua produção na região Sul do Brasil (TERREL, 1968; POLOK, 2007; CARVALHO et al., 2010).

Devido à importância econômica do gênero *Lolium*, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de gerar novas informações acerca das espécies deste gênero. Estudos desenvolvidos desde a metade do século passado tem gerado importantes informações, como por exemplo,

número cromossômico, construção de cariótipo, comportamento meiótico e identificação de regiões organizadoras do nucléolo (RONS), constituindo uma base de dados ampla sobre a estrutura genética desse grupo (MALIK; THOMAS, 1966; THOMAS et al., 1996; TECHIO et al., 2010; THOMAS, 1981; KOPECKÝ et al., 2010; ROCHA et al., 2015; FERREIRA et al., 2018).

2.2 Características citogenéticas e aspectos dos sítios de rDNA 35S de *Lolium*

As oito espécies que constituem o gênero *Lolium* são diploides, com $2n=2x=14$ e algumas cultivares obtidas pela indução da duplicação cromossômica, são poliploides (POLOK, 2007). Malik e Thomas (1966) estão entre os primeiros autores a descrever o cariótipo de *Lolium*. Para *L. multiflorum*, os autores identificaram três pares de cromossomos submetacêntricos com constrições secundárias (regiões organizadoras do nucléolo, RONS) localizadas próximas às regiões centroméricas, um grande par metacêntrico e três pares menores submetacêntricos. Estudos mais recentes sobre *L. multiflorum* (cv. Prolog) identificaram três pares cromossômicos metacêntricos, três pares submetacêntricos com constrição secundária e um par submetacêntrico (KOPECKÝ et al., 2010).

As proteínas associadas à NOR têm afinidade pela prata redutora sob condições ácidas, permitindo que sejam usadas como bons marcadores para distinguir genes de rRNA ativamente transcritos dos inativos em cromossomos mitóticos (HUANG et al., 2012). Por esse motivo, a técnica Ag-NOR tem sido utilizada para averiguar a transcrição, para contabilizar o número de nucléolos de uma célula e avaliar sua morfologia.

Em *Lolium multiflorum*, por meio da coloração com nitrato de prata (Ag-NOR), foram observados de um a seis nucléolos/núcleo, além disso, foram identificadas nos cromossomos seis bandas Ag-NOR intersticiais, demonstrando a natureza das constrições secundárias como organizadores nucleolares ativos transcricionalmente (CARNIDE; ORELLANA, 1986; CARNIDE; ORELLANA; RIBERO, 1986). A Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH) é uma técnica molecular que conta com a utilização de sondas para a detecção de sequências específicas do genoma, denominadas de sequência-*alvo*. Na citogenética vegetal, a FISH tem sido utilizada com diversas finalidades, como por exemplo na identificação cromossômica, na citotaxonomia e até mesmo para a diferenciação de genomas em híbridos. Uma das sequências mais utilizadas para a identificação cromossômica é o rDNA 35S (GUERRA, 2004; THOMAS et al., 1996; BUSTAMANTE et al., 2014).

A presença de RONS, identificadas pela coloração Ag-NOR nos três pares cromossômicos de *L. multiflorum*, foi confirmada por meio da FISH com sonda de rDNA 35S (THOMAS et al., 1996). Através dessa mesma técnica, o mapa físico dos genes rDNA 18S, 5.8S, 26S e 5S foi construído nos cromossomos de sete taxa do gênero *Lolium*. Os sítios 18S, 5.8S, 26S, que correspondem ao rDNA 35S, foram localizados em dois pares de cromossomos nas espécies autógamas (*L. temulentum*, *L. remotum*, *L. persicum*, *L. rigidum* e *L. rigidum* var. *rottbollioides*). Das espécies alógamas, *L. multiflorum* apresentou seis sítios, *L. perenne* apresentou sete e *L. rigidum* var. *rigidum* foram observados nove sítios, todos localizados na região intersticial do braço cromossômico. Em relação ao rDNA 5S, todos os sete taxa apresentaram dois sítios. Nas alógamas, tais sítios foram localizados nas adjacências dos sítios rDNA 45S do cromossomo dois. Em *L. multiflorum* e *L. perenne*, esse sítio foi mapeado no braço curto do cromossomo três, que contém no braço longo o sítio 45S, e em *L. rigidum* var. *rigidum* ele foi encontrado em ambas as posições em diferentes células (ROCHA et al., 2015; THOMAS et al., 1996).

Como descrito anteriormente, para *Lolium multiflorum*, a primeira descrição do número de sítios de rDNA 35S via FISH foi de seis sítios (THOMAS et al., 1996), todos em posição intersticial nos cromossomos. Números variáveis de sítios de rDNA 35S em *L. multiflorum* foram, posteriormente, descritos por Lideikyte et al. (2008) e Bustamante et al. (2014), sendo verificados genótipos diploides com cinco até a oito sítios de rDNA. Bustamante et al. (2014) verificou ainda, que alguns genótipos apresentaram dois sítios de rDNA 35S no mesmo cromossomo, em braços cromossômicos diferentes, condição essa denominada de sintenia. O mesmo também foi observado em genótipos de *L. perenne* por Rocha et al. (2015).

Muitos estudos têm relatado que os sítios de rDNA 35S nas espécies de *Lolium* L. costumam ser vistos nos núcleos interfásicos e nas metáfases mitóticas, apresentando “gaps” na cromatina e nos cromossomos, aumentando o número de sinais que era esperado com a FISH 35S, motivo pelo qual foram inicialmente tratados como sítios frágeis (SFs) (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2009; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015; ROCHA et al., 2016; ROCHA et al., 2017a; 2017b). Tais gaps são resultado da alta descompactação da cromatina, formando fibras estendidas finas e longas, subdividindo os sítios de rDNA 35S em duas partes, sem resultar na formação de fragmentos cromossômicos e, como consequência, sem perda de material genético (ROCHA et al., 2017a; 2017b). Quando não há manifestação da fragilidade, os sítios de rDNA 35S são considerados intactos, condensados e com sinais FISH 35S íntegros (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2009; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015; ROCHA et al., 2016; ROCHA et al., 2017a; 2017b). Os gaps na região

do rDNA 35S começam a ser observados ainda durante a intérfase, mais especificamente entre a fase S/G2, e assim permanecem até a anáfase (ROCHA et al. 2017b) e alguns até a telófase (FERREIRA et al., 2018).

A ocorrência de gaps com fibras de cromatina estendida nos sítios de rDNA 35S de plantas tem sido associada à intensa atividade transcricional, a qual foi verificada por meio da coloração com nitrato de prata (Ag-NOR), que marca DNA e ribonucleoproteínas (HOWELL; BLACK, 1980; HUANG et al., 2012; BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al., 2015), e pela observação das marcas epigenéticas de heterocromatina, eucromatina e silenciamento gênico pela metilação do DNA (HUANG et al., 2012; FERREIRA et al., 2018).

2.3 A importância dos genes ribossomais e os sítios frágeis em humanos e em plantas

Os sítios de rDNA 35S estão entre as regiões mais amplamente estudadas em eucariotos, conforme demonstrado em uma revisão de Roa e Guerra (2012), em que foram compilados dados de 846 espécies e 198 gêneros, representando 51 famílias de angiospermas e seis famílias de gimnospermas visando estudar a sua distribuição, implicações estruturais e evolutivas. Um dos motivos pelo interesse no estudo dessa região está relacionado às suas características únicas quanto à função e estrutura genética (YANG et al., 2015). A redundância dos genes rRNA é incomparável a outros genes do genoma eucarioto, variando de centenas de sequências repetitivas em mamíferos a milhares em plantas. Paradoxalmente, somente uma fração destes genes é ativamente transcrita em determinados estágios da célula e, diferentemente dos demais genes que são transcritos pelas RNAs polimerases II e III, os genes de rRNA utilizam a RNA polimerase I para sua transcrição (HUANG et al., 2006). Ainda mais surpreendente é que, apesar da sua composição heterocromática, a síntese de rRNA representa a maior atividade transcricional da célula, correspondendo a quase 80% do RNA total em células em crescimento (MOSS; STEFANOVSKY, 1995; PAULE; LOFQUIST, 1996; MOSS et al., 2007).

Os genes rDNA são locais cromossômicos favoráveis para a formação de constrições secundárias, devido ao fato de serem sequências altamente repetitivas e ativas transcionalmente. As constrições formadas podem se tornar *hotspots* para eventos de recombinação, translocação e ampliação do número de sequências (KOBAYASHI, 2011; SAMADASHWILY; RACA; MIRKIN, 1997). Além dessas possibilidades de eventos, os genes ribossomais em plantas também apresentam a expressão de sítios frágeis (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2012; ROCHA et al., 2015).

Os sítios frágeis (SFs), fenômeno amplamente relatado em cromossomos humanos, são regiões cromossômicas que possuem tendências a sofrer estreitamento ou constrictões e formar lesões ou quebras em ambas as cromátides, tais consequências se dão pela inibição no processo transcricional ou replicativo (GLOVER, 2006; RICHARDS, 2001). Em cultura de células, os SFs normalmente são estáveis, porém sob certas condições de cultivo ou induzidos com agentes químicos específicos, formam lesões e quebras em cromossomos metafásicos (DURKIN; GLOVER, 2007).

O SFs em humanos, são classificados de acordo com a sua ocorrência na população e modo de indução, podendo ser raros ou comuns (GLOVER, 2006; HUEBNER; CROCE, 2001). Os sítios frágeis comuns (CFS) são geralmente estáveis em células somáticas, sendo encontrados em todos os seres humanos (GLOVER 2006; HUEBNER; CHOCE, 2001). Tais sítios podem ser induzidos por estresse durante a replicação do DNA, como por exemplo, a utilização da anficolina (APH), um inibidor de polimerase alfa, delta e épsilon (YUNIS; SORENG; BOWE, 1987). Os CFS são, por isso, considerados os sítios do genoma mais sensíveis ao estresse replicativo (DEBATISSE; EL ACHKAR; DUTRILLAUX, 2006; DURKIN; GLOVER, 2007). Por outro lado, os sítios raros estão presentes em uma baixa parte da população humana (2,5%), estes são resultantes de mutações que levam a expansões e instabilidade de micro ou mini-satélites ricos em A-T (DURKIN; GLOVER, 2007; GLOVER, 2006; HUEBNER; CROCE, 2001). A maioria destes sítios é induzida por deficiência de folato (WANG; GRIFFITH, 1996) e estão associados também com repetições expandidas CGG capazes de adotar estruturas incomuns de DNA B que podem perturbar a replicação do DNA (SAMADASWILY; RACA; MIRKIN, 1997; USDIN; WOODFORD, 1995).

Huang et al. (2008) relataram, pela primeira vez, a expressão de fragilidade nos sítios de rDNA 35S de *L. perenne*, que causou a ruptura total ou parcial dos cromossomos, gerando fragmentos que levaram a contagem equivocada do número cromossômico em 85% das células analisadas e também do número de sinais 35S. Em algumas lesões, as extremidades do fragmento e o cromossomo estavam ligados por um filamento de cromatina, detectado por meio da FISH (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2008). Huang et al. (2009) sugeriram que as falhas no complexo de enovelamento das fibras de cromatina dos sítios frágeis de rDNA 35S são as responsáveis pela formação de quebras/lesões *in vitro* em *Lolium*. Bustamante et al. (2014), que relataram a variabilidade para o sítio de rDNA 35S e a ocorrência de sítios frágeis em genótipos diploides e tetraploides de uma progênie resultante do cruzamento entre genótipos de *L. multiflorum*, observaram o mesmo comportamento. Rocha et al. (2017a) verificou que a

fragilidade em *Lolium* não resulta em verdadeiras quebras cromossômicas, e sim em lesões, gaps e constrictões, devido à segmentação e alta descompactação desses sítios de rDNA 35S.

Em *L. multiflorum* e *L. perenne* os sítios 35S lesionados, na maioria das vezes, são ativos transcricionalmente e apresentam bandas Ag-NOR mais intensas que os sítios íntegros ativos (BUSTAMANTE et al., 2014; HUANG et al., 2012; ROCHA et al., 2015). Também há relatos da co-localização dos SFs com o sítio de rDNA 35S em milho transgênico e em uma gramínea do Mediterrâneo, *Phleum echinatum* Host. (GRABOWSKA-JOACHIMIAK et al., 2015). Nos estudos com milho transgênico, a expressão dos SFs foi atribuída ao evento da transgenia, sendo estes herdáveis em cruzamentos com milho normal. Além disso, foram relatados que os SFs 35S em *Phleum echinatum* estão envolvidos em rearranjos cromossômicos que propiciam a diferenciação cariotípica dessa espécie dentro do gênero *Phleum* (WAMINAL et al., 2013). Por serem consideradas regiões fracas do genoma e susceptíveis à quebras e rearranjos cromossômicos, os SFs podem constituir um mecanismo potencial de especiação (BROWN; O'NEILL, 2010; DURKIN; GLOVER, 2007; RUIZ-HERRERA; ROBINSON, 2007).

Huang et al. (2012), com a intenção de averiguar a relação entre as alterações epigenéticas envolvidas na expressão de sítios frágeis, testaram actinomicina D (ActD, inibidor transcricional) e ampicilina (APH, inibidor replicacional) em gramíneas como milho, arroz, cevada e sorgo e observaram que a ActD promoveu quebras e lesões nos sítios de rDNA 35S dessas gramíneas. Os autores ainda realizaram análises específicas em milho, mostrando que nos sítios 35S houve diminuição de histonas H3K9ac, H3K9me2, consistente com a descondensação, hipometilação de sequências C-G e presença de histonas γ H2AX, uma variante da histona H2A fosforilada que serve como uma marca para detectar quebras na dupla fita do DNA. O mesmo padrão de metilação foi observado por Ferreira et al. (2018) em *L. multiflorum* e *L. perenne* não submetidos a tratamentos de inibição transcricional. Procedimentos que utilizam tratamentos que permitem manipular a maquinaria da transcrição, como a ActD, são aplicados, por exemplo, para a inibição da transcrição de genes em estudos com células cancerígenas (LU et al., 2015; CORTES et al., 2016) e até mesmo na inibição da síntese de rRNA em células-troncos embrionárias humanas (WOOLNOUGH et al., 2016). Trata-se de uma estratégia que pode ser adaptada para observar o comportamento dos sítios de rDNA 35S em espécies de *Lolium*, pois, de acordo com Bensaude (2011), a inibição da transcrição é acompanhada por mudanças nas propriedades bioquímicas de proteínas nucleares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil dos sítios de rDNA 35S, em células tratadas e não tratadas com um inibidor transcricional (ActD, Actinomicina D), de *Lolium multiflorum* Lam.

3.2 Objetivos específicos

Em células tratadas e não tratadas com ActD:

- Por meio da Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), avaliar a frequência de gaps e constrições nos sítios de rDNA 35S pós tratamento com ActD, além de avaliar os números de sinais 35S nos núcleos interfásicos;
- Avaliar os efeitos dos tratamentos com ActD sobre a organização nucleolar empregando coloração com nitrato de prata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2 Material Vegetal

As sementes de *L. multiflorum* cv. Ponteio ($2n=2x=14$) utilizadas nesse estudo são provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Forrageiras da Embrapa Gado de Leite/Embrapa Clima Temperado, Juiz de Fora-MG/Pelotas-RS.

4.3 Tratamento com Actinomicina D

Sementes de *L. multiflorum* foram previamente germinadas em câmara úmida e mantidas a 25°C. Após a germinação, as raízes apresentando aproximadamente 1,0cm foram tratadas com actinomicina D (ActD) nas concentrações de 15 e 30ug/mL por 48h, a 25°C, conforme Huang et al. (2012), sendo oito placas para cada tratamento contendo 60 sementes. No tratamento controle, as sementes foram germinadas em 16 placas de Petri contendo água destilada. As amostras das raízes tratadas com ActD e não tratadas (controle) foram destinadas às análises citogenéticas

4.4 Preparo de lâminas, coloração com nitrato de prata e avaliação

Após o tratamento com actD, as raízes foram coletadas, fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético/ 3:1) e armazenadas a -20°C. As raízes foram digeridas com Onozuka R10 celulase (0,7%), celulase (0,7%) (Sigma-Aldrich), pectoliase (1%) (Sigma-Aldrich), e citohelicase (1%) (Sigma-Aldrich) à 37°C por 1h10min. As lâminas foram preparadas pela técnica de gotejamento e a coloração foi feita com nitrato de prata (Ag-NOR), conforme Guerra e Souza (2002) com adaptações. Sobre a preparação cromossômica foi colocada uma tela de nylon, na qual adicionou-se 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, à 72°C, de 2 a 7 minutos com posterior lavagem em água destilada e desidratação 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. O número de nucléolos por núcleo foi avaliado em 250 células/tratamento. A medida da proporção da área nucleolar em relação à área total do núcleo foi obtida pela avaliação de 50 células por tratamento, no Photoshop CC 2015.

4.5 Análises citogenéticas

4.5.1 Obtenção de C-metáfases

Para obtenção de C-metáfases, as raízes tratadas e não tratadas com ActD foram coletadas e tratadas em água gelada por 24 horas, conforme Książczyk et al. (2010). Posteriormente, as raízes foram fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético/ 3:1) para posterior

aplicação da técnica de FISH. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento conforme Guerra e Souza (2002).

4.5.2 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A FISH foi realizada usando como sondas as sequências de rDNA 35S (pTa 71 de *Triticum aestivum* L.) marcadas de forma indireta com Digoxigenina-11-dUTP 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. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em série alcoólica (70%, 90% e 100%). A mistura de hibridização (formamida 50%, SSC 2x, sulfato de dextran 10% e cerca de 80 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, será aplicada sobre as lâminas desnaturadas e essas foram incubadas por, no mínimo, 37°C 16 h-1, em câmara úmida para que ocorra a hibridização. As lavagens pós-hibridização foram feitas, sob agitação, em SSC 2x por 5 minutos, em temperatura ambiente, posteriormente em SSC 2x, a 58°C por 20 minutos, e transferias para SSC2X a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em Vectashield® e avaliadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX60 equipado com câmera monocromática refrigerada para captura das imagens. As prometáfases/metáfases foram avaliadas quanto ao número de sítios de rDNA 35S por genótipo e quanto à presença de lesões, visualizadas como constrições e gaps, decorrentes da expressão dos sítios frágeis 35S nos diferentes tratamentos. Foram considerados com gaps os sítios que se distendiam promovendo amplo afastamento entre as partes dos cromossomos. Foram consideradas constrições, os sítios de rDNA 35S que apresentaram uma sutil descontinuação do padrão DAPI. A porcentagem de sítios 35S lesionados foi verificada em cada um dos tratamentos. Nos núcleos também foram avaliados o número de sinais 35S nos estágios G1 e S/G2.

5 RESULTADOS

Em *L. multiflorum* a frequência de células com diferentes números de nucléolos por núcleo, variou entre os tratamentos (Tabela 1). Nos tratamentos com ActD nas concentrações de 15 e 30ug/mL foram observadas as maiores frequências de núcleos contendo um nucléolo,

em comparação ao controle. Contudo, a presença de dois nucléolos/núcleo foi maior no tratamento controle em relação às concentrações 15 e 30ug/mL. Quanto a núcleos com 3 nucléolos, o tratamento de 30ug/mL se destacou diante dos demais tratamentos, sendo que a concentração 15ug/mL promoveu a menor porcentagem de células com essa configuração. A formação de quatro nucléolos/núcleo foi observada somente no tratamento controle, enquanto a presença de mais de quatro nucléolos/núcleo foi observada apenas na concentração de 15ug/mL de ActD (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1- Frequência de células de *L. multiflorum* com diferentes números de nucléolos nos diferentes tratamentos.

Tratamento/N^o de nucléolos	1 nucléolo	2 nucléolos	3 nucléolos	4 nucléolos	+ de 4 nucléolos	Total de células
Controle	69,5%	23,2%	6,1%	1,2%	0%	250
15 ug/mL	75,4%	20,1%	4,3%	0%	0,3%	250
30 ug/mL	73,6%	17,4%	9,0%	0%	0%	250

Nas células que apresentavam um nucléolo, a proporção da área ocupada no núcleo não foi discrepante entre os tratamentos controle (31,53%), 15ug/mL (33,67%) e 30ug/mL (33,88%) (Figura 1). Quando dois nucléolos estavam presentes, houve um aumento na proporção de área nucleolar nas células tratadas com ActD 15ug/mL (33,02%) e 30ug/mL (41,37%), em relação ao controle (25,65%) (Figura 1). A área ocupada tanto por dois, quanto por três nucléolos foi maior na concentração de 30ug/mL em relação à concentração de 15ug/mL e o controle. Porém, a área nucleolar ocupada por três nucléolos é menor na concentração de 15ug/mL quando comparada ao controle (Figura 1).

Uma análise comparativa das concentrações em relação aos diferentes números de nucléolos revelou que a área ocupada por dois nucléolos na concentração de 30ug/mL (41,37%) foi superior à proporção observada para um nucléolo (33,88%) e três nucléolos (30,43%) (Figura 1). Já a concentração de 15ug/mL apresentou um comportamento semelhante nas porcentagens de área nucleolar para um (33,67%) e dois nucléolos (33,02%) e decréscimo quando três nucléolos foram formados (12,18%) (Figura 1). Em todos os tratamentos, as proporções obtidas para três nucléolos foram inferiores ao observado para a área ocupada por um e dois nucléolos. Como já mencionado, apenas nas células do grupo controle observou-se a formação de quatro nucléolos (Figura 2) e a área ocupada por eles foi superior (36,21%), comparada à área ocupada três nucléolos/núcleo nesse mesmo tratamento (23,59%) (Figura 1).

Figura 1 - Área ocupada pelo(s) nucléolo(s) (%) em relação à área total do núcleo de *L. multiflorum*.

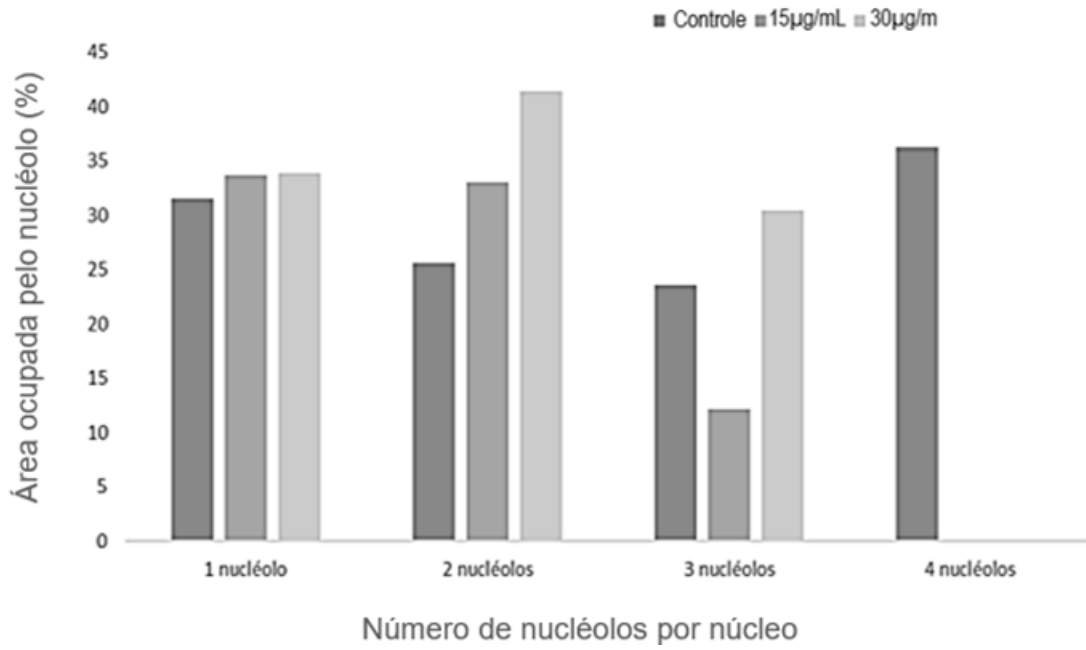
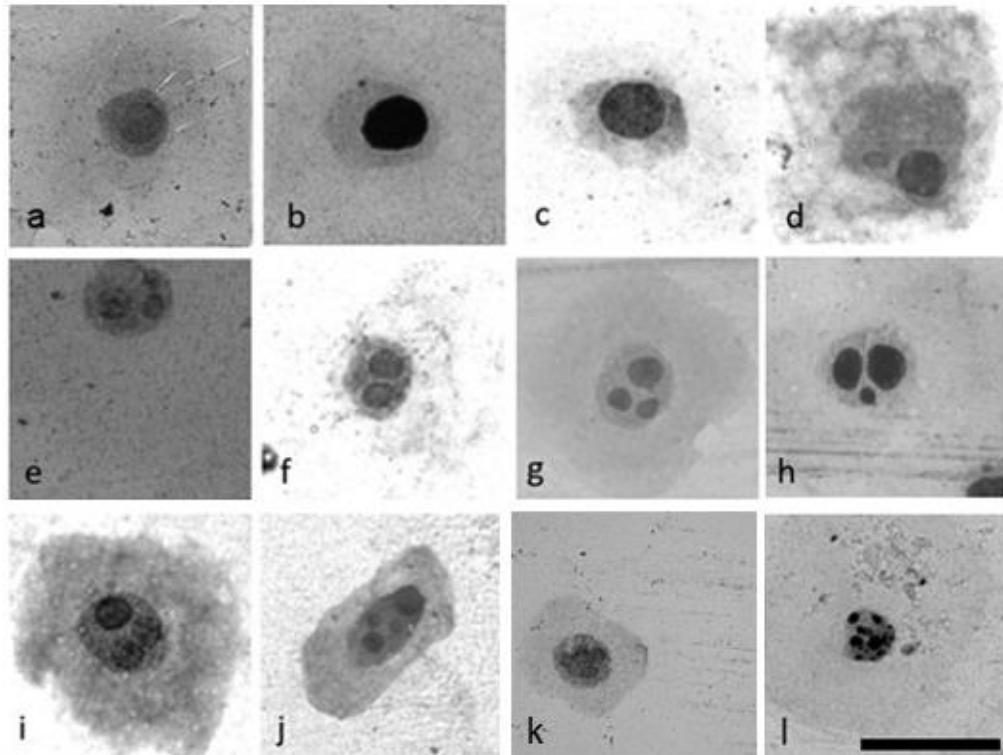


Figura 2 - Células de *Lolium multiflorum*: um nucléolo – tratamento controle (a), tratamento com ActD 15ug/mL (b) e tratamento com ActD 30ug/mL (c); Dois nucléolos – tratamento controle (d), tratamento com ActD 15ug/mL (e) e tratamento com ActD 30ug/mL (f); Três nucléolos – tratamento controle (g), tratamento com ActD 15ug/mL (h), tratamento com ActD 30ug/mL (i); Quatro nucléolos – tratamento controle (j, k); Mais de quatro nucléolos – Tratamento com ActD 15ug/mL (l). Barra 10µm.



Nos núcleos interfásicos, no tratamento controle, seis e sete sinais FISH foram mais frequentes nos núcleos G1 e S/G2 (Tabela 2; Figura 3). Nas concentrações de 15ug/mL e 30ug/mL, a maior frequência de núcleos com sinais rDNA 35S foram, respectivamente, G1 com seis sinais e G1 com mais de 10 sinais, sendo alguns deles distendidos (Tabela 2; Figura 3). No tratamento controle não foram observados núcleos apresentando mais de 10 sinais (Tabela 2).

Em S/G2 o tratamento 30ug/mL mostrou uma maior frequência de núcleos com mais de oito sinais comparado ao controle e a concentrações de 15ug/mL (Tabela 2) (Figura 3). Pode-se observar que houve uma inversão nas frequências dentro desse tratamento, enquanto nos demais tratamentos, controle e 15ug/mL, a porcentagem de núcleos com mais de oito sinais decaiu (Tabela 2).

Não foram encontrados micronúcleos em nenhum dos tratamentos, tanto na análise com a FISH, quanto na análise dos nucléolos.

Figura 3 - Núcleos interfásicos de *L. multiflorum* em estágio G1 e S/G2 com sonda de rDNA 35S em vermelho. Células do tratamento controle em **a** e **b**, sendo **a** (G1) com seis sinais 35S e em **b** (S/G2) com 8 sinais. Células tratadas com 15ug/mL de ActD em **c** e **d**, sendo **c** (G1) com 6 sinais e **d** (S/G2) com mais de dez sinais 35S e arrastes. Células tratadas com 30ug/mL de ActD em **e** e **f**, sendo **e** (G1) e **f** (S/G2) com mais de 10 sinais 35S e arrastes. Barra 10 μ m.

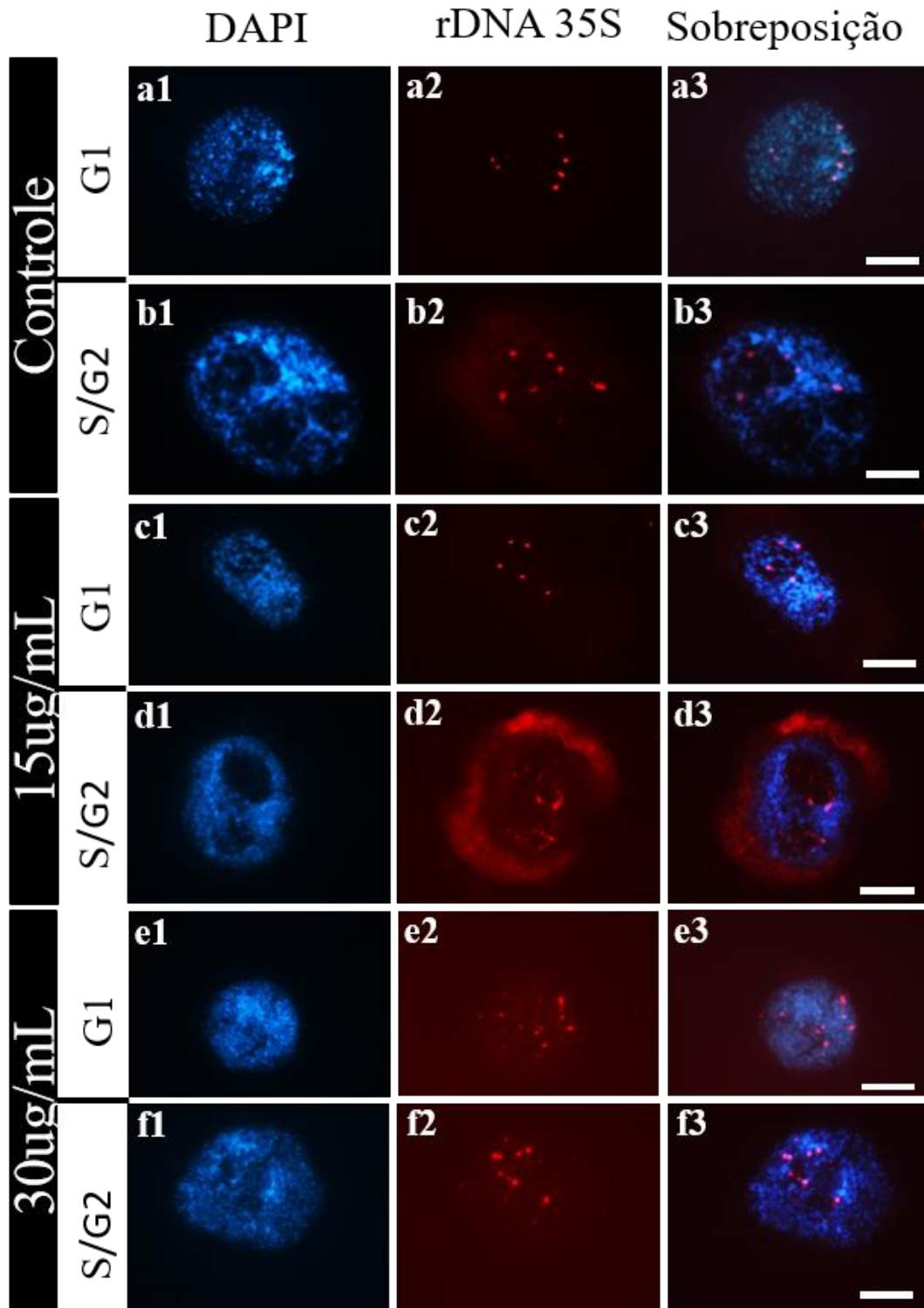


Tabela 2 – Porcentagem de células em estágio G1 e S/G2 de *L. multiflorum* com diferentes números de sinais de rDNA 35S nos diferentes tratamentos.

Sinais/Tratamentos		Controle	15ug/mL	30ug/mL
4 sinais	<u>G1</u>	--	--	--
	<u>S/G2</u>	7,14	6,66	3,84
5 sinais	<u>G1</u>	13,04	18,18	--
	<u>S/G2</u>	7,14	10	--
6 sinais	<u>G1</u>	39,13	36,36	13,33
	<u>S/G2</u>	21,42	20	3,84
7 sinais	<u>G1</u>	26,08	18,18	20
	<u>S/G2</u>	42,85	33,33	11,53
8 sinais	<u>G1</u>	13,04	18,18	6,66
	<u>S/G2</u>	7,14	13,33	26,92
9 sinais	<u>G1</u>	8,69	--	6,66
	<u>S/G2</u>	14,28	10	15,38
+ de 10 sinais	<u>G1</u>	--	9,09	53,33
	<u>S/G2</u>	--	6,66	38,44

Para as avaliações quanto aos sítios de rDNA 35S nos cromossomos, foram considerados gaps os casos em que havia uma lacuna no sinal do rDNA 35S, formando pequenos fragmentos cromossômicos que subdividiam os sinais em duas partes (Figura 4). Quando não havia a presença de uma lacuna, mas pequenos “estrangulamentos” nos sítios do rDNA 35S, estes foram considerados constrições (Figura 4). Entre todos os tratamentos, a concentração de 30ug/mL de ActD apresentou a maior porcentagem de metáfases com lesões (gap e/ou constrição) seguida, em ordem decrescente, da concentração de 15ug/mL e do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem de c-metáfases espalhadas de *Lolium multiflorum*, apresentando lesões (gap e/ou constrição) nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Metáfases espalhadas com lesões no rDNA 35S
Controle	84,21%
15ug/mL de ActD	86,36%
30ug/mL de ActD	90,00%

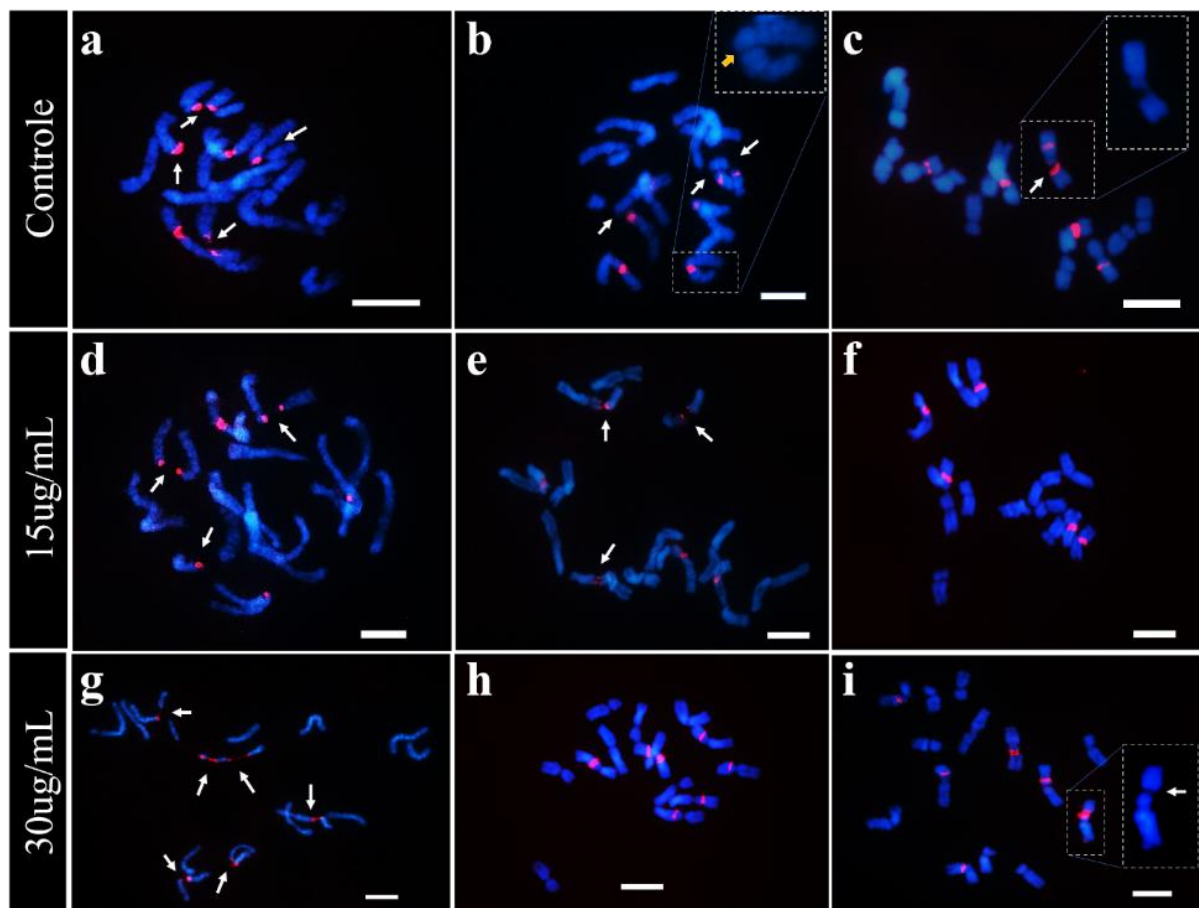
Ao analisar metáfases e prometáfases quanto ao número de gaps e constrições, observou-se que todos os tratamentos apresentaram maior porcentagem de gaps nas prometáfases, comparadas as metáfases (Tabela 4; Figura 4). Já o maior o número de constrições foi evidenciado nas metáfases (Tabela 4). Ao comparar esses dados separadamente,

entre os tratamentos, nota-se que nas metáfases a concentração de 15ug/mL apresentou maior porcentagem de gaps em comparação aos outros tratamentos. Porém, ao analisar o número de contrações nas metáfases, a maior proporção encontrada foi na concentração de 30ug/mL, seguida pela concentração de 15ug/mL e por fim o grupo controle (Tabela 4). Em relação às prometáfases, tanto com gap quanto com contrações, o grupo controle obteve a maior porcentagem entre todos os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de metáfases e prometáfases de *Lolium multiflorum* que apresentaram gap ou contração, nos diferentes tratamentos.

		Controle	15ug/mL	30ug/mL
Metáfases	Gap	4,7%	11,83%	6,86%
	Contração	25,30%	28,99%	36,27%
Prometáfases	Gap	46,43%	38,78%	40,78%
	Contração	21,43%	5,1%	10,52%

Figura 4 – Metáfases de *L. multiflorum* com sonda de rDNA 35S em vermelho. Setas brancas apontam os gaps e as setas amarelas apontam as constrições nas ampliações. **a-c** tratamento controle, sendo **a** e **b** prometáfases e **c** uma metáfase, todas elas com seis sítios de rDNA 35S cada. Em **b** e **c** cromossomos com sítios de rDNA sintênicos estão presentes, sendo que em **b** os dois sintênicos apresentaram gaps, enquanto em **c** apenas um dos sítios sintênicos apresentou gap (ampliação). Em **b** a ampliação evidencia um cromossomo com constrição no sítio 35S. **d-f** tratamento 15ug/mL de ActD, sendo **d** e **e** prometáfases ambas com seis sítios de rDNA 35S e **f** uma metáfase com cinco sítios de rDNA 35S. **g-i** tratamento 30ug/mL de ActD, sendo **g** uma prometáfase com seis sítios 35S, todos com gap, dois deles em sintênia. **h**- Metáfase com sete sítios de rDNA dois deles em sintênia e sem presença de gaps. **i**- metáfase com cinco sítios de rDNA 35S, a ampliação evidencia um dos sítios com gap. Barra 5 μ m.



Também foram analisadas as frequências de gaps e constrições, nas metáfases e prometáfases, de acordo com o número de sítios rDNA 35S dos genótipos em cada tratamento. O número de sítios observados variou de cinco a oito nos tratamentos, sendo que apenas

genótipos apresentando seis sítios foram encontrados tanto no controle, quanto nas concentrações de 15 e 30ug/mL de ActD. Somente a concentração de 15ug/mL apresentou genótipos com oito sítios (Tabela 5).

Analisando os genótipos que apresentaram seis sítios, nota-se que a presença de gaps nas prometáfases é maior na concentração de 30ug/mL, em comparação aos outros dois tratamentos. Tal comportamento não é observado para constrições, nesse caso, o grupo controle apresenta a maior porcentagem quando comparado a 15 e 30ug/mL. Para metáfases, 15ug/mL e 30ug/mL obtiveram as maiores proporções de gaps e constrições, respectivamente, entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 – Porcentagem de metáfases e prometáfases de *Lolium multiflorum*, com diferentes números de sítios rDNA 35S, apresentando gap ou constrições nos diferentes tratamentos.

		Gap			Constrição		
		Controle	15ug/mL	30ug/mL	Controle	15ug/mL	30ug/mL
Metáfases	5 sítios	0%	11,42%	--	15%	37,14%	--
	6 sítios	2,29%	14,7%	10%	22,9%	25,49%	31,66%
	7 sítios	--	--	2,38%	--	--	42,58%
	8 sítios	--	3,12%	--	--	31,25%	--
Prometáfase	5 sítios	60%	70%	--	20%	0%	--
	6 sítios	38,8%	41,66%	45,83%	22,2%	5,55%	14,58%
	7 sítios	--	28,57%	32,14%	--	10,71%	3,57%
	8 sítios	--	33,33%	--	--	0%	--

6 DISCUSSÃO

Lolium multiflorum tipicamente apresenta de um a seis nucléolos/núcleo, sendo predominante a ocorrência de um a dois nucléolos (BUSTAMANTE et al., 2014; CARNIDE; ORELLANA, 1986), similar ao observado no presente trabalho. Huang et al. (2012) relataram

que em milho tratado com 15 μ g/mL de ActD houve uma desorganização nucleolar, aumentando o número de nucléolos por núcleo. No controle, Huang et al. (2012) contabilizaram de um a dois nucléolos, já o milho tratado apresentou núcleos com dez nucléolos pequenos. Os autores atribuíram esse comportamento à uma forma de adaptação à condição de perturbação do processo transcricional causado pela ActD. Segundo os autores, após a inibição muitos genes de rRNA ficam dispersos no nucleoplasma resultando na formação de múltiplos nucléolos.

No presente trabalho, uma vez que não houve expressiva mudança no número de nucléolos por núcleo, foi avaliada a proporção da área nucleolar/núcleo nos diferentes tratamentos. Essa análise tem sido usada como parâmetro para detectar o efeito de algumas substâncias sobre as células de bioensaios (LIMA et al., 2019). Em *L. multiflorum* tratado com ActD, houve um aumento nas porcentagens de área do núcleo ocupada pelo nucléolo. O tratamento com 30 μ g/mL promoveu um comportamento dose dependente, aumentando a área nucleolar em relação ao controle, o que não se deu da mesma maneira na dose de 15 μ g/mL. Lima et al., (2019) também observou diferentes respostas da área nucleolar com diferentes números de nucléolos, aumento e ou diminuição, em células de *Allium cepa* L. tratadas com diferentes poluentes ambientais.

A ActD, apesar de ser um inibidor transcricional, pode não ocasionar uma diminuição da área nucleolar, pois essa droga impede a elongação da cadeia do rRNA, evento esse que ocorre após a formação nucleolar (HUANG et al., 2012; SOBELL, 1985). A dispersão dos genes rRNA no nucleoplasma, citada anteriormente para milho no trabalho de Huang et al. (2012), pode ter ocorrido em *Lolium* após o tratamento com ActD, mas não elevando o número de nucléolos/núcleo, como observado em milho através da fragmentação nucleolar, mas sim levando à um aumento na área nucleolar.

Em *Lolium* houve aumento do número de sinais 35S nos núcleos interfásicos tratados com ActD. Isso se deu principalmente na concentração de 30 μ g/mL em que mais de 60% das células em G1 e 53,8% das S/G2 tinham de mais de nove sinais, diferente das proporções encontradas no controle que apresentou valores em proporções condizentes com o trabalho de Rocha et al. (2017b), em que não houve uso de ActD. Na concentração de 15 μ g/mL apenas 10% dos núcleos em G1 e 16,6% dos núcleos em S/G2 apresentaram mais de 9 sinais FISH 35S. Rocha et al. (2017b) relataram que os núcleos em S/G2 são mais efetivos que G1 para expressar a fragmentação dos sítios de rDNA 35S que ocorre naturalmente em diferentes espécies de *Lolium*. Apesar disso, até mesmo os núcleos em G1 expressaram o efeito da ActD nas concentrações usadas no presente estudo, mostrando efetividade. Huang et al. (2012) ao comparar a porcentagem de núcleos com sinais dispersos em milho, cevada e sorgo verificaram

valores discrepantes na concentração de 15ug/mL, em que 90% dos núcleos foram afetados. Enquanto que no controle menos de 10% dos núcleos tinham sinais além do esperado para essas mesmas espécies. Comparando com os dados obtidos em *Lolium* é possível inferir que a ActD na concentração de 15ug/mL foi mais efetiva nas espécies usadas por Huang et al. (2012). A proporção de núcleos afetados somente foi mais expressivo em *Lolium* com o dobro da concentração, 30ug/mL, e mesmo assim as proporções são bem menos discrepantes que as obtidas no estudo usado como comparação.

Huang et al. (2008) relataram que a porcentagem de células com cromossomos espalhados, prometáfases/metáfases, apresentando lesões em espécies *Lolium* corresponde a 85%, semelhante ao encontrado no tratamento controle do presente trabalho (84,21%). A concentração de 15ug/mL apresentou um sutil aumento nessa porcentagem, atingindo 86,36% de prometáfases/metáfases avaliadas. O aumento na concentração de 30ug/mL foi maior, alcançando 90% das células avaliadas. Huang et al. (2012) também observaram tal comportamento em metáfases de milho, sorgo e cevada, contudo com discrepância entre os valores encontrados no controle, menos de 10% das metáfases afetadas, e no tratamento com 15ug/mL mais de 80% delas afetadas. Em *Lolium*, a porcentagem de prometáfases/metáfases afetadas também se mostrou menos efetiva em mostrar a ação da ActD mesmo com o dobro da concentração usada por Huang et al. (2012).

O nível de compactação da cromatina pode influenciar na frequência de sítios de rDNA 35S com lesões, que ocorrem naturalmente, em espécies de *Lolium*, sendo que, cromossomos menos compactados (prometáfase) tendem a apresentar um maior número de gaps/constricções em relação aos cromossomos mais compactados (metáfases) (BUSTAMANTE et al., 2014; ROCHA et al. 2015). Dessa forma, em *Lolium*, a comparação direta da proporção de células com cromossomos espalhados não permita ter clareza da efetividade da ação da ActD em diferentes concentrações. Além disso, *L. multiflorum* possui variação no número de sítios 35S por genótipo, de cinco a oito (BUSTAMANTE et al., 2014), o que também foi verificado no presente estudo, e a frequência com que esses sítios são afetados podem ser genótipo dependente. Porém, os resultados observados em genótipos com seis sítios de rDNA 35S submetidos as diferentes concentrações nos permite inferir, de forma mais direta, que as concentrações de 15 e 30ug/mL ActD em *L. multiflorum* foram efetivas.

As diferenças de comportamento entre *L. multiflorum* e as espécies avaliadas por Huang et al. (2012) pode ser dar por vários fatores. O primeiro deles é que *L. multiflorum* já possui um comportamento particular dos sítios de rDNA 35S de ocorrência natural, os denominados sítios frágeis, que por si só já geram os gaps/constricções. O segundo fator, é que o número de sítios

de rDNA 35S de *L. multiflorum* é superior ao das espécies estudadas por Huang et al. (2012) que apresentam entre 2 e 4 sítios, além do número de sequências que compõem esses sítios serem possivelmente variáveis. Estudos anteriores sugerem que cópias extras de rDNA 35S são capazes de manter a integridade do genoma, evitando defeitos dependentes da transcrição (KOBAYASHI, 2006; IDE et al., 2010). Por fim, os sítios de rDNA 35S em *Lolium* já demonstraram não serem facilmente e preferencialmente afetados por tratamentos, como no trabalho de Rocha et al. (2016) em que o raio X, que causa quebras no DNA, não teve como *hotspot* os sítios de rDNA 35S de *L. multiflorum*.

Pesquisas mais avançadas, como a qPCR (PCR quantitativa), poderão trazer respostas mais concretas quanto ao nível de inibição transcricional causada pelas diferentes concentrações de ActD nos sítios de rDNA 35S em *L. multiflorum*.

REFERÊNCIAS

- BENSAUDE, O. Inhibiting eukaryotic transcriptios. **Transcription**, v.2, n.3, p. 103-108, 2011.
- BROWN, J. D.; O'NEILL, R. J. Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 11, p. 291-316, 2010.
- BUSTAMANTE, F.O.; 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**, v. 54, n. 2, p. 617-625, 2014.
- CARNIDE, V.; ORELLANA, J. Analysis of nucleolar organizer regions by silver staining in two *Lolium* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 35, n. 2, p. 503-507, Apr. 1986.
- CARNIDE, V.; ORELLANA, J.; RIBEIRO, M. A. M. V. Nucleolar organiser activity in *Lolium* and *Festuca*: I., *Lolium multiflorum*, *Festuca arundinacea* and *Lolium-Festuca* Hybrids. **Heredity**, Cary, v. 56, n. 3, p. 311-317, June 1986.
- 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.
- CORTES, C. L., VEIGA, S. R., ALMACELLAS, E., HERNÁNDEZ-LOSA, J., FERRERES, J. C., KOZMA, S. C. et al. Effect of low doses of actinomycin D on neuroblastoma cell lines. **Molecular cancer**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.
- DEBATISSE, M.; EL ACHKAR, E.; DUTRILLAUX, B. Common fragile sites nested at the interfaces of early and late-replicating chromosome bands. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p. 578-581, 2006.
- DURKIN, S. G.; GLOVER, T. W. Chromosome fragile sites. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 41, p.169-192, 2007.
- FERREIRA, M. T. M.; ROCHA, L. C.; VITORIANO, M. B. Z.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Relationship between epigenetic marks and the behavior of 45S rDNA sites in chromosomes and interphase nuclei of *Lolium-Festuca* complex. **MOLECULAR BIOLOGY REPORTS**, v. 1, p. 1-17, 2018.

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

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

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

HOWELL, W. T.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, n. 8, 1014-1015, 1980.

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

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, 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.

HUANG, S.; ROTHBLUM, L. I.; CHEN, D. Ribosomal Chromatin Organization. **Biochemistry and cell biology**., v. 84, p. 444-449, 2006.

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

IDE, S.; MIYAZAKI, T.; MAKI, H.; KOBAYASHI, T. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. **Science** 327: 693–696. 2010.

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

KOBAYASHI, T. Strategies to maintain the stability of the ribosomal RNA gene repeats. **Genes Genet syst** 81: 155–161. 2006.

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

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

LIMA, M.; ROCHA, L.; SILVEIRA, G.; ALVARENGA, I.; ANDRADE-VIERIA, L. Nucleolar alterations are reliable parameters to determine the cytogenotoxicity of environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 174, 630-636. 2019.

LU, D. F.; WANG, Y. S.; LI, C.; WEI, G. J.; CHEN, R.; DONG, D. M.; YAO, M. Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. **International Journal of Clinical and Experimental Medicins**, v. 8, n. 2, p. 1904-1911, 2015.

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

MOSS T, LANGLOIS F, GAGNON-KUGLER T, STEFANOVSKY V. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, n. 1, p. 29-49, 2007.

MOSS, T.; STEFANOVSKY, V.Y. Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 50, p. 25-66, 1995.

PAULE, M.R.; LOFQUIST, A.K. Organization and expression of eukaryotic ribosomal RNA genes. In *Ribosomal RNA Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis*; Zimmermann, R.A., Dahlberg, A.E., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA. pp. 395-419, 1996.

PERRY, R. P.; KELLEY, D. E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. **Journal of Cellular Physiology**, v. 76, n. 2, p. 127-39, 1970.

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

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

ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 225, 2012.

ROCHA, L. C.; BUSTAMANTE, F. O.; SILVEIRA, R. A.; TORRES, G. A.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H. Functional repetitive sequences and fragile sites in chromosomes of *Lolium perenne* L. **Protoplasma**, v. 252, n. 2, p.451-60, 2015.

ROCHA, L.C.; JANKOWSKA, M.; FUCHS, J.; MITTELMANN, A.; TECHIO, V. H.; HOUBEN, A. Decondensation of chromosomal 45S rDNA sites in *Lolium* species does not result in karyotype instability. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 285-292, 2017a.

ROCHA, L. C.; MITTELMANN, A.; HOUBEN, A.; TECHIO, V. H. Fragile sites of 45S rDNA of *Lolium multiflorum* are not hotspots for chromosomal breakages induced by X-ray. **Molecular Biology Reports**, v.43, n.7, p.659-665, 2016.

ROCHA, L.C.; SILVA, G. A.; BUSTAMANTE, F. O.; SILVEIRA, R. A. D.; MITTELMANN, A. TECHIO, V. The dynamics of 45S rDNA sites in the cell cycle: fragile sites and chromosomal stability in *Lolium* and *Festuca*. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 2017b.

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

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

SOBELL, H. M. Actinomycin and DNA transcription. **Proc Natl Acad Sci** 82: 5328–5331, 1985.

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

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

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

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

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

WAMINAL, N. E. et al. Randomly Detected Genetically Modified (GM) Maize (*Zea mays* L.) near a Transport Route Revealed a Fragile 45S rDNA Phenotype. **Plos One**, San Francisco, v. 8, 2013.

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

WOOLNOUGH J. L., ATWOOD B.L., LIU Z., ZHAO R., GILES K. E. The Regulation of rRNA Gene Transcription during Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. **PLoS ONE**. 2016.

YANG, K.; ROBIN, A. H. K.; YI, G. E.; LEE, J.; CHUNG, M. Y.; YANG, T. J.; NOU, I. S. Diversity and Inheritance of Intergenic Spacer Sequences of 45S Ribosomal DNA among Accessions of *Brassica oleracea* L. var. capitata. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28783-28799, 2015.

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