

MARIANA CANSIAN SATTLER

MAPEAMENTO FÍSICO DE rDNA 5S EM *Eucalyptus dunnii* MAIDEN E *Zea mays* L. PELA TÉCNICA DE PRINS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S253m
2017 Sattler, Mariana Cansian, 1994-
Mapeamento físico de rDNA 5S em *Eucalyptus dunnii*
Maiden e *Zea mays* L. pela técnica de PRINS / Mariana Cansian
Sattler. – Viçosa, MG, 2017.
xi, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.43-52.

1. Genética vegetal. 2. Citogenética. 3. DNA ribossômico.
4. *Eucalyptus dunnii*. 5. *Zea mays* . I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 581.35

MARIANA CANSIAN SATTLER

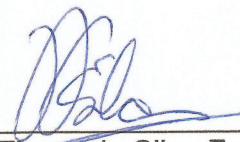
MAPEAMENTO FÍSICO DE rDNA 5S EM *Eucalyptus dunnii* MAIDEN E *Zea mays* L. PELA TÉCNICA DE PRINS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21/07/2017



Wellington Ronildo Clarindo



Marcia Flores da Silva Ferreira



Carlos Roberto de Carvalho
(Orientador)

Aos meus pais Sonia e Marcos
Ao meu irmão Ramon

DEDICO

*“[...] from so simple a beginning endless forms
most beautiful and most wonderful have
been, and are being, evolved”.*
(Charles Darwin)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do curso e pela infraestrutura fornecida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pela orientação e por fornecer conselhos e ensinamentos valiosos, os quais auxiliaram no meu desenvolvimento profissional, científico e pessoal.

Aos professores Wellington Ronildo Clarindo e Marcia Flores da Silva Ferreira, pelas sugestões, críticas e pela colaboração no delineamento desse trabalho.

À todos os meus professores, por me concederem o meu bem mais valioso: o conhecimento.

À todos os colegas do laboratório de Citogenética e Citometria Vegetal pelas contribuições técnicas e científicas, e pelos momentos de descontração. Em especial à Fernanda, por me apresentar ao mundo da citogenética molecular; e à Jéssica, pelo apoio na citogenética clássica do milho.

Ao meu namorado, amigo e parceiro de trabalho Andrei, pelo amor, incentivo e por todo apoio emocional e científico.

Aos meus pais Sonia e Marcos, que são a base dessa conquista, pelo amor e apoio incondicionais, e por serem meus maiores exemplos de vida. Ao meu irmão Ramon, pelo amor fraterno e amizade.

BIOGRAFIA

MARIANA CANSIAN SATTTLER, filha de Marcos Antônio Sattler e Sonia Cansian Sattler, nasceu em Alegre, Espírito Santo, no dia 06 de maio de 1994.

Em 2010, concluiu o ensino médio no Instituto Federal do Espírito Santo, em Alegre – ES.

No ano de 2011 ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Campus de Alegre, graduando-se Bacharela em Ciências Biológicas em julho de 2015.

Durante o curso de graduação, foi bolsista do PIBIC/CNPq no Departamento de Produção Vegetal da UFES, onde desenvolveu atividades de pesquisa em citogenética vegetal, cultura de tecidos vegetais e citometria de fluxo.

Em agosto de 2015, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, onde desenvolveu atividades de pesquisa nas áreas de citogenética clássica e molecular, cultura de tecidos vegetais e citometria de fluxo, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2017.

RESUMO

SATTLER, Mariana Cansian, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Mapeamento físico de rDNA 5S em *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Zea mays* L. pela técnica de PRINS.** Orientador: Carlos Roberto de Carvalho.

A detecção de sequências de DNA *in situ* por meio de técnicas de citogenética molecular consiste em uma das metodologias mais utilizadas para o mapeamento físico. Embora seja amplamente aplicada na pesquisa genômica, a Hibridização Fluorescente In Situ (FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization*) tem sido considerada uma técnica relativamente demorada, uma vez que requer a construção de uma sonda marcada. A Reação de Amplificação In Situ (PRINS – *Primed In situ Labelling*), por sua vez, consiste em uma alternativa sensível e rápida em relação a FISH. No entanto, a especificidade e sensibilidade da técnica de PRINS podem ser influenciadas por fatores espécie-específicos. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo adaptar um protocolo de PRINS reprodutível para o mapeamento físico de genes de rRNA 5S em duas espécies com cromossomos de tamanhos relativamente diferentes: *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Zea mays* L. Inicialmente, meristemas radiculares de ambas as espécies foram sincronizados com hidroxauréia e tratados com o agente anti-tubulínico amiprofos-metil para o acúmulo de metáfases. Em seguida, os meristemas foram submetidos a maceração enzimática e as lâminas confeccionadas pelas técnicas de dissociação celular e secagem ao ar. Após o pré-tratamento das lâminas, um par de *primers* específicos para a região 5S de *E. globulus* foi utilizado para a reação de PRINS, que consistiu de um único ciclo. A reação foi conduzida em preparações de *E. dunnii* e *Z. mays* contendo cromossomos metafásicos morfológicamente preservados, sem resíduos de citoplasma ou sobreposições. A técnica de FISH foi adicionalmente aplicada na espécie *Z. mays* com o intuito de confirmar os resultados obtidos pela PRINS. O mesmo par de *primers* foi utilizado para a construção de sondas marcadas com fluorescência, as quais foram posteriormente hibridizadas com o DNA alvo. Os cariótipos de *E. dunnii* e *Z. mays* exibiram $2n = 2x = 22$ e $2n = 2x = 20$ cromossomos, respectivamente. Em ambas as espécies, o cromossomo portador da constrição secundária foi classificado como o número 6. O protocolo

de citogenética clássica associado à reação de PRINS resultou em sinais nítidos para a sequência de rDNA 5S tanto em núcleos interfásicos quanto em cromossomos metafásicos de *E. dunnii* e *Z. mays*. Em *E. dunnii*, os genes de rRNA 5S foram mapeados no braço curto do cromossomo 5, em posição pericentromérica. Na espécie *Z. mays*, o sinal foi localizado na região terminal do braço longo do cromossomo 2. A técnica de FISH confirmou o resultado obtido pela PRINS nessa espécie. Embora o tamanho dos cromossomos possa influenciar na resolução de técnicas de citogenética molecular, o protocolo descrito resultou em uma elevada razão sinal:*background* para ambas as espécies estudadas, evidenciando sua reprodutibilidade. Esse estudo consiste no primeiro relato do mapeamento de sequências específicas em *E. dunnii* e *Z. mays* pela PRINS, contribuindo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de mapeamento físico em espécies vegetais. Além disso, a localização dos genes de rDNA 5S ainda não se encontra disponível no mapa de ligação ou no genoma sequenciado de *Eucalyptus*. Dentro desse contexto, a localização física das sequências de rDNA 5S de *E. dunnii* pode ser integrada aos dados de sequenciamento e auxiliar no alinhamento de sequências e posicionamento dos genes de rDNA 5S no genoma sequenciado.

ABSTRACT

SATTLER, Mariana Cansian, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Physical mapping of 5S rDNA in *Eucalyptus dunnii* Maiden and *Zea mays* L. by the PRINS technique.** Advisor: Carlos Roberto de Carvalho.

The in situ detection of DNA sequences by molecular cytogenetic techniques is one of the most used methodologies for physical mapping. Although widely applied in genomic research, the Fluorescent In situ Hybridization (FISH) has been considered a relatively time-consuming technique, due to the need of constructing a labeled probe. The Primed In situ Labelling (PRINS), on the other hand, is a sensitive and fast alternative to FISH. Nevertheless, the specificity and sensitivity of the PRINS technique may be influenced by species-specific factors. Therefore, the present study aimed to adapt a reproducible PRINS protocol for the physical mapping of 5S rRNA genes in two species with chromosomes of relatively different sizes: *Eucalyptus dunnii* Maiden and *Zea mays* L. Initially, root meristems of both species were synchronized with hydroxyurea (HU) and treated with the anti-tubulin agent amiprophos methyl (APM) for metaphase accumulation. Then, the meristems were submitted to enzymatic maceration and the slides were prepared by the cell dissociation and air drying techniques. After pre-treatment of the slides, a pair of primers specific to the 5S region of *E. globulus* was used to the PRINS reaction, which consisted of a single cycle. The reaction was conducted on preparations of both *E. dunnii* and *Z. mays* containing morphologically preserved metaphasic chromosomes, without cytoplasmic debris or overlaps. The FISH technique was additionally conducted in the species *Z. mays* with the aim to confirm the results obtained by PRINS. The same pair of primers was used for constructing the fluorescently labeled probes, which were subsequently hybridized to the target DNA. The karyotypes of *E. dunnii* and *Z. mays* exhibited $2n = 2x = 22$ and $2n = 2x = 20$ chromosomes, respectively. In both species, the chromosome carrying the secondary constriction was classified as number 6. The classical cytogenetics protocol associated with PRINS resulted in clear signals for the 5S rDNA sequence in both interphase nucleus and metaphase chromosomes of *E. dunnii* and *Z. mays*. In *E. dunnii*, the 5S rRNA genes were mapped on the short arm of chromosome 5, in pericentromeric

position. In the species *Z. mays*, the signal was located in the terminal region of the chromosome 2 long arm. The FISH technique confirmed the result obtained by the PRINS reaction in this species. Although the chromosome size may influence the resolution of molecular cytogenetic techniques, the described protocol resulted in a high signal:background ratio for both studied species, evidencing its reproducibility. This study comprises the first report on the mapping of specific sequences in *E. dunnii* and *Z. mays* by the PRINS technique, contributing to the development and improvement of physical mapping techniques in plant species. In addition, the localization of 5S rDNA genes is not yet available in the linkage map or in the sequenced genome of *Eucalyptus*. In this context, the physical localization of *E. dunnii* 5S rDNA may be integrated with sequencing data and assist in sequence alignment and positioning of 5S rDNA genes in the sequenced genome.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Citogenética molecular	5
2.1.1 <i>FISH</i>	5
2.1.2 <i>PRINS</i>	7
2.2 Mapeamento de sequências de DNA.....	8
2.2.1 <i>Mapeamento de genes de rDNA</i>	11
2.3 <i>Eucalyptus</i> L'Hér	12
2.4 <i>Zea mays</i> L.....	15
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Obtenção de cromossomos metafásicos de <i>E. dunnii</i> e <i>Z. mays</i>	19
4.1.1 <i>Material biológico</i>	19
4.1.2 <i>Sincronização e bloqueio do ciclo celular</i>	19
4.1.3 <i>Maceração enzimática de meristemas radiculares e preparo das lâminas</i>	20
4.2 Padronização do protocolo de PRINS	20

4.2.1 Seleção dos primers	21
4.2.2 Pré-tratamento das lâminas.....	21
4.2.3 Reação de PCR <i>in situ</i> e lavagens pós-PRINS	21
4.3 FISH em <i>Z. mays</i>.....	22
4.3.1 Obtenção da sonda marcada.....	22
4.3.2 Pré-tratamento das lâminas.....	23
4.3.3 Desnaturação e hibridização <i>in situ</i>	24
4.4 Análise e captura das imagens	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Citogenética clássica.....	26
5.2 PRINS em <i>E. dunnii</i> e <i>Z. mays</i>	26
5.3 FISH em <i>Z. mays</i>	27
6 DISCUSSÃO	34
7 CONCLUSÕES.....	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A localização de sequências específicas de DNA é relevante para o entendimento acerca da estrutura, evolução e função do genoma das espécies (Harper e Cande, 2000; Wang et al., 2006). Genes de RNA ribossômico, como os de rRNA 5S, têm se mostrado marcadores importantes para a identificação e caracterização de cromossomos (Hwang et al., 2015), bem como para estudos filogenéticos e evolutivos (Krishnan et al., 2001; Scaldaferrero et al., 2015). Nos eucariotos superiores, os genes de rRNA 5S encontram-se organizados em repetições em tandem, podendo estar localizadas em um ou vários cromossomos do genoma (Cloix et al., 2000). O mapeamento dessas sequências é importante para espécies vegetais que exibem cromossomos pequenos e homomórficos, como *Glycine max* (Singh et al., 2001), *Coffea* (Hamon et al., 2009) e *Eucalyptus* sp. (Ribeiro et al., 2016), uma vez que pode auxiliar no correto pareamento dos cromossomos homólogos.

Duas abordagens têm sido utilizadas para o mapeamento de sequências específicas de DNA: o mapeamento genético e o físico. No mapeamento genético, as posições relativas dos genes são identificadas com base nas suas frequências de recombinação (Hass-Jacobus e Jackson, 2005). Embora os mapas genéticos sejam relevantes para estudos genômicos, as distâncias obtidas pelas frequências de recombinação nem sempre refletem a distância real entre os *loci* (Sun et al., 2013). O mapeamento físico, por outro lado, revela a localização real (física) das sequências de DNA (Harper e Cande, 2000). A detecção *in situ* de sequências de DNA em preparações citológicas obtidas por meio de técnicas de citogenética molecular, como a Hibridização *In Situ*

Fluorescente (FISH – *Fluorescent In situ Hybridization*) (Leitch e Heslop-Harrison, 1992; Harper e Cande, 2000) e a Reação de Amplificação In Situ (PRINS – *Primed In situ Labelling*) (Kaczmarek e Naganowska, 2007), consiste em uma das metodologias mais empregadas para o mapeamento físico.

A FISH foi descoberta em 1969 por Gall e Pardue (1969). Desde então, sua aplicação na citogenética molecular se expandiu consideravelmente e os protocolos foram finamente ajustados para diferentes objetivos. Embora seja amplamente utilizada na citogenética molecular, a técnica de FISH apresenta algumas desvantagens, como a baixa sensibilidade para sequências alvo menores do que 10 kb (Jiang e Gill, 2006) e a necessidade de construção de uma sonda marcada (Menke et al., 1998; Jiang e Gill, 2006). O processo de marcação e avaliação da qualidade da sonda, embora simples, torna a técnica de FISH relativamente demorada (Menke et al., 1998; Pellestor, 2007).

A PRINS consiste de uma técnica rápida e sensível que tem sido aplicada como uma alternativa ao FISH para a detecção de sequências de DNA (Kubaláková e Doležel, 1998). A metodologia da PRINS combina a alta sensibilidade da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a localização *in situ* de sequências de DNA. Quando comparado com a técnica de FISH, a PRINS apresenta algumas vantagens, como: a) os *primers* necessários para a reação são pequenos oligonucleotídeos (20 a 35 pb) e podem ser sintetizados com o mínimo de informações prévias acerca da sequência-alvo; b) em virtude de seu pequeno tamanho, os *primers* de oligonucleotídeos (18 a 30 pares de bases - pb) se hibridizam mais rápida e facilmente aos cromossomos compactados do que as sondas (400 a 800 pb) empregadas no FISH; c) não é necessário marcar os *primers* com fluorescência e nem expor o material a longos períodos de

hibridização, tornando a técnica consideravelmente mais rápida (Menke et al., 1998). Enquanto o procedimento padrão da FISH envolve cerca de dois dias para ser realizado, a técnica de PRINS pode ser finalizada em 2 a 3 horas (Hirai, 2011); d) uma vez que os *primers* não são marcados, é possível utilizá-los em elevadas concentrações, possibilitando aumentar a sensibilidade sem promover o aumento do *background* (Kubaláková et al., 2001).

A aplicação de técnicas de citogenética molecular em cromossomos vegetais tem sido considerada uma tarefa árdua em virtude da presença de parede celular e cromossomos altamente condensados (Zhang e Friebe, 2009; Kirov et al., 2014). Tais características podem afetar negativamente a acessibilidade da sonda/*primer* ao DNA alvo, interferindo na sensibilidade e eficiência de detecção (Zhang e Friebe, 2009). Por esse motivo, a utilização de preparações citogenéticas de boa qualidade, com cromossomos preservados, bem definidos, sem sobreposições ou resíduos de citoplasma, é fundamental para obter sinais de fluorescência nítidos após a aplicação de técnicas de citogenética molecular (Andres e Kuraparthi, 2013).

Em paralelo ao avanço da citogenética clássica, o aprimoramento dos protocolos de citogenética molecular tem proporcionado resultados cada vez mais satisfatórios para o mapeamento físico em cromossomos vegetais (Jiang e Gill, 2006). Embora seja uma alternativa atrativa ao FISH, diferentes autores têm demonstrado que o PRINS ainda apresenta baixa reprodutibilidade entre espécies diferentes. Kubaláková et al. (2001) evidenciaram que a sensibilidade e especificidade das reações de PRINS podem ser influenciadas por fatores espécie-específicos, exigindo que o protocolo seja finamente ajustado para cada espécie em particular. Dentro desse contexto, a adaptação de um protocolo de

PRINS aplicável para diferentes espécies de plantas, desde aquelas com cromossomos pequenos (ex: *Eucalyptus* spp. L'Hér.) até espécies com cromossomos relativamente grandes (ex: *Zea mays* L.), pode representar um avanço significativo no desenvolvimento da citogenética molecular vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Citogenética molecular

2.1.1 FISH

A citogenética molecular consiste na análise de genomas por meio de tecnologias baseadas, principalmente, na Hibridização *In situ* (*In situ Hybridization* - ISH). A ISH foi descrita pela primeira vez no ano de 1969 por dois grupos de pesquisa independentes, Gall e Pardue (1969) e John et al. (1969). O desenvolvimento da técnica se baseou na descoberta de que uma sonda de RNA ou DNA marcado com radiação era capaz de se anelar (hibridizar) a moléculas de DNA alvo presentes em células ou cromossomos imobilizados em uma preparação citológica. Após a hibridização, uma autorradiografia possibilitaria revelar a posição dos híbridos de RNA-DNA ou DNA-DNA (Pardue e Gall, 1968; Gall e Pardue, 1969; John et al., 1969).

Sondas marcadas com radioisótopos foram amplamente empregadas em estudos de citogenética molecular após a descoberta da ISH. No entanto, alguns inconvenientes como a baixa sensibilidade, baixa resolução e ameaça à saúde em decorrência da manipulação de elementos radioativos levaram ao desenvolvimento da técnica de FISH (Langer et al., 1982; Kjeldsen e Kolvraa, 2002; Riegel, 2014).

O uso da técnica de FISH revolucionou a citogenética molecular, promovendo uma melhoria notável na sensibilidade da técnica e na qualidade

dos dados obtidos (Martins et al., 2010). A técnica de FISH é um tipo de ISH que envolve a utilização de substâncias fluorescentes (fluoróforos) para a detecção das sequências de interesse (Riegel, 2014). Dois elementos básicos são necessários para a condução do FISH: uma sonda de DNA específica para a sequência de interesse e uma molécula alvo de DNA imobilizada em uma preparação citológica (Speicher e Carter, 2005). A metodologia geral se baseia no mesmo princípio de qualquer método de hibridização que utilize a habilidade de fitas simples de DNA se anelarem a fitas de DNA complementares. No caso do FISH, o DNA alvo, que pode ser um cromossomo metafásico ou paquitênico, um núcleo interfásico ou uma fibra de cromatina estendida, se encontra imobilizado sobre a superfície de uma lâmina de microscopia (Bridger e Volpi, 2010).

A marcação da sonda utilizada no FISH pode ser realizada de duas formas: direta ou indireta. A marcação é denominada direta quando o fluoróforo está conjugado diretamente ao nucleotídeo incorporado na sonda. Por outro lado, quando o nucleotídeo se encontra conjugado a um hapteno não fluorescente, como a biotina, a marcação é chamada indireta (Riegel, 2014). A detecção de sondas marcadas indiretamente requer uma etapa adicional, que envolve, por exemplo, o reconhecimento das moléculas de dNTP biotiniladas por moléculas de avidina ou estreptavidina marcadas com fluorescência (Langer et al., 1982; Riegel, 2014).

Embora apresente numerosas vantagens, a FISH também apresenta limitações. A localização de sequências alvo de DNA menores do que 10 kb por meio da FISH ainda é limitada, especialmente em plantas (Jiang e Gill, 2006). Essa dificuldade técnica pode ser contornada pelo uso de sondas obtidas a partir

de clones de grande inserto, como BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*), dando origem ao BAC-FISH (Lee et al., 2003). Todavia, a obtenção de bibliotecas genômicas e identificação dos clones de BACs mais adequados para utilização como sonda é uma tarefa árdua (Talia et al., 2011). Outra desvantagem está associada à necessidade de obtenção de uma sonda marcada, uma vez que o processo de marcação e avaliação da qualidade das sondas é relativamente demorado (Menke et al., 1998; Pellestor, 2007).

2.1.2 PRINS

A técnica de PRINS, desenvolvida por Koch et al. (1989), tem sido considerada uma abordagem alternativa a FISH para a detecção *in situ* de sequências de DNA (Kubaláková e Dolezel, 1998). A metodologia envolve o anelamento de um *primer* específico de oligonucleotídeos não-marcados à uma sequência alvo de DNA, a qual se encontra localizada em uma preparação citológica. O *primer* não marcado serve como um iniciador para o alongamento *in situ* da sequência de DNA na presença de nucleotídeos livres, dos quais ao menos um dos tipos é marcado (Kubaláková e Dolezel, 1998; Pellestor, 2006).

Assim como no FISH, a marcação pode ser direta ou indireta, a depender do tipo de molécula à qual os nucleotídeos encontram-se conjugados. Na maioria das vezes, os nucleotídeos encontram-se conjugados a fluorocromos, possibilitando a visualização direta das sequências marcadas em microscópio de fluorescência (Liehr e Pellestor, 2009). Diversos tipos de sequências podem ser detectados pela técnica de PRINS. A localização de sequências de DNA

repetitivo pode ser conduzida por meio da utilização de um único *primer* e um único ciclo de reação (Kubaláková et al., 1997). Por outro lado, a localização de sequências de uma ou poucas cópias requer um maior número de ciclos, os quais possibilitam que várias cópias marcadas se acumulem no sítio de sua síntese. Nesse caso, a técnica passa a ser denominada PRINS cíclico (*Cycling-PRINS* ou *C-PRINS*) (Terkelsen et al., 1993).

A PRINS apresenta algumas vantagens quando comparado a FISH. Como os *primers* necessários para a reação de PRINS são pequenos oligonucleotídeos, eles são capazes de hibridizarem mais facilmente à sequências alvo contidas em segmentos de cromatina compactados. Por esse motivo, a PRINS tem se mostrado uma técnica altamente sensível, principalmente para a detecção de sequências repetitivas de DNA (Menke et al. 1998; Hirai, 2001). A utilização de *primers* não marcados faz com que o PRINS possa ser realizado em um curto período de tempo, sendo relativamente mais rápido e simples do que a FISH (Menke et al., 1998). Essa característica contribui para que os danos à morfologia dos cromossomos sejam minimizados, uma vez que o material não permanece exposto a condições desnaturantes por longos períodos de tempo (Hindkær et al., 1996). Além disso, uma grande quantidade de *primer* pode ser adicionada à reação sem que haja aumento significativo do *background* (sinais de fluorescência inespecíficos), contribuindo para uma maior sensibilidade (Hindkær et al., 1996; Kubaláková et al., 2001).

2.2 Mapeamento de sequências de DNA

O mapeamento genético foi a primeira metodologia a ser desenvolvida para investigar a organização linear dos genes ao longo dos cromossomos (Stutervant, 1913). Mapas genéticos se baseiam na utilização de taxas de recombinação entre *loci* para determinar a ordem e estimar a distância entre os mesmos (Hass-Jacobus e Jackson, 2005). Apesar de sua relevância e ampla aplicação na ciência, os mapas de ligação possuem algumas limitações. O mapeamento de ligação parte do pressuposto de que os *crossing-overs* ocorrem de maneira aleatória ao longo dos cromossomos. No entanto, sabe-se que em algumas regiões, denominadas *hotspots*, os *crossing-overs* ocorrem com maior frequência do que em outras (Oliver et al., 1992; Brown, 2002). Por esse motivo, a acurácia dos mapas de ligação é limitada e a distância genética estimada nos mesmos não reflete, necessariamente, a distância física (em pb) (Hass-Jacobus e Jackson, 2005). Assim, *loci* que estão fisicamente distantes entre si no cromossomo podem estar proximamente ligados no mapa de ligação, e vice-versa (Sun et al., 2013).

Desde a descoberta de que os cromossomos são os portadores da informação genética (Bridges, 1916), os pesquisadores têm manifestado um interesse crescente em relacionar a localização física de sequências de DNA nos cromossomos com suas posições nos mapas de ligação (Harper e Cande, 2000). A integração entre mapas genéticos e mapas físicos tem sido considerada fundamental para análises genômicas em espécies vegetais, uma vez que provê novas perspectivas acerca da estrutura e organização do genoma (Cheng et al., 2001; Kirov et al., 2014; Cui et al., 2015).

Em contraste com os mapas genéticos, os mapas físicos revelam as posições dos *loci* no genoma por meio de distâncias físicas. Essas distâncias

são geralmente expressas em pares de bases (pb), ou em valores múltiplos, como kilobases (kb; 1 kb = 1000 pb) (Deonier et al., 2005). Dois tipos de mapas físicos são comumente empregados em análises genômicas, os mapas obtidos por técnicas de biologia molecular (enzimas de restrição, clonagem, sequenciamento de DNA, etc.), e os mapas gerados pela aplicação de técnicas citogenéticas (mapas citogenéticos) (Brown, 2002).

Os mapas citogenéticos podem ser obtidos de duas maneiras. Uma delas consiste na determinação da posição de marcadores genéticos em relação a pontos de quebra cromossômica, envolvendo estoques genéticos com diferentes tipos de alterações cromossômicas (Harper e Cande, 2000). A segunda abordagem, mais popular desde os anos 70, é a detecção de sequências genéticas de forma direta em preparações citológicas por meio da FISH (Leitch e Heslop-Harrison, 1992; Harper e Cande, 2000) ou da PRINS (Kaczmarek e Naganowska, 2007).

O mapeamento físico de sequências por meio da citogenética molecular tem sido realizado com sucesso em diferentes espécies vegetais, como trigo (*Triticum* L.), milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e algodão (*Gossypium* L.) (Chahota et al., 2011). No melhoramento de plantas, o conhecimento acerca da localização de sequências de DNA associadas a características de relevância agronômica é fundamental para entender a herança e expressão dessas características, contribuindo para aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (Kole et al., 2015). Além de sua aplicação prática no melhoramento, o mapeamento de sequências também é fundamental para pesquisas evolutivas, fornecendo informações sobre a estrutura, organização,

evolução e função dos genomas (Maluszynska e Heslop-Harrison, 1993; Scaldaferrero et al., 2015).

2.2.1 Mapeamento de genes de rDNA

Dois tipos de sequências de rDNA estão presentes no genoma dos organismos eucariotos. As sequências de rDNA 45S estão associadas à região organizadora do nucléolo (NOR) e consistem de arranjos repetitivos em tandem. Cada unidade do arranjo é constituída por um espaçador intergênico (IGS) e pelos genes ribossômicos 18S, 5.8S e 28S, separados por espaçadores internos transcritos (ITS) (Sumner, 2003). Nas angiospermas, cada uma dessas unidades apresenta cerca de 6 a 13 kb e se repetem centenas a milhares de vezes em cada *locus* (Bellarosa et al., 1990). O rRNA 5S, por outro lado, é codificado por genes que se encontram em sítios distintos da NOR. Assim como o rDNA 45S, os genes de rDNA 5S estão agrupados em centenas a milhares de cópias em cada *locus* e podem estar presentes em um ou mais pares de cromossomos (Sumner, 2003).

Genes de RNA ribossômico têm se mostrado marcadores valiosos para estudos genômicos por serem sequências altamente conservadas e repetitivas, facilitando sua detecção em uma ampla variedade de espécies (Hwang et al. 2015; Scaldaferrero et al., 2015). Em muitos casos, o mapeamento de genes de rRNA consiste de um ponto de partida para a construção de mapas citogenéticos em espécies vegetais (Kwon e Kim, 2009; Hizume et al., 2013, Scaldaferrero et al., 2015). Youn-kyu et al. (1999), por exemplo, aplicaram a FISH para localizar

sequências de rDNA 5S e 18S-26S em cinco espécies cultivadas do gênero *Capsicum*. O padrão de distribuição dessas sequências ao longo do cariótipo de cada espécie possibilitou a identificação dos cromossomos. Para a sequência de rDNA 5S, o estudo consistiu no primeiro relato acerca de sua posição no genoma de *Capsicum*, uma vez que sua localização ainda não era conhecida nos mapas de ligação disponíveis. Além disso, os autores evidenciaram uma grande variação no número e posição dos *loci* de rDNA entre as espécies estudadas, o que torna essas sequências interessantes para estudos evolutivos.

A variação no número e na localização dos genes de rDNA consiste de uma ferramenta potencial para estudos evolutivos e filogenéticos, fornecendo evidências sobre as mudanças evolutivas que ocorreram ao longo da evolução do genoma, como hibridação, poliploidização e a diploidização. As espécies diploides da tribo Triticeae, por exemplo, apresentam ampla variação no número de *loci* de rDNA, indo de um único par em centeio (*Secale cereale* L.) a cinco pares em cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Leitch e Heslop-Harrison, 1992). O mapeamento de genes de rDNA tem contribuído para elucidar as relações filogenéticas em diversas espécies de plantas, tais como trigo (*Triticum* L. – Leitch e Heslop-Harrison, 1992), *Brassica* L. (Maluszynska e Heslop-Harrison, 1993), peônias (*Paeonia* L. – Zhang e Sang, 1999), *Festuca* (Thomas et al., 1997) e aveia (*Avena* L. – Röser et al., 2001).

2.3 *Eucalyptus* L'Hér

O gênero *Eucalyptus* L'Hér (Myrtaceae) compreende mais de 700 espécies, arbóreas e arbustivas, nativas da Austrália e de Ilhas do Pacífico localizadas ao norte da mesma (Grattapaglia e Kirst, 2008). Desde a sua descoberta no século XVIII pelos europeus, as espécies de *Eucalyptus* foram rapidamente adotadas para plantios florestais em todo o mundo (Moore e Ming, 2013). No ano de 2014, *Eucalyptus* e *Pinus* L. consistiram dos táxons arbóreos cultivados de maior relevância econômica no mundo (OECD, 2014). Cerca de 26% de toda a área mundial de floresta plantada (54,3 milhões de hectares - ha) consistem de *Eucalyptus*, sendo o Brasil e a Índia os detentores das maiores áreas de plantio (Indufor, 2012). Dentre as espécies do gênero, *Eucalyptus dunnii* Maiden tem se destacado no Brasil devido ao seu crescimento rápido e uniforme, boa forma das árvores e resistência à geada, sendo indicada para plantio nos Estados de Santa Catarina e Paraná (Higa et al., 2000; Floriani et al. 2011).

O elevado nível de produtividade das florestas de *Eucalyptus* se deve, em grande parte, aos programas de melhoramento florestal. O melhoramento do eucalipto teve início por volta das décadas de 1960 e 1970, e se desenvolveu rapidamente em países como o Brasil, África do Sul, Portugal e Chile (Eldridge et al., 1994). No Brasil, os programas de melhoramento florestal possibilitaram um desenvolvimento notável da produtividade de eucalipto (5,7% ao ano de 1970 a 2008) (IBÁ, 2015).

A pesquisa citogenética em *Eucalyptus* ainda é incipiente. Grande parte dos trabalhos conduzidos no gênero permanecem limitados, principalmente, a contagens cromossômicas (Ruggeri, 1961; Haque, 1984; Oudjehih e Abdellah, 2006). A despeito da grande diversidade morfológica e ecológica entre as

espécies de *Eucalyptus*, quase todos os exemplares avaliados exibem $2n = 2x = 22$ cromossomos. Variações em relação a esse número provavelmente se devem a erros de contagem. Desse modo, é possível afirmar que o número básico de cromossomos do gênero é de $x = 11$ (Oudjehih e Abdellah, 2006).

A morfologia dos cromossomos das espécies de eucalipto ainda é pouco conhecida. Isso se deve, principalmente, ao pequeno tamanho dos cromossomos, o que dificulta a distinção entre os pares homólogos e a condução de análises cariomorfológicas (Haque, 1984; Matsumoto et al., 2000; Oudjehih e Abdellah, 2006). Cromossomos metafásicos bem definidos e com elevada resolução longitudinal são fundamentais para o correto pareamento e classificação dos cromossomos, bem como para a realização de análises de citogenética molecular (Andres e Kuraparthi, 2013). Carvalho e Carvalho (2016) adaptaram um protocolo citogenético para a montagem de kariogramas de *Eucalyptus citriodora* Hook. Por meio deste, os autores obtiveram metáfases mitóticas que possibilitaram a construção de três kariogramas com diferentes níveis de compactação da cromatina. O número cromossômico observado nos três kariogramas foi de $2n = 22$, com tamanhos variando de 0,99 a 2,03 μm para o kariograma mais condensado, e de 1,80 a 4,13 μm para o kariograma com cromatina menos condensada. A classificação dos cromossomos quanto à posição do centrômero também variou entre os diferentes níveis de condensação. A metáfase mais compactada exibiu nove cromossomos metacêntricos e dois submetacêntricos. Por outro lado, o kariograma menos condensado apresentou seis cromossomos metacêntricos e cinco submetacêntricos.

O primeiro estudo de citogenética molecular em *Eucalyptus* foi conduzido por Ribeiro et al. (2016). Seis espécies foram avaliadas quanto à localização de genes de rDNA 35S e 5S, de genes relacionados à síntese de lignina e de regiões de heterocromatina constitutiva. As seis espécies exibiram um único padrão para os genes de RNA ribossômico, que consistiu de um *cluster* de rDNA 35S pericentromérico no cromossomo 1 e um *cluster* de rDNA 5S pericentromérico no cromossomo 3. Apesar do posicionamento comum, a organização dos *loci* de rDNA 35S apresentou variações entre as espécies. A localização do gene CCR1, associado à síntese de lignina, divergiu em relação ao mapa genético. Embora seja atribuído ao grupo de ligação 10 (LG10 – *scaffold J*) de *E. grandis*, a técnica de hibridização *in situ* possibilitou detectar o gene CCR1 na porção terminal do braço longo do cromossomo 9, evidenciando uma ausência de correlação entre o mapa físico e o mapa de ligação.

2.4 *Zea mays* L.

Zea mays L. (Poaceae), comumente conhecida como milho, é uma das espécies de maior importância agronômica e econômica em todo o mundo (NCGA, 2017). Além de sua relevância para o agronegócio, *Z. mays* consiste de uma espécie modelo para estudos citogenéticos por apresentar cromossomos relativamente longos. Os primeiros estudos citogenéticos em *Z. mays* foram conduzidos por Bárbara McClintock há cerca de 90 anos (McClintock, 1929). A espécie apresenta $2n = 2x = 20$ cromossomos, com um número básico de $x = 10$. Em seu trabalho, McClintock (1929) representou as características dos

cromossomos de *Z. mays* em um idiograma, o qual evidenciou as contrações primárias de cada cromossomo e um satélite no cromossomo 6.

A classificação dos cromossomos de *Z. mays* quanto a posição do centrômero tem sido realizada tanto em cromossomos mitóticos quanto meióticos. Caixeta et al. (2001) desenvolveram um protocolo otimizado para a obtenção de cromossomos paquitênicos de *Z. mays*, o qual possibilitou individualizar cada bivalente e estudá-las quanto a relação de braços, posição de *knobs*, presença de NOR e comprimento total. Os cromossomos paquitênicos incluem três cromossomos metacêntricos (1, 2 e 5), seis submetacêntricos (3, 4, 6, 7, 9 e 10) e um acrocêntrico (8). O cromossomo 6 é o único do cariótipo que apresenta uma contração secundária. A análise dos cromossomos mitóticos em diferentes estudos evidenciou a mesma classificação (Rosado et al., 2009). Variações em relação a essa classificação podem ser observadas na literatura, principalmente para cromossomo número 6 (Rhoades, 1950; Chen et al., 2000; Mondin et al., 2014).

Os cromossomos morfológicamente longos de *Z. mays* também tornam essa espécie um alvo para estudos de citogenética molecular. Desde a descoberta da FISH, uma coleção de sondas para sequências repetitivas foi desenvolvida para *Z. mays* (Wang e Chen, 2005). Essa coleção de sondas inclui genes de rRNA 18S e 5S, a unidade centromérica CentC, a repetição Cent4 próxima ao centrômero do cromossomo 4, sequências específicas para determinados *knobs* e repetições subteloméricas (Bennetzen e Hake, 2009). A hibridização de uma mistura dessas sondas em cromossomos mitóticos ou paquitênicos de *Z. mays* tem possibilitado identificar, inequivocamente, cada um

dos cromossomos em várias linhagens dessa espécie (Chen et al., 2000; Sadler e Weber, 2001; Kato et al., 2004; Mondin et al., 2014).

Embora a detecção de sequências de cópia única pela técnica de FISH seja mais desafiadora, alguns autores obtiveram sucesso no mapeamento de genes de cópia única em *Z. mays*. Wang et al. (2006), por exemplo, localizaram nove genes de cópia única no cromossomo 9 da espécie e montaram um mapa físico de alta resolução para esse cromossomo. A integração do mapa físico com o mapa de ligação disponível no banco de dados revelou discrepâncias entre as distâncias físicas e genéticas, principalmente nas regiões de heterocromatina pericentromérica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo a padronização de um protocolo de PRINS para o mapeamento físico de sequências de rDNA 5S em cromossomos metafásicos das espécies *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Zea mays* L.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Adaptar os protocolos de citogenética clássica descritos por Carvalho e Carvalho (2016) e Silva (2016) para a obtenção de metáfases de *E. dunnii* e *Z. mays* com cromossomos adequados para as análises de citogenética molecular.
- 2- Adaptar um protocolo de PRINS para a localização física de sequências de rDNA 5S em cromossomos metafásicos das espécies *E. dunnii* e *Z. mays*.
- 3- Confirmar a localização da sequência alvo por meio da técnica de FISH em *Z. mays*.
- 4- Montar os kariogramas e alocar as marcas de rDNA 5S nos cromossomos de *E. dunnii* e *Z. mays*.
- 5- Comparar os resultados obtidos no presente estudo com mapas genéticos e físicos disponíveis na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de cromossomos metafásicos de *E. dunnii* e *Z. mays*

4.1.1 Material biológico

Sementes de *E. dunnii* e *Z. mays* 'Al Bandeirante' foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada. As sementes foram mantidas em estufa a 30°C até que as raízes atingissem tamanho de aproximadamente 0,5 cm (*E. dunnii*) ou 1 cm (*Z. mays*).

4.1.2 Sincronização e bloqueio do ciclo celular

Os protocolos de citogenética clássica aplicados em *E. dunnii* e *Z. mays* foram adaptados de Carvalho e Carvalho (2016) e Silva (2016), respectivamente. Meristemas radiculares de *E. dunnii* foram submetidos a sincronização do ciclo celular por meio de tratamento com 1,5, 1,75 ou 2 mM de hidroxiuréia (HU - Sigma®) por 18 h a 30°C. Para *Z. mays*, a concentração utilizada foi 1,75 mM (Silva, 2016). Após a sincronização, as raízes foram lavadas durante 1 h em água destilada, com trocas a cada 10 min.

Os meristemas radiculares foram tratados em solução contendo 2,0, 3,0 ou 4,0 µM do agente anti-tubulínico amiprofos-metil (APM - Sigma®) e 0,3% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma®) durante 4 h. Após o tratamento com APM, o

material biológico foi fixado em solução de metanol:ácido acético na proporção de 3:1, com três trocas de 10 min. Após a última troca, o material foi armazenado a -20°C (Carvalho et al., 2007).

4.1.3 Maceração enzimática de meristemas radiculares e preparo das lâminas

Para a maceração enzimática da parede celular, os meristemas radiculares das espécies foram lavados em água destilada e, posteriormente, incubados a 35°C durante 2 h em uma solução enzimática. Tal solução foi constituída de um pool enzimático (0,5% Celulase Yakult + 2% Celulase Sigma[®], C1184 + 0,5% Hemicelulase Sigma[®], H0771 + 0,5% Macerozyme orozuka R10 Yakult) diluído em tampão citrato (10 mM de ácido cítrico e 10 mM de citrato de sódio tribásico) e acrescido de Pectinase (Sigma[®], P2736). As proporções de tampão:pool:pectinase testadas para *E. dunnii* foram 40:10:1,5, 50:10:1,5 ou 60:10:1,5. Para *Z. mays*, a proporção utilizada foi de 50:100:1 (Silva, 2016). Após a maceração, os meristemas radiculares foram lavados em água destilada e fixados em solução de metanol:ácido acético (3:1). As lâminas de *E. dunnii* e *Z. mays* foram confeccionadas por meio das técnicas de dissociação celular e secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993).

4.2 Padronização do protocolo de PRINS

Os protocolos de PRINS foram modificados de Kubaláková e Dolezel (1998), Menke (1998), Macas et al. (2006), Kaczmarek et al. (2007).

4.2.1 Seleção dos primers

A reação de amplificação *in situ* (PRINS) em cromossomos metafásicos de *E. dunnii* e *Z. mays* foi conduzida com *primers* específicos para a sequência de rDNA 5S de *Eucalyptus globulus* Labill. (Forward: CCTGGGAAGTCCTCGTGTTG; Reverse: CTTCGGAGTTCTGATGGGAT). A sequência dos *primers* foi obtida com base em Ribeiro et al. (2016) e construída pela empresa Sigma-Aldrich®.

4.2.2 Pré-tratamento das lâminas

Lâminas contendo cromossomos metafásicos de *E. dunnii* e *Z. mays* foram envelhecidas por dois a três dias em estufa a 37°C. Após o envelhecimento, as lâminas foram submetidas às seguintes lavagens: a) tampão fosfato salino 1x (PBS, pH = 7,4) por 5 min; b) formalina 3% (3% de formaldeído diluído em PBS 1x) durante 15 min; c) PBS por 5 min; e d) série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%, 5 min cada). Após a série alcoólica as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem.

4.2.3 Reação de PCR *in situ* e lavagens pós-PRINS

Para a reação de PRINS, 35 µL de uma mistura de reação foram aplicados sobre a superfície das lâminas tratadas. Tal mistura foi constituída por: 15 U de ThermoSequenase DNA Polymerase, 1x do tampão de reação da enzima (GE Healthcare®), 200 µM de cada dNTP (Promega), 50 µM de ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-dUTP e 2 µM de cada *primer*. As lâminas contendo a mistura de reação foram cobertas com uma lamínula de plástico com dimensão de 22 x 60 mm e o conjunto foi vedado com cola Rubber Cement. A reação de PRINS foi conduzida em termociclador específico para PCR *in situ* (Biometra® T1 Thermocycler *in situ*). O programa de amplificação consistiu de um único ciclo com 3 min de desnaturação a 90°C, 20 min de anelamento a 60°C e 30 min de extensão a 72°C.

Ao término da reação de PRINS, as lâminas foram lavadas duas vezes em solução de SSC 2x (pH = 7,0) por 5 min e contra-coradas com 50 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a 5 µM por pelo menos 15 min.

4.3 FISH em *Z. mays*

Os procedimentos de FISH foram adaptados dos protocolos descritos por Zhang e Friebe (2009).

4.3.1 Obtenção da sonda marcada

O DNA total de *Z. mays* foi extraído por meio da utilização do Kit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma®) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a extração, o DNA foi amplificado utilizando os mesmos *primers* confeccionados para o PRINS (específico para rDNA 5S de *E. globulus*). A mistura de reação foi constituída de: 2 U de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen®), 1x do tampão de reação da enzima (Invitrogen®), 2 mM de MgSO₄ (Invitrogen®), 200 µM de cada dNTP (Promega®) e 0,4 µM de cada *primer*. A amplificação foi conduzida no termociclador MJ Research® PTC-200 Thermal Cycler nas seguintes condições de amplificação: 94°C, 3 min; seguido de 30 ciclos de 91°C, 1 min; 60°C, 1 min; rampa: 0,1°C/segundos até 68°C; e 68°C, 2 min. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Uniscience®).

A marcação dos fragmentos amplificados foi realizada por meio de PCR convencional com nucleotídeos acoplados a um fluoróforo. A mistura de reação foi constituída de: 2 U de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 1x do tampão de reação da enzima (Invitrogen®), 2 mM de MgSO₄ (Invitrogen®), 200 µM de cada dNTP (Promega®), 50 µM de ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-dUTP, 0,4 µM de cada *primer* e 200 ng do DNA molde amplificado, totalizando um volume final de 50 µL para cada reação. As condições de reação de marcação foram as mesmas utilizadas na reação de amplificação.

4.3.2 Pré-tratamento das lâminas

Inicialmente, as lâminas foram lavadas em tampão PBS por 5 min e submetidas à fixação em solução de formalina 3% por 15 min. Após a fixação, as lâminas foram novamente lavadas em PBS por 5 min e, então, submetidas à série alcoólica gelada (etanol 70%, 85% e 100% - 5 min cada).

4.3.3 Desnaturação e hibridização in situ

A sonda foi desnaturada por 5 min a temperatura de 85°C em 35 µL de uma mistura de hibridização contendo 50% de formamida, SSC 2x, 10% de dextran sulfato, 1 µg de DNA competidor (Cot-1 – Invitrogen®) e 200 ng da sonda marcada. Após a desnaturação, a sonda foi imediatamente colocada no gelo por aproximadamente 5 min. Para a hibridização, a mistura contendo a sonda desnaturada foi adicionada sobre as lâminas pré-tratadas. O material foi coberto com lamínula de plástico (22 x 40 mm) e selado com cola Rubber Cement. As lâminas e a sonda foram submetidas a uma nova etapa de desnaturação a 72°C por 5 min, seguida pela a etapa de hibridização por 24 h a 37°C no equipamento Thermobrite™.

Após a hibridização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas submetidas às lavagens de estringência (ou pós-hibridização), que consistiram de três trocas de 5 min em soluções contendo 50% formamida diluída em SSC 2x (pH = 7,0) e uma lavagem em solução de SSC 2x por 5 min. Todas essas lavagens foram realizadas em banho-maria a temperatura de 45°C, resultando em um nível de estringência de aproximadamente 82%.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 5 min em SSC 2x e contra-coradas com 50 μ L de DAPI a 5 μ M.

4.4 Análise e captura das imagens

A visualização das lâminas foi conduzida em fotomicroscópio Olympus™, modelo BX-60 equipado com acessórios de análise de imagem, iluminação de campo claro e de fluorescência, e com objetiva de imersão de 100x. As imagens foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera CCD (Olympus™ DP71) acoplada ao microscópio e a um computador equipado com placa digitalizadora.

5 RESULTADOS

5.1 Citogenética clássica

As sementes de ambas as espécies germinaram de forma uniforme após cerca de 3 dias de cultivo em estufa a 30°C. O protocolo de sincronização dos meristemas radiculares de *E. dunnii* e *Z. mays* com 1,75 mM de HU e posterior tratamento com 3,0 µM de APM forneceu lâminas com acúmulo de metáfases, as quais exibiram cromossomos com diferentes níveis de compactação da cromatina. A combinação entre a maceração enzimática (nas proporções de 50:10:1,5 para *E. dunnii* e 50:100:1 para *Z. mays*) e as técnicas de dissociação celular e secagem ao ar proveu lâminas com cromossomos morfologicamente preservados, com constrições primárias e secundárias bem definidas, sem sobreposições e sem resíduos de citoplasma ou parede celular (Figuras 1b, 2b e 2d).

Todas as imagens de cromossomos metafásicos de *E. dunnii* observadas evidenciaram $2n = 2x = 22$ cromossomos. O cromossomo número 6 apresentou uma constrição secundária pericentromérica no braço curto, referente à NOR (Figura 1b). A espécie *Z. mays* exibiu o número cromossômico esperado de $2n = 2x = 20$, sendo o par número 6 portador de uma constrição secundária na região terminal do braço curto (Figura 2b e 2d).

5.2 PRINS em *E. dunnii* e *Z. mays*

O protocolo de PRINS resultou em sinais nítidos para a sequência de rDNA 5S nos núcleos interfásicos e nos cromossomos metafásicos de *E. dunnii* (Figura 1a e Figuras 1b e 1c, respectivamente) e *Z. mays* (Figura 2a e 2b, respectivamente), com pouco ou nenhum *background*. Cada núcleo interfásico analisado exibiu dois sinais claros em ambas as espécies (Figuras 1a e 2a). No cariótipo de *E. dunnii*, o sinal para a região 5S foi detectado no braço curto do cromossomo 5, em posição pericentromérica (Figura 1b e 1c). Em *Z. mays*, o sinal foi localizado na região terminal do braço longo do cromossomo 2 (Figura 2b).

5.3 FISH em *Z. mays*

A amplificação do DNA de *Z. mays* pelos *primers* específicos para a região 5S de *E. globulus* gerou fragmentos com tamanho aproximado de 400 pb, bem como fragmentos entre 400 e 800 pb em menores quantidades, conforme observado no gel de agarose 1,5% (Figura 3a). A marcação do produto de PCR sob as mesmas condições de amplificação restringiu os fragmentos a um tamanho próximo de 400 pb (Figura 3b), gerando uma sonda marcada específica para as sequências de rDNA 5S de *Z. mays*.

A hibridização da sonda marcada em núcleos interfásicos e cromossomos metafásicos de *Z. mays* gerou sinais nítidos (Figura 2c e 2d, respectivamente). Nos cromossomos metafásicos, o sinal de fluorescência foi detectado na região terminal do braço longo do cromossomo 2 (Figura 2d). O nível de estringência aplicado durante o processo de hibridização e nas lavagens

pós-hibridização resultaram em imagens cromossômicas com pouco ou nenhum *background*.

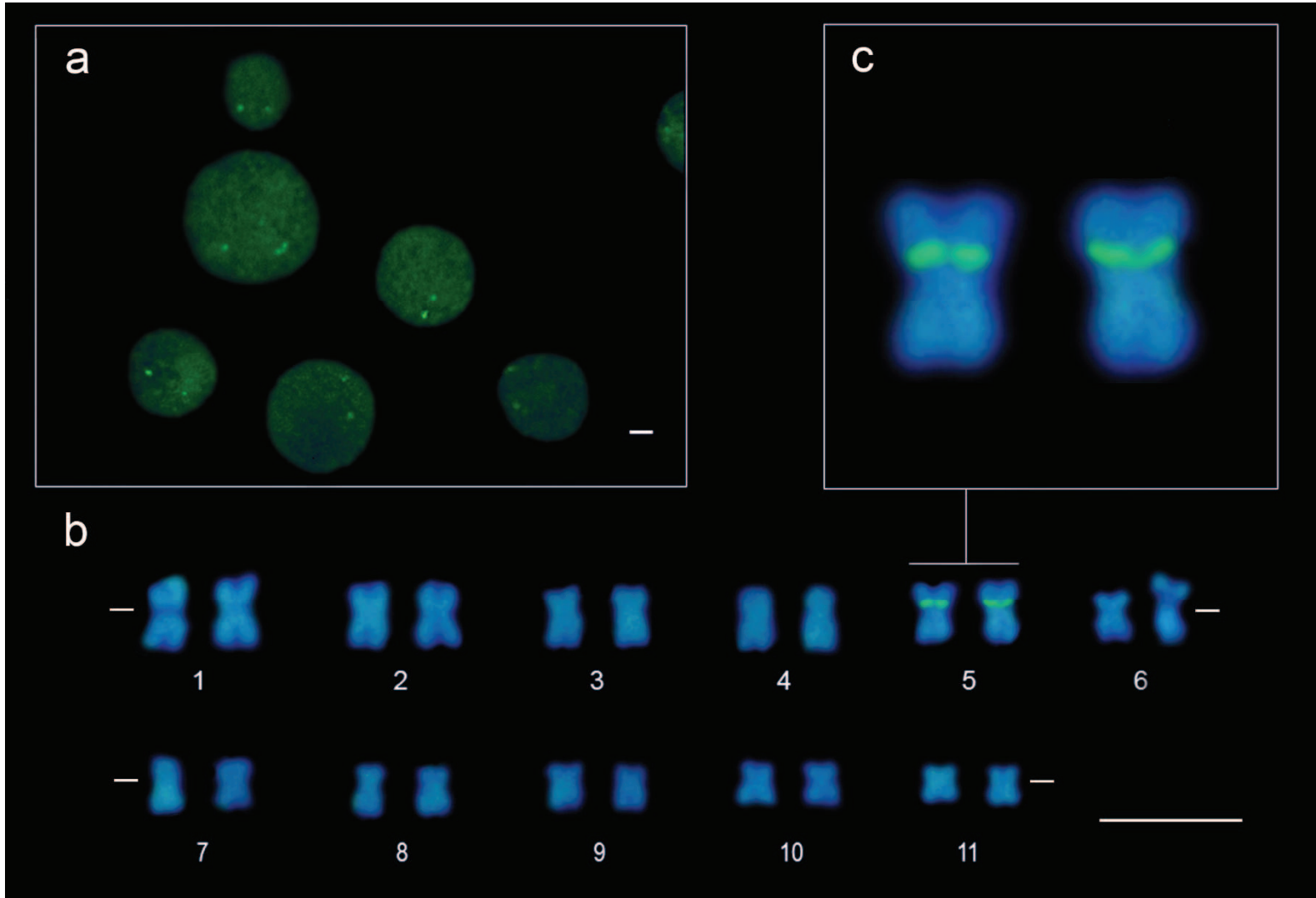


Figura 1. Localização de genes de rDNA 5S em *E. dunnii* pela técnica de PRINS. **a)** Núcleos interfásicos exibindo *spots* de fluorescência referentes aos genes de rRNA 5S. **b)** Cromossomos metafásicos de *E. dunnii* obtidos após a reação de PRINS. O cariógrama evidencia $2n = 2x = 22$ cromossomos, alinhados entre si pela região do centrômero e ordenados com base no seu tamanho total. Os genes de rDNA 5S foram detectados no braço curto do par número 5, em região pericentromérica. Nota-se a constrição secundária estirada em um dos cromossomos do par número 6. **c)** Detalhe do par cromossômico número 5 contendo a marcação fluorescente gerada por meio do PRINS. Barras: 5 μm .

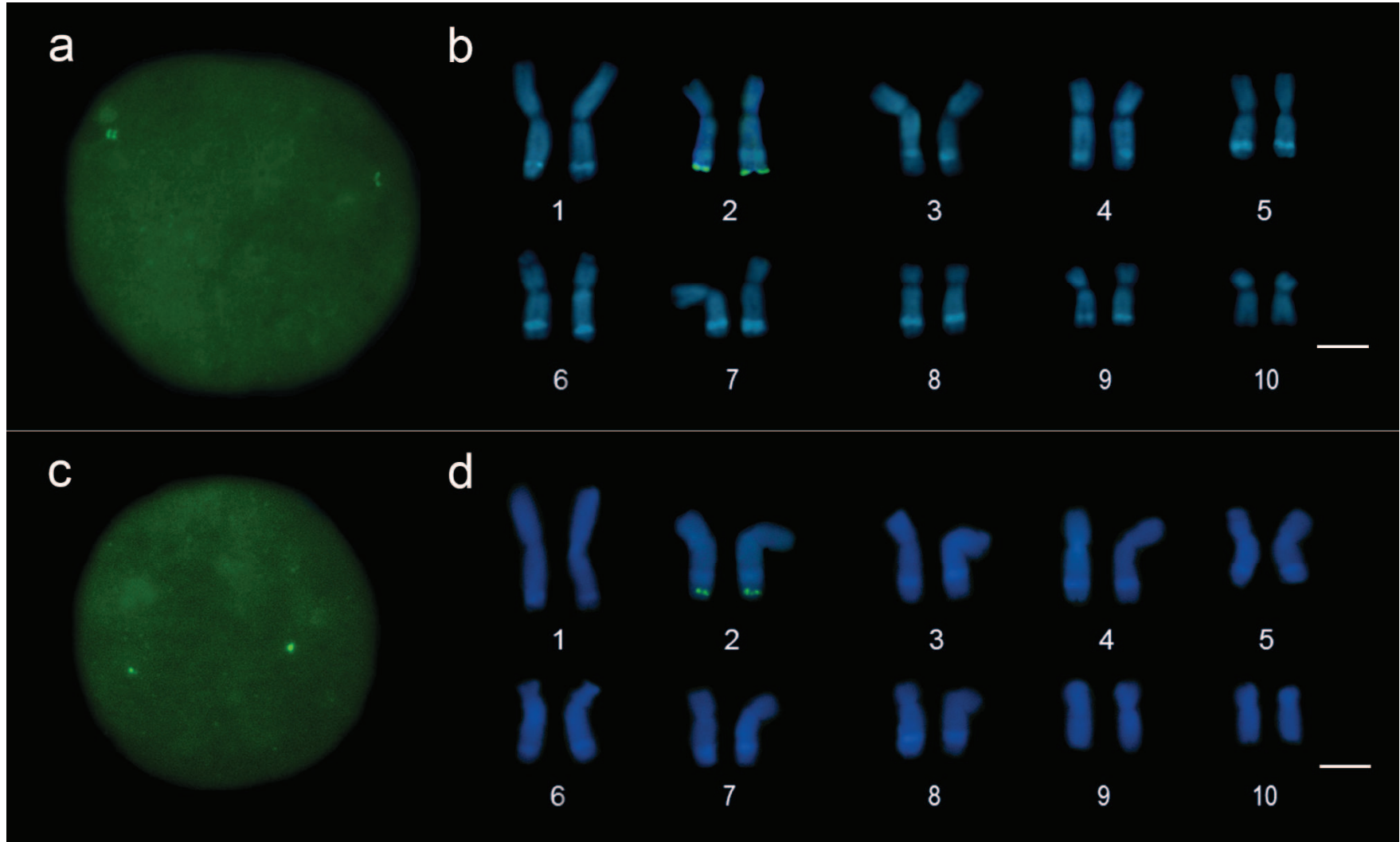


Figura 2. Localização de genes de rDNA 5S em *Z. mays*. Núcleo interfásico **(a)** e metáfase mitótica ($2n = 2x = 20$) **(b)** evidenciando os sinais de fluorescência detectados por meio da técnica de PRINS. Nos cromossomos, a região de rDNA 5S foi mapeada na região terminal do braço longo do cromossomo 2. As figuras **c)** e **d)** revelam um núcleo interfásico e uma metáfase mitótica, respectivamente, contendo sinais de fluorescência obtidos pela hibridização de sondas fluorescentes (FISH) construídas com os mesmos *primers* utilizados no PRINS. As sequências de rDNA 5S também foram detectadas no braço longo do cromossomo 2. Nota-se que os *knobs* estão mais evidentes nos cromossomos da figura **b)**, provavelmente devido à exposição dos cromossomos a temperaturas mais elevadas no PRINS (desnaturação a 90°C) do que no FISH (desnaturação a 72°C). Barras: 5 µm.

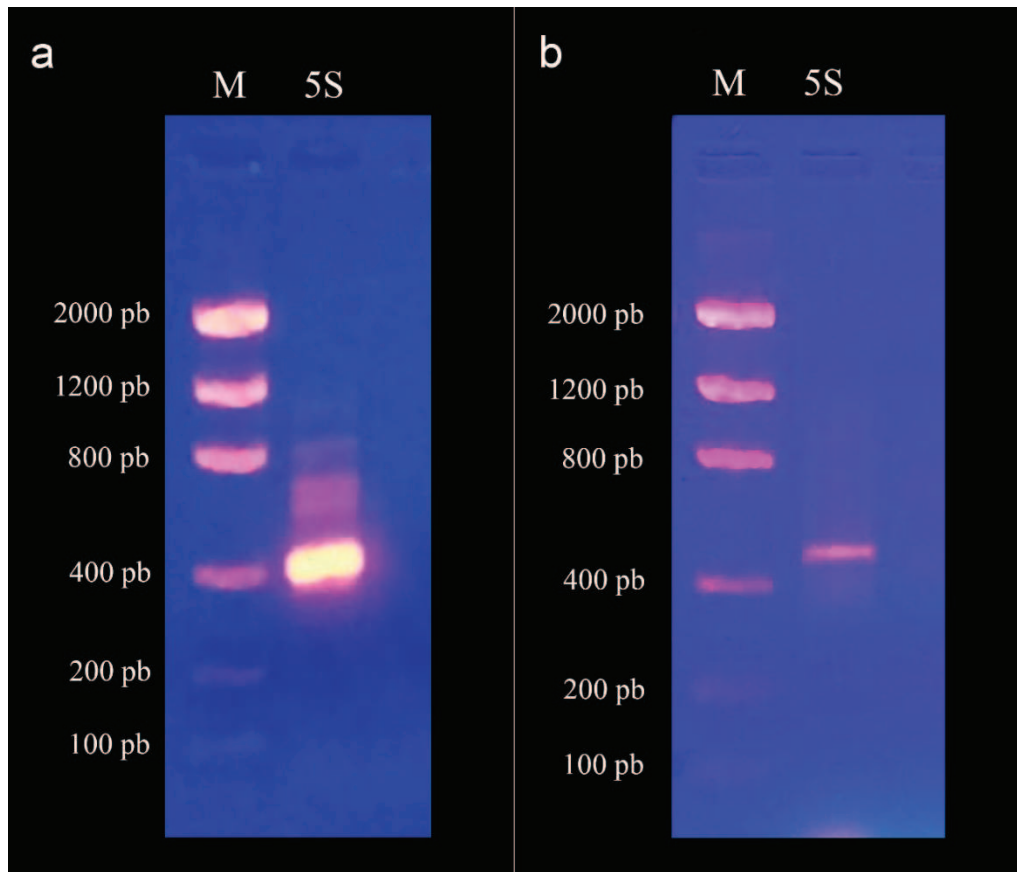


Figura 3. Análise da amplificação e marcação do DNA de *Z. mays* com *primers* para região 5S em gel de agarose 1,5%. Em ambas as imagens, a coluna M representa o marcador de pares de bases (Low DNA Mass™ Ladder, Invitrogen) e a coluna 5S representa a amostra analisada. **a)** Produto de PCR resultante da amplificação do DNA genômico de *Z. mays* com *primers* específicos para genes de rDNA 5S. Foram gerados fragmentos com tamanhos entre 400 a 800 pb, sendo uma banda de alta intensidade formada por fragmentos de aproximadamente 400 pb. **b)** Produto de PCR referente a marcação da sonda com fluorescência, a qual foi empregada no procedimento de FISH. A reação de marcação restringiu o tamanho dos fragmentos e resultou em uma única banda com cerca de 400 pb de tamanho.

6 DISCUSSÃO

Os protocolos de citogenética clássica aplicados em meristemas radiculares de *Z. mays* e *E. dunnii* forneceram lâminas com cromossomos morfológicamente bem preservados, dispersos, sem sobreposições e sem resíduos de citoplasma ou parede celular. Tais características têm sido consideradas fundamentais para a obtenção de sinais nítidos e *background* reduzido após a aplicação de técnicas de citogenética molecular (Mirzaghaderi, 2010; Andres e Kuraparthi, 2013; Kirov et al., 2014).

A adição de uma etapa de sincronização com a substância HU (1,75 mM) antes do tratamento com APM foi imperativa para promover o acúmulo de metáfases. Tanto para *Z. mays* quanto para *E. dunnii*, o pico de atividade mitótica foi observado aproximadamente cinco horas após a remoção do HU (considerando o tempo de lavagem). A aplicação de 3 μ M de APM quatro horas antes do pico mitótico em ambas as espécies gerou metáfases bloqueadas com nível de condensação da cromatina satisfatório para a identificação dos cromossomos e montagem dos kariogramas (Figura 1b, 2b e 2d). A sincronização de meristemas radiculares tem se mostrado uma estratégia eficiente para o aumento do índice metafásico em *Z. mays* (Lee 1996; Silva, 2016). Para *Eucalyptus*, os tratamentos citogenéticos reportados na literatura incluem apenas a aplicação de anti-tubulínicos. Um protocolo desenvolvido para *Eucalyptus citriodora* Hook., por exemplo, envolveu uma única etapa de tratamento de meristemas radiculares com 3 μ M de APM durante 3 horas, a qual possibilitou a obtenção de cromossomos metafásicos em diferentes níveis de compactação da cromatina (Carvalho e Carvalho, 2016).

Diversas substâncias podem ser empregadas para aumentar o índice metafásico de meristemas radiculares (Planchais et al., 2000). Agentes anti-tubulínicos, como o APM, inibem a formação do fuso mitótico e fazem com que as células permaneçam estacionadas (bloqueadas) na fase de metáfase (Verhoeven et al., 1990; Halfmann et al., 2007). Além dos anti-tubulínicos, certas substâncias, como a afidilcolina e a hidroxiuréia (HU), podem ser aplicadas em uma etapa anterior com o objetivo de sincronizar as células meristemáticas em uma mesma etapa do ciclo celular (Planchais et al., 2000). A HU é um inibidor reversível da ribonucleotídeo redutase, uma enzima que catalisa a redução de ribonucleosídeos difosfato nos seus desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) correspondentes (Alvino et al., 2007). Na presença de uma concentração adequada de HU, os níveis reduzidos de dNTPs fazem com que as células meristemáticas permaneçam estacionadas na fase G₁/S (Planchais et al., 2000). Quando a HU é removida por lavagem, as células meristemáticas retomam o ciclo celular de forma sincronizada (Doležel et al., 1999; Winnicki et al., 2013). O posterior tratamento desses meristemas sincronizados com um bloqueador resulta na obtenção de um grande número de células em metáfase (Doležel et al., 1992; Doležel et al., 1999; Polit, 2008).

Cromossomos bem espalhados, sem sobreposições e sem resíduos de citoplasma ou parede celular foram gerados por meio da associação entre a maceração enzimática da parede celular e as técnicas de dissociação celular e secagem ao ar. Tanto no PRINS quanto no FISH, uma elevada razão sinal:*background* foi obtida sem a necessidade de tratamento com substâncias permeabilizantes (Figuras 1 e 2). A presença de resíduos de citoplasma sobre as preparações cromossômicas pode dificultar o acesso da sonda (FISH) ou

primer (PRINS) ao DNA alvo durante a aplicação de técnicas de citogenética molecular (Kjeldsen e Kolvraa, 2002; Zhang e Friebe, 2009; Wang et al., 2015). Em muitos casos, principalmente quando a técnica de esmagamento é usada para a confecção das lâminas, a aplicação de substâncias como pepsina, HCl ou ácido acético é necessária para aumentar a permeabilidade do material (Kjeldsen e Kolvraa 2002; Karafiátová et al., 2016). No entanto, a utilização desses tratamentos nem sempre contribui para o aumento da razão sinal:*background* e podem levar à danos na estrutura da cromatina (Kaczmarek et al., 2006; Kirov et al., 2014).

Diferenças na morfologia dos cromossomos metafásicos entre espécies influenciam na resolução das técnicas de citogenética molecular (Danilova e Birchler, 2008). Dentro desse contexto, as espécies *Z. mays* e *E. dunnii* foram escolhidas como modelos não apenas em virtude de sua relevância comercial, mas por apresentarem cariótipos com diferenças acentuadas em relação ao tamanho relativo dos cromossomos. *Z. mays* exibe cromossomos relativamente grandes e facilmente distinguíveis, sendo que o maior cromossomo do cariótipo exibiu comprimento de 3,94 μm (Figura 2b) ou 4,17 μm (Figura 2d). Em contraste, as espécies do gênero *Eucalyptus* possuem cromossomos relativamente pequenos e sua classificação tem sido considerada laboriosa por alguns autores (Matsumoto et al., 2000; Oudjehih et al., 2006). No entanto, Carvalho e Carvalho (2016) demonstraram que a identificação e classificação dos cromossomos de *Eucalyptus* spp. é possível, desde que as preparações cromossômicas exibam elevada qualidade estrutural da cromatina. O primeiro par do cariótipo de *E. dunnii* exibiu um comprimento total de 2,73 μm (Figura 1b), quase a metade em relação a *Z. mays*. Apesar dessas diferenças, o protocolo

de PRINS se mostrou adequado para gerar sinais nítidos tanto nos cromossomos metafásicos de *Z. mays* como nos de *E. dunnii*, evidenciando a reprodutibilidade do mesmo para duas espécies com cromossomos de tamanhos relativamente diferentes.

A região 5S de *E. dunnii* e *Z. mays* foram detectadas pela primeira vez por meio da técnica de PRINS. Os genes de rDNA 5S em *E. dunnii* formam um cluster pericentromérico no braço curto do par de cromossomos número 5 (Figura 1b e 1c). Esse consiste no primeiro relato da aplicação técnicas de citogenética molecular na espécie *E. dunnii*. Ribeiro et al. (2016) conduziram um estudo pioneiro de citogenética molecular no gênero *Eucalyptus*. As regiões 45S (relacionada a NOR) e 5S foram mapeadas nos cromossomos 1 e 3, respectivamente, de todas as seis espécies avaliadas (*E. cornuta*, *E. occidentallis*, *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. globulus* e *E. pulverulenta*), ambas no braço curto e em posição pericentromérica. É importante ressaltar que a classificação dos cromossomos de *E. dunnii* no presente estudo foi divergente em relação a classificação proposta por Ribeiro (2016) para outras espécies do mesmo gênero. Em nossas análises, o cromossomo de *E. dunnii* contendo a NOR foi classificado como o par número 6, conforme Carvalho e Carvalho (2016) para *E. citriodora*, e Carvalho (2016) para *E. botryoides*, *E. baileyana*, *E. microcorys* e *E. intermedia*. Essa divergência em relação a posição do cromossomo portador da NOR no cariógrama pode ocorrer devido a alguns autores considerarem, ou não, a constrição secundária e o satélite nas análises morfométricas (Rosado et al., 2009). No cariótipo da Figura 1b, por exemplo, observa-se que apenas um dos cromossomos do par número 6 apresenta a NOR estirada, enquanto o outro integrante do par encontra-se compactado. Enquanto

o cromossomo que contém a NOR estirada possui um tamanho próximo ao par número 1, o seu homólogo compactado é, claramente, menor do que os pares de 1 a 5.

A sequência de rDNA 5S de *E. dunnii* foi detectada em posição pericentromérica em nossas análises, assim como em Ribeiro et al. (2016) para outras espécies do mesmo gênero. No entanto, o cromossomo ao qual ela foi alocada se mostrou divergente, sendo par número 5 no presente estudo e par 3 em Ribeiro et al. (2016). Diferentes autores têm relatado a elevada homogeneidade apresentada entre os cariótipos de espécies do gênero *Eucalyptus* e, até mesmo, entre *Eucalyptus* e *Corymbia*, um gênero proximamente relacionado (Matsumoto et al., 2000; Oudjehih e Abdellah, 2006; Carvalho, 2016). Desse modo, é provável que as diferenças observadas na localização da NOR e das marcas de rDNA 5S entre *E. dunnii* e as espécies avaliadas por Ribeiro et al. (2016) sejam resultantes de variações nas metodologias de identificação e classificação dos cromossomos entre os dois estudos.

Em *Z. mays*, o sinal de fluorescência gerado pela técnica de PRINS foi observado na porção terminal do braço longo do cromossomo 2 (Figura 2b), de acordo com o reportado pela literatura (Chen et al., 2000; Li e Arumuganathan, 2001). A técnica de FISH conduzida com o intuito de confirmar os dados obtidos na reação de PRINS. A amplificação do DNA de *Z. mays* por meio do *primer* específico para a região 5S de *E. globulus* gerou fragmentos de aproximadamente 400 pb em elevada quantidade, além de bandas mais fracas entre 400 e 800 pb (Figura 3a). Após a reação de marcação da sonda, os fragmentos foram restringidos a um tamanho ligeiramente acima de 400 pb

(Figura 3b). O tamanho dos segmentos a serem utilizados como sonda no FISH é considerado um fator crítico para o processo de hibridização. Fragmentos com tamanhos entre 200 e 500 pb são considerados ideais, uma vez que apresentam boa estabilidade de ligação e, ao mesmo tempo, uma elevada capacidade de acesso ao DNA-alvo (Guerra, 2004). A hibridização entre as sondas fluorescentes produzidas nas etapas mencionadas e o DNA alvo gerou sinais nítidos na região terminal do braço longo do cromossomo 2 (Figura 2d), assim como detectado por meio do PRINS.

O tempo total necessário para a condução do FISH, considerando o tempo gasto para a construção da sonda e para a hibridização, foi de no mínimo quatro dias. Por outro lado, todo o procedimento associado ao PRINS, desde o pré-tratamento das lâminas até a visualização, foi conduzido em aproximadamente 2 horas. Essa rapidez associada a técnica de PRINS tem sido considerada uma das principais vantagens em relação ao FISH (Kubaláková e Dolezel, 1998; Menke et al., 1998; Kubaláková et al., 2001; Talia et al., 2011). Talia et al. (2011) empregaram as técnicas de BAC-FISH e C-PRINS para a detecção de genes de cópia única em cromossomos metafásicos de *Helianthus annuus* L. Embora a técnica de BAC-FISH tenha permitido detectar os sinais de fluorescência, a presença de elementos repetitivos nos clones de BAC exigiu a aplicação de DNA competidor para redução de *background*. Por outro lado, o C-PRINS se mostrou uma alternativa altamente sensível, rápida e mais específica, uma vez que as características intrínsecas da técnica evitaram a detecção de DNA repetitivo. Essas características tornam o PRINS uma técnica de elevado potencial para o mapeamento físico de sequências em genomas vegetais.

A posição dos genes de rDNA 5S não se encontra disponível no mapa de ligação de *Eucalyptus* spp. (“EucaMaps”, disponível em: <http://w3.pierroton.inra.fr/eucamaps/>) e, até a condução do presente trabalho, o único relato de seu mapeamento físico havia sido provido por Ribeiro et al. (2016). Os genes de rDNA 5S de *Z. mays*, por outro lado, têm sido mapeados por meio de diferentes metodologias. Li e Arumuganathan (2001) utilizaram a técnica de FISH para revelar a localização física dos *loci* de rDNA 5S no genoma de *Z. mays* e integraram as informações obtidas com o mapa de ligação disponível. Como esperado, os autores observaram que a posição física do rDNA 5S foi divergente em relação ao seu sítio genético no mapa de ligação. Essas inconsistências ocorrem pelo fato de as taxas de recombinação não serem uniformemente distribuídas ao longo do genoma, fazendo com que as distâncias obtidas nos mapas de ligação não reflitam, necessariamente, as distâncias físicas reais (Sun et al., 2013). Além das distâncias, a ordem das sequências também pode se mostrar divergente entre os mapas físico e de ligação (Zhao et al., 2002; Koo et al., 2008; Sun et al., 2013), o que consiste em uma dificuldade na aplicação dos mapas de ligação para guiar o alinhamento e montagem de genomas em programas de sequenciamento (Sun et al., 2013). Por esses motivos, a integração dos mapas de ligação com os mapas físicos obtidos por técnicas de citogenética molecular mostra-se fundamental para confirmar a localização de sequências nos grupos de ligação.

O mapeamento de sequências repetitivas tem sido considerado um dos principais desafios no sequenciamento genômico (Hoskins et al., 2002; Treangen e Salzberg, 2012). A presença de sequências repetitivas cria ambiguidades no alinhamento dos fragmentos, dificultando a interpretação dos

dados e a montagem do genoma (Treangen e Salzberg, 2012). As técnicas de citogenética molecular, por outro lado, têm sido consideradas as ferramentas mais eficientes para o mapeamento de sequências repetitivas, uma vez que revelam a localização física e inequívoca das mesmas nos cromossomos (Hoskins et al., 2007; Larracuenta e Ferree, 2015). Dentro desse contexto, a integração entre os resultados obtidos para *E. dunnii* no presente estudo e os dados de sequenciamento disponíveis para o genoma de *Eucalyptus* (Myburg et al., 2014) tem o potencial de auxiliar no alinhamento dos fragmentos associados aos genes de rDNA 5S e montagem do genoma sequenciado.

7 CONCLUSÕES

Um protocolo de PRINS para a localização de sequências de rDNA 5S foi otimizado para duas espécies com cromossomos de tamanhos relativamente diferentes: *E. dunnii* e *Z. mays*. Pela primeira vez, foi relatada a aplicação de técnicas de citogenética molecular na espécie *E. dunnii*. Para *Z. mays*, esse estudo consiste no primeiro relato do mapeamento de sequências específicas por meio da técnica de PRINS.

Os genes de rDNA 5S em *E. dunnii* exibiram um padrão de cluster com posição pericentromérica no braço curto do cromossomo número 5. Em *Z. mays*, os mesmos genes foram mapeados na região terminal do braço longo do cromossomo número 2. A aplicação das técnicas de citogenética clássica associadas ao protocolo de PRINS forneceu sinais de fluorescência nítidos e *background* reduzido em ambas as espécies, evidenciando a sua reprodutibilidade.

Os dados obtidos no presente trabalho fornecem informações importantes para o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de mapeamento físico em *E. dunnii* e *Z. mays*. Para *E. dunnii*, especialmente, o conhecimento da localização física dos genes de rDNA 5S pode ser integrado aos dados de sequenciamento disponíveis para *Eucalyptus* e auxiliar no correto posicionamento da mesma no genoma sequenciado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVINO, G. M.; COLLINGWOOD, D.; MURPHY, J. M.; DELROW, J.; BREWER, B. J.; RAGHURAMAN, M. K. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 18, p. 6396–6406, 2007.
- ANDRES, R. J.; KURAPARTHY, V. Development of an improved method of mitotic metaphase chromosome preparation compatible for fluorescence *in situ* hybridization in cotton. **The Journal of Cotton Science**, v. 17, p. 149–156, 2013.
- BELLAROSA, R.; DELRE, V.; SCHIRONE, B.; MAGGINI, F. Ribosomal RNA genes in *Quercus* spp. (Fagaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 172, p. 127–139, 1990.
- BENNETZEN, J. L.; HAKE, S. **Handbook of Maize: genetics and genomics**. Springer, New York, USA, 2009.
- BRIDGER, J. M.; VOLPI, E. V. **Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH): protocols and applications**. Humana Press Inc., 2010.
- BRIDGES, C. B. Nondisjunction as proof of the chromosome theory of heredity. **Genetics**, v. 1, n. 1–52, p. 107–163, 1916.
- BROWN, T. A. Mapping genomes. In: BROWN, T. A. (Ed.). **Genomes**. Oxford, UK: Wiley-Liss, 2002.
- BROWN, W. L. Numbers and distribution of chromosome knobs in United States maize. **Genetics**, v. 34, p. 524–536, 1948.
- CAIXETA, E. T.; CARVALHO, C. R. An improved cytogenetic method for maize pachytene chromosomes. **Cytologia**, v. 66, n. 2, p. 173–176, 2001.
- CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R.; ALMEIDA, P. M. Plant cytogenetics: still looking for the perfect mitotic chromosomes. **Nucleus**, v. 50, n. 3, p. 453–462, 2007.
- CARVALHO, C. R.; SARAIVA, L. S. An air-drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142–145, 1993.
- CARVALHO, G. M. A. **Determinação do tamanho genômico, da relação AT/CG e do cariótipo em eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) por citometria de fluxo e citogenética**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2016.

- CARVALHO, G. M. A.; CARVALHO, C. R. The eucalypt karyogram resolved. **NRC Research Press**, v. 94, n. 5, p. 411–416, 2016.
- CHAHOTA, R. K.; MUKAI, Y.; CHAUDHARY, H. K.; KISHORE, N.; SHARMA, T. R. Karyotyping and *in situ* chromosomal localization of rDNA sites in black cumin *Bunium persicum* (Boiss) B. Fedtsch, 1915 (Apiaceae). **Comparative cytogenetics**, v. 5, n. 4, p. 345, 2011.
- CHEN, C. C.; CHEN, C. M.; HSU, F. C.; WANG, C. J.; YANG, J. T.; KAO, Y. Y. The pachytene chromosomes of maize as revealed by fluorescence *in situ* hybridization with repetitive DNA sequences. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 1, p. 30–36, 2000.
- CHENG, Z. et al. Toward a cytological characterization of the rice genome. **Genome Research**, v. 11, n. 12, p. 2133–2141, 2001.
- CLOIX, C.; TUTOIS, S.; MATHIEU, O.; CUVILLIER, C.; ESPAGNOL, M. C.; PICARD, G.; TOURMENTE, S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. **Genome Research**, v. 10, n. 5, p. 679–690, 2000.
- CUI, X. et al. Construction of cytogenetic map of *Gossypium herbaceum* chromosome 1 and its integration with genetic maps. **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2015.
- DANILOVA, T. V.; BIRCHLER, J. A. Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. **Chromosoma**, v. 117, n. 4, p. 345–356, 2008.
- DEONIER, R. C.; TAVARÉ, S.; WATERMAN, M. S. Physical mapping of DNA. In: DEONIER, R. C.; TAVARÉ, S.; WATERMAN, M. S. (Eds.). **Computational genome analysis**. New York: Springer, 2005. p. 99–120.
- DOLEŽEL, J., ČÍHALÍKOVÁ, J., & LUCRETTI, S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. **Planta**, v. 188, n. 1, p. 93–98, 1992.
- DOLEŽEL, J.; ČÍHALÍKOVÁ, J.; WEISEROVÁ, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, v. 21, n. 2, p. 95–107, 1999.
- ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Clarendon Press Oxford UK, 1994.
- FLORIANI, M. M. P.; STEFFENS, C. A.; CHAVES, D. M. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de carboidratos solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Revista Árvore**, v. 35, n. 1, 2011.

- GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 63, n. 2, p. 378–383, 1969.
- GHAFFARI, R.; CANNON, E. K.; KANIZAY, L. B.; LAWRENCE, C. J.; DAWE, R. K. Maize chromosomal knobs are located in gene-dense areas and suppress local recombination. **Chromosoma**, v. 122, n. 1-2, p. 67–75, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D., et al. Progress in Myrtaceae genetics and genomics: *Eucalyptus* as the pivotal genus. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 3, p. 463-508, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, v. 179, n. 4, p. 911–929, 2008.
- GUERRA, M. **Hibridização *in situ***: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.). **FISH: Conceitos e Aplicações na Citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto, 2004.
- HALFMANN, R. A.; STELLY, D. M.; YOUNG, D. H. Towards improved cell cycle synchronization and chromosome preparation methods in cotton. **Journal of Cotton Science**, v. 11, n. 1, p. 60–67, 2007.
- HAMON, P. et al. Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: a revised view of species differentiation. **Chromosome Research**, v. 17, n. 3, p. 291–304, 2009.
- HAN, C. et al. Polyploidy induction of clone of *Eucalyptus grandis* with colchicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 66, p. 14711–14717, 2011.
- HAQUE, M. S. Chromosome morphology in 4 species of *Eucalyptus* L. Her. **Cytologia**, v. 49, n. 1, p. 547–550, 1984.
- HARPER, L. C.; CANDE, W. Z. Mapping a new frontier; development of integrated cytogenetic maps in plants. **Functional & Integrative Genomics**, v. 1, n. 2, p. 89–98, 2000.
- HASS-JACOBUS, B.; JACKSON, S. A. Physical mapping of plant chromosomes. In: MEKSEM, K.; KAHL, G. (Eds.). **The handbook of plant genome mapping: genetic and physical mapping**. Wiley-VCH, 2005. p. 133–150.
- HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M. D. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo do Tenente, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 40, p. 67-76, 2000.
- HINDKJÆR, J.; KOCH, J.; BRANDT, C.; KØLVRAA, S.; BOLUND, L. Primed *in situ* labeling (PRINS). **Molecular biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 201–211, 1996.

- HIRAI, H. Relationship of telomere sequence and constitutive heterochromatin in the human and apes as detected by PRINS. **Methods in Cell Science**, v. 23, n. 1–3, p. 29–35, 2001.
- HIZUME, M.; SHIRAISHI, H.; MATSUSAKI, Y.; SHIBATA, F. Localization of 45S and 5S rDNA on chromosomes of *Nigella damascena*, Ranunculaceae. **Cytologia**, v. 78, n. 4, p. 379–381, 2013.
- HOSKINS, R. A. et al. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. **Genome Biology**, v. 3, n. 12, p. 1–16, 2002.
- HOSKINS, R. A. et al. Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1625–1628, 2007.
- HWANG, Y. J.; SONG, C. M.; YOUNIS, A.; KIM, C. K.; KANG, Y. I.; LIM, K. B. Morphological characterization under different ecological habitats and physical mapping of 5S and 45S rDNA in *Lilium distichum* with fluorescence *in situ* hybridization. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 88, n. 1, p. 8, 2015.
- IBÁ. **Relatório Ibá 2015**. Ibá, 2015.
- INDUFOR. **Strategic review on the future of forest plantations**. Indufor, Forest Stewardship Council (FSC), 2012.
- JIANG, J.; GILL, B. S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **NRC Canada**, v. 49, n. 9, p. 1057–1068, 2006.
- JOHN, H. A.; BIRNSTIEL, M. L.; JONES, K. W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature**, v. 223, n. 5206, p. 582–587, 1969.
- KACZMAREK, A.; NAGANOWSKA, B. PRINS and C-PRINS: promising tools for the physical mapping of the lupin genome. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 12, n. 1, p. 16–24, 2007.
- KACZMAREK, A.; NAGANOWSKA, B.; WOLKO, B. PRINS and C-PRINS: Promising tools for the physical mapping of the lupin genome. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 12, n. 1, p. 16–24, 2006.
- KARAFIÁTOVÁ, M.; BARTOŠ, J.; DOLEŽEL, J. (2016). **Localization of Low-Copy DNA Sequences on Mitotic Chromosomes by FISH**. In: KIANIAN, S. F.; KIANIAN, P. M. A. (Eds.). *Plant Cytogenetics: Methods and Protocols*. Springer Science + Business Media, New York. 2016. pp. 49–64.
- KATO, A.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 37, p. 13554–13559, 2004.

- KATO, Y. T. A. Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea Mexicana* Shrader Kuntze) in relation to their origin and evolution. **Massachusetts Agricultural Experiment Station Bulletin**, v. 635, p. 1–185, 1976.
- KIROV, I.; DIVASHUK, M.; VAN LAERE, K.; SOLOVIEV, A.; KHRUSTALEVA, L. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 21, 2014.
- KJELDSEN, E.; KOLVRAA, S. FISH techniques, FISH probes and their applications in medicine and biology - an overview. In: LIEHR, T. (Ed.). **FISH Technology**. [s.l.] Springer, 2002. p. 494
- KOCH, J.; KOLVRAA, S.; PETERSEN, K. B.; GREGERSEN, N.; BOLUND, L. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*. **Chromosoma**, v. 98, n. 4, p. 259–265, 1989.
- KOLE, C. et al. Application of genomics-assisted breeding for generation of climate resilient crops: progress and prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 563, p. 1–16, 2015.
- KOO, D. H.; JO, S. H.; BANG, J. W.; PARK, H. M.; LEE, S.; CHOI, D. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps unveils the physical architecture of tomato chromosome 2. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1211–1220, 2008.
- KRISHNAN, P.; SAPRA, V. T.; SOLIMAN, K. M.; ZIPF, A. FISH mapping of the 5S and 18S-28S rDNA loci in different species of *Glycine*. **Journal of Heredity**, v. 92, n. 3, p. 295–300, 2001.
- KUBALÁKOVÁ, M. et al. Localization of DNA sequences on plant chromosomes using PRINS and C-PRINS. **Methods in Cell Science**, v. 23, n. 1, p. 71–82, 2001.
- KUBALÁKOVÁ, M.; DOLEZEL, J. Optimization of PRINS and C-PRINS for detection of telomeric sequences in *Vicia faba*. **Biologia Plantarum**, v. 41, n. 2, p. 177–184, 1998.
- KUBALÁKOVÁ, M.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Mapping of repeated DNA sequences in plant chromosomes by PRINS and C-PRINS. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 6, p. 758–763, 1997.
- KWON, J. K.; KIM, B. D. Localization of 5S and 25S rRNA genes on somatic and meiotic chromosomes in *Capsicum* species of chili pepper. **Molecules and Cells**, v. 27, n. 2, p. 205–209, 2009.
- LANGER-SAFER, P. R.; LEVINE, M.; WARD, D. C. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 14, p. 4381–4385, 1982.

- LARRACUENTE, A. M.; FERREE, P. M. Simple method for fluorescence DNA *in situ* hybridization to squashed chromosomes. **Journal of Visualized Experiments**, v. 6, n. 95, p. e52288, 2015.
- LEE, H. et al. Construction of a garlic BAC library and chromosomal assignment of BAC clones using the FISH technique. **Genome**, v. 46, n. 3, p. 514–520, 2003.
- LEE, J. H.; ARUMUGANATHAN, K.; KAEPLER, S. M.; PAPA, C. M.; KAEPLER, H. F. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting. **Genome**, v. 39, n. 4, p. 697–703, 1996.
- LEITCH, I. J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of the 18s-5.8s-26s rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. **Genome**, v. 35, n. 6, p. 1013–1018, 1992.
- LI, L. J.; ARUMUGANATHAN, K. Physical mapping of sorted chromosomes 45S and 5S rDNA on maize metaphase and by FISH. **Hereditas**, v. 134, n. 2, p. 141–145, 2001.
- LIEHR, T.; PELLESTOR, F. **Molecular cytogenetics: the standard FISH and PRINS procedure**. In: LIEHR, T. (Ed.). Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH): application guide. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. p. 451.
- LONGLEY, A. E.; KATO, T. A. Y. **Chromosome morphology of certain races of maize in Latin America**. Chapingo, Mexico: International Center for the Improvement of Maize and Wheat, 1965.
- MACAS, J.; NAVRÁTILOVÁ, A.; KUBALÁKOVÁ, M.; DOLEZEL, J. **PRINS on plant chromosomes**. In: PELLESTOR, F. (Ed.) PRINS and PCR in situ protocols. Humana Press: Totowa, New Jersey, 2006. p. 133–139.
- MALUSZYNSKA, J.; HESLOP-HARRISON, J. S. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. **Genome**, v. 36, n. 4, p. 774–781, 1993.
- MARTINS, C. et al. Cytogenetic mapping and contribution to the knowledge of animal genomes. In: URBANO, K. V. (Ed.). **Advances in Genetics Research**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2010. v. 4p. 1–82.
- MATSUMOTO, S. T. et al. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L' Her. (Myrtaceae). **Caryologia**, v. 53, n. 3-4, p. 205–212, 2000.
- McCLINTOCK, B. Chromosome morphology in *Zea mays*. **Science**, v. 69, n. 1798, p. 629–629, 1929.
- MENKE, M.; FUCHS, J.; SCHUBERT, I. A comparison of sequence resolution on plant chromosomes: PRINS versus FISH. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 8, p. 1314–1320, 1998.

- MIRZAGHADERI, G. A simple metaphase chromosome preparation from meristematic root tip cells of wheat for karyotyping or *in situ* hybridization. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 314–318, 2010.
- MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J. A.; BERTÃO, M. R.; LABORDA, P.; PIZZAIA, D.; AGUIAR-PERECIN, M. L. Karyotype variability in tropical maize sister inbred lines and hybrids compared with KYS standard line. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 544, 2014.
- MOORE, P. H.; MING, R. **Genomics of tropical crop plants**. Springer Science & Business Media, 2013.
- MYBURG, A. A. et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.
- NCGA. **World of corn: 2017**. NCGA – National Corn Growers Association, 2017.
- OECD. **Consensus document on the biology of *Eucalyptus* spp.** OECD, 2014.
- OLIVER, S. et al. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. **Nature**, v. 357, n. 6373, p. 38–46, 1992.
- OUJJEHIH, B.; ABDELLAH, B. Chromosome numbers of the 59 species of *Eucalyptus* L. 'Herit. (Myrtaceae). **Caryologia**, v. 59, n. 3, p. 207–212, 2006.
- PARDUE, M. L.; GALL, J. G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. **Science**, v. 168, n. 3937, p. 1356–1358, 1968.
- PELLESTOR, F. Development and adaptation of the PRINS technology: an overview. In: PELLESTOR, F. (Ed.) **PRINS and *in situ* PCR protocols**. [s.l.] Humana Press, 2006. p. 211–220.
- PELLESTOR, F. Principles of the PRINS technique. In: PELLESTOR, F. (Ed.). **PRINS and PNA Technologies in chromosomal investigations**. New York: Nova Science Publishers, 2007. p. 196.
- PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, v. 476, n. 1-2, p. 78–83, 2000.
- POLIT, J. T. An improved method for the cell cycle synchronization of *Vicia faba* root meristem cells. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 3, p. 315–324, 2008.
- RHOADES, M. M. Meiosis in maize. **Journal of Heredity**, v. 41, p. 59–67, 1950.
- RIBEIRO, T. et al. Advancing *Eucalyptus* genomics: cytogenomics reveals conservation of *Eucalyptus* genomes. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–12, 2016.

- RIEGEL, M. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 194–209, 2014.
- ROSADO, T. B.; CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. An integrated cytogenetic, flow and image cytometry procedure used to measure the DNA content of *Zea mays* A and B chromosomes. **Plant Science**, v. 176, n. 1, p. 154–158, 2009.
- RÖSER, M.; WINTERFELD, G.; GREBENSTEIN, B.; HEMLEBEN, V. (2001). Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 21, n. 2, p. 198-217, 2001.
- RUGGERI, C. Contributo alla cariologia del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). **Caryologia**, v. 14, n. 1, p. 111–120, 1961.
- SADDER, M. T.; WEBER, G. Karyotype of maize (*Zea mays* L.) mitotic metaphase chromosomes as revealed by fluorescent situ hybridization (FISH) with cytogenetic DNA markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 2, p. 117–123, 2001.
- SARTORETTO, L. M. et al. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 861–871, 2008.
- SCALDAFERRO, M. A.; DA CRUZ, M. V. R.; CECCHINI, N. M.; MOSCONE, E. A. FISH and AgNOR mapping of the 45S and 5S rRNA genes in wild and cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). **Genome**, v. 59, n. 2, p. 95–113, 2015.
- SILVA, J. C. **Quantificação de DNA dos cromossomos e dos braços cromossômicos de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2016.
- SINGH, R. J.; KIM, H. H.; HYMOWITZ, T. (2001). Distribution of rDNA loci in the genus *Glycine* Willd. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, n. 2, p. 212–218, 2001.
- SPEICHER, M. R.; CARTER, N. P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 10, p. 782–792, 2005.
- STURTEVANT, A. H. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 14, n. 1, p. 43-59, 1913.
- SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. John Wiley & Sons, 2003.

- SUN, J. et al. A high-resolution cucumber cytogenetic map integrated with the genome assembly. **BMC Genomics**, v. 14, n. 461, p. 1–8, 2013.
- TALIA, P. A. et al. Detection of single copy sequences using BAC-FISH and C-PRINS. **Biocell**, v. 35, n. 1, p. 19–28, 2011.
- TERKELSEN, C. et al. Repeated primed *in situ* labeling: formation and labeling of specific DNA sequences in chromosomes and nuclei. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 63, n. 4, p. 235–237, 1993.
- 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, n. 3, p. 406–410, 1997.
- TREANGEN, T. J.; SALZBERG, S. L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 1, p. 36–46, 2012.
- VERHOEVEN, H. A.; RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P. A comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Planta**, v. 182, n. 3, p. 408–414, 1990.
- WANG, C. J. R.; HARPER, L.; CANDE, W. Z. High-resolution single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. **The Plant Cell**, v. 18, n. 3, p. 529–544, 2006.
- WANG, C. J.; CHEN, C. C. Cytogenetic mapping in maize. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 109, n. 1–3, p. 63–69, 2005.
- WANG, Y.; WANG, J. F.; YIN, H.; GAO, H. Q.; ZHUANG, N. S.; LIU, J. P. (2015). Physical localization of molecular markers and assignment of the 15th linkage group to chromosome 11 of the karyotype in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by primed *in situ* labeling. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8366–8374, 2015.
- WINNICKI, K.; POLIT, J. T.; MASZEWSKI, J. (2013). Increased transcription in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Vicia faba*. **Protoplasma**, v. 250, n. 1, p. 251–259, 2013.
- YOUN-KYU, P.; KIM, B. D.; KIM, B. S.; ARMSTRONG, K. C.; KIM, N. S. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of the 5S rRNA and 18S-26S rRNA gene families in five different species in *Capsicum*. **Genes & genetic systems**, v. 74, n. 4, p. 149–157, 1999.
- ZHANG, D.; SANG, T. Physical mapping of ribosomal RNA genes in peonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent *in situ* hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. **American Journal of Botany**, v. 86, n. 5, p. 735–740, 1999.

ZHANG, P.; FRIEBE, B. **FISH on Plant Chromosomes**. In: LIEHR, T. Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH): application guide. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2009. p. 365–394.

ZHAO, Q. et al. A fine physical map of the rice chromosome 4. **Genome Research**, v. 12, n. 5, p. 817–823, 2002.