

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA DOS SÍTIOS DE DNAr 5S E
45S EM ESPÉCIES VEGETAIS COM CROMOSSOMOS
HOLOCINÉTICOS**

ARETUZA SOUSA DOS SANTOS

**RECIFE
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA DOS SÍTIOS DE DNAr 5S E 45S
EM ESPÉCIES VEGETAIS COM CROMOSSOMOS HOLOCINÉTICOS

Dissertação de mestrado apresentada por Aretuza Sousa dos Santos ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração Florística e Sistemática.

Orientador: Prof. Marcelo Guerra

(Depto. de Botânica, UFPE)

Co-orientadora: Profa. Ana Emília Barros e Silva

(Depto. de Fitotecnia, UFPB)

Santos, Aretuza Sousa dos

Distribuição cromossômica dos sítios de DNAr5S e 45S em espécies vegetais com cromossomos holocinéticos. / Aretuza Sousa dos Santos. – Recife: O Autor, 2010.

68 folhas: fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Mestrado em Biologia Vegetal, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Genes 2. Genética 3. Cromossomos holocinéticos I. Título.

572.86

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 177

ARETUZA SOUSA DOS SANTOS

“DISTRIBUIÇÃO CROMOSSÔMICA DOS SÍTIOS
DE DNAr 5S E 45S EM ESPÉCIES VEGETAIS
COM CROMOSSOMOS HOLOCINÉTICOS”.

BANCA EXAMINADORA:

Marcelo Guerra

Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho (Orientador) – UFPE

Leonardo Pessoa Félix

Dr. Leonardo Pessoa Félix – UFPB

Ana Christina Brasileiro Vidal

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal - UFPE

Recife- PE
2010

DEDICATÓRIA

*Aos laços de amor conquistados ao longo de
minha vida e que espero que sejam eternos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, por ter me presenteado com uma família maravilhosa, com saúde, muita energia e por nunca ter permitido que a comida faltasse em nossa casa. Aos meus amigos, que não nomearei por extenso porque se não teria como resultado uma dissertação, que compartilharam comigo momentos de tristeza, alegria, saúde e dificuldades e mesmo assim, de forma presencial ou em torcida positiva, sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus papitos, Paulo e Ana (Nega), que só em pensar em escrever sobre eles me faltam e sobram palavras. Eles são meus exemplos de vida, se hoje eu sou uma pessoa esforçada, de caráter e que corre atrás dos meus sonhos é por que por traz de tudo isso existiu uma formação familiar que dava valor aos laços de família, respeito mútuo e valorização daquilo que realmente importa – as pessoas como seres humanos. Eles me deram tudo aquilo que nunca tiveram e muito mais. Muitas vezes pensei em desistir e eles me estenderam as mãos e me fizeram enxergar que as dificuldades sempre existirão. Posso dizer que o amor deles e sua compreensão do mundo me salvaram e me tornaram uma pessoa melhor!

Ao meu irmãozinho Felipe, que sempre me apoiou em minhas decisões e me financiou, junto aos meus pais, nos momentos mais difíceis em que ainda não era bolsista. Apesar de ter passado por momentos de Tom e Jerry, hoje somos os dois lados de uma moeda, inseparáveis e tenho orgulho de tê-lo como irmão. A Taci (Tarciana-A noiva) e Lulu (Luana-Minha sobrinha mais linda desse universo) por fazerem parte dessa linda família.

As minhas irmãs, que compartilharam de perto algumas fases de minha vida, Bidida (Flávia) e Jaquinha (Jaqueline), e que tanto amo, apesar de estarmos distantes (residencialmente) agora.

A Hildebrando, por ser um ótimo alvirrubro e secretário, além de ter me recebido tão bem na Universidade Federal de Pernambuco.

A Marcelo, por ter me dado oportunidade e estrutura de trabalho para a realização desse sonho. Ao seu conhecimento, que é de assustar qualquer um, e que aos poucos fui processando e incorporando para que um dia possa ser uma citogeneticista que venha em muito contribuir com o meu país e com o mundo. Obrigada por isso!

A Ana Emília, que me ensinou toda parte prática de laboratório e por ter me acompanhado intimamente durante esses anos. Seu conhecimento e dedicação também fazem parte deste trabalho e mais do que isso, da minha vida em diante.

A Marccus Alves, que desde a graduação com o exemplo das sequóias gigantes me ensinou a ver o quanto a flora é exuberante e como estudá-la é sensacional.

A todos que compartilharam comigo esses três anos e me ajudaram a ser o que sou: Fagna, Nice (Gilvanice - a potência do laboratório), Seu Chato (Lidiane - também conhecida como monstra), Madaaaaaaaaaa (Magdalena), Joana (Jô), Lili (Liliane), Sandrinha (Sandra), Gabi (Gabriela), Eliene, Karla, Fê (Fernando), Guga (Gustavo), Ribeiro (Tiago-também chamado de anti-social), Silvo (Silvokleio) e André. Vocês são demais!

Gostaria de agradecer em especial a Gustavo e a Magdalena pelas várias correções da minha dissertação e a Fernando por toda ajuda em conseguir artigos antigos e por rever todas as minhas medições – muito obrigada a todos!

Obrigada CAPES pela bolsa de mestrado, sem você seria realmente bem mais difícil, mas não impossível. O que é impossível?

RESUMO

A família Cyperaceae é o principal grupo de plantas que apresentam cromossomos holocinéticos sendo composta por aproximadamente 5.400 espécies distribuídas em 103 gêneros. Uma grande variação de número cromossômico tem sido registrada na família, estando associadas principalmente a eventos de agmatoploidia e simploidia, e tornam o grupo muito interessante para estudos citogenéticos. A maioria dos estudos citogenéticos para essas espécies estão restritos a análises convencionais e os poucos trabalhos com técnicas de citogenética molecular abrangem apenas dois gêneros: *Rhynchospora* e *Eleocharis*, principalmente em relação à distribuição dos sítios de DNAr 45S. No presente trabalho, onze espécies, pertencentes a cinco gêneros da família Cyperaceae, com distintos números cromossômicos foram selecionadas para o estudo da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S localizados por FISH. Todas as espécies apresentaram sítios de DNAr 45S distribuídos terminalmente nos cromossomos enquanto os sítios de DNAr 5S mostraram uma distribuição mais variável. Em apenas duas espécies analisadas, os sítios de DNAr 5S e 45S estavam ligados entre si. Esses dados sugerem que a variação em número e posição dos sítios de DNAr em espécies com cromossomos holocinéticos é semelhante à encontrada em espécies com cromossomos monocêntricos. Portanto, a localização preferencialmente terminal dos sítios de DNAr 45S observada em cromossomos monocêntricos não parece ser influenciada pela polarização centrômero-telômero, como sugerida pela hipótese do “campo cromossômico”.

Palavras-chave: Cyperaceae, cromossomos holocinéticos, DNAr 5S, DNAr 45S, FISH.

ABSTRACT

The Cyperaceae family is the main group of the plants with holokinetic chromosomes, being constituted by approximately 5.400 species distributed in 103 genera. A wide variation in chromosome number has been registered in the family, being associate mostly with agmatoploidy and simploidy events, and render the group more interesting to cytogenetics studies. Most cytogenetic studies concerning these species are restrict to convencional analyses and the few works using molecular cytogenetic techniques are mainly related to the distribution of 45S rDNA sites in only two genera: *Rhynchospora* e *Eleocharis*. In the present work, eleven species belonging to five genera of the family Cyperaceae, with different chromosome numbers were selected to study the distribution of 5S and 45S rDNA sites located by FISH. All the species presented 45S rDNA sites distributed terminally in the chromosomes while the 5S rDNA sites had a more variable distribution. In only two species, the 5S and 45S rDNA sites were found in the same chromosome. These data suggest that the variation in number and position of the rDNA sites in species with holokinetic chromosomes is similar to that found in species with monocentric chromosomes. Therefore, the preferentially terminal localization of the 45S rDNA sites observed in monocentric chromosomes does not seem to be influenced by the centromere-telomere polarization, as suggested by the hypothesis “chromosome field”.

Key-words: Cyperaceae, holokinetic chromosomes, 5S rDNA, 45S rDNA, FISH.

SUMÁRIO

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract.....	v
1. Apresentação	1
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1. Organização molecular do cromossomo metafásico	5
2.1.1. O centrômero	6
2.1.2. O telômero	7
2.1.3. Heterocromatina	8
2.1.4. O DNAr 5S e 45S	9
2.2. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	11
2.3. Cromossomos holocinéticos	12
2.3.1. Características gerais	12
2.3.2. Citologia da família Cyperaceae	13
2.3.3. Comportamento durante a divisão celular.....	14
2.3.4. Distribuição da heterocromatina.....	16
2.3.5. Evolução cariotípica.....	17
2.3.6. Distribuição dos genes de RNAr 5S e 45S.....	18
3. Referências Bibliográficas.....	22
4. Manuscrito a ser submetido à revista <i>Micron</i>	31
Resumo	33
Introdução	34
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	37
Discussão	38
Agradecimentos	41
Referências bibliográficas	42
Legenda das figuras	46
5. Conclusões.....	51
6. Anexo.....	53

1. Apresentação

1. Apresentação

A família Cyperaceae é o principal grupo de plantas que apresentam cromossomos holocinéticos (cromossomos com cinetóro difuso), sendo composta por aproximadamente 5.400 espécies distribuídas em 103 gêneros (Roalson, 2008). Uma grande variação numérica tem sido encontrada na família, o que a torna um grupo muito interessante para estudos citogenéticos (Vanzela *et al.*, 2000). Análises citogenéticas envolvendo contagens cromossômicas, distribuição da heterocromatina e distribuição dos sítios de DNAr 45S já foram realizadas em algumas espécies dessa família (Vanzela *et al.*, 1998; Vanzela e Guerra, 2000; Vanzela *et al.*, 2000), sendo o gênero *Rhynchospora* um dos mais estudados (Vanzela *et al.*, 2000). Por outro lado, em outros gêneros da família, tais como *Eleocharis*, *Fimbristylis* e *Kyllinga*, apenas contagens cromossômicas foram realizadas, enquanto para *Diplacrum* esses dados ainda são desconhecidos (IPCN – Index to plant chromosome numbers).

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de DNA repetitivo é uma importante técnica para caracterização e compreensão da evolução cromossômica, sendo as sondas mais utilizadas as de DNAr 5S e 45S (Li *et al.*, 2001; Jiang e Gill, 2006). Lima-de-Faria (1976), revisando a distribuição de constrições secundárias ou regiões organizadoras do nucléolo (RONs), correspondente aos sítios de DNAr 45S em angiospermas, observou que existe uma tendência de localização preferencial na região terminal/subterminal dos cromossomos e que a posição do centrômero poderia influenciar nessa localização. Contudo, essa análise incluiu apenas espécies com cromossomos monocêntricos. Estudos que revelam a distribuição das constrições secundárias em cromossomos holocinéticos de plantas são ainda escassos (ver, por exemplo, Sheikh e Kondo, 1995; Da Silva *et al.*, 2010). Mais recentemente, a distribuição dessas regiões foi observada por FISH em alguns poucos gêneros de plantas, tais como: *Rhynchospora* (Vanzela *et al.*, 1998, 2003); *Drosera* (Furuta e Kondo, 1999); *Cuscuta* subgênero *Cuscuta* (Guerra e García, 2004) e *Eleocharis* (Da Silva *et al.* 2005, 2008a e b; Da Silva *et al.*, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S em 11 espécies da família Cyperaceae visando avaliar se esses sítios se distribuem nas espécies com cromossomos holocinéticos de maneira similar à observada em cromossomos monocêntricos. Para isso foram analisadas espécies com distintos números e tamanhos cromossômicos e níveis de ploidia. Esses dados foram

comparados com a distribuição das RONS analisada por Lima-de-Faria (1976) para espécies com cromossomos monocêntricos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Organização molecular do cromossomo metafásico

O cromossomo metafásico é o principal alvo de estudos citogenéticos. Nele, vários tipos de estruturas podem ser identificados, como por exemplo, o centrômero, os telômeros e a região organizadora do nucléolo (RON) (Figura 1). A RON também pode ser observada como uma constrição secundária, indicando que aquele cromossomo está relacionado com formação do nucléolo na intérfase (Neves *et al.*, 2005). Durante a intérfase, o DNA nuclear encontra-se amplamente distendido, sofre replicação e modificações na cromatina, primeiramente relacionadas à associação com histonas que ao longo do ciclo celular levam gradativamente ao processo de empacotamento e formação do cromossomo metafásico (Houben *et al.*, 2007; Maeshima e Eltsov, 2008).

Cinco tipos de histonas participam do processo de condensação cromossômica: H1, H2a, H2b, H3 e H4. As histonas H2a, H2b, H3 e H4 formam dímeros que levam à formação do octâmero de histonas. No octâmero, a fibra de DNA dá duas voltas quase completas, formando a unidade de compactação do DNA, o nucleossomo (Akey e Luger, 2003). Posteriormente, a cromatina se organiza em uma forma mais compactada, denominada solenoide e em seguida há a formação do cromômero que resulta na formação do cromossomo propriamente dito (Maeshima e Eltsov, 2008). Portanto, as histonas são proteínas essenciais para a organização dos cromossomos dos eucariotas, embora em situações especiais possam ser substituídas por outras proteínas (Carrell *et al.*, 2007).

Outras classes de proteínas chamadas não-histônicas também participam desse processo, mas em uma fase mais tardia dando suporte para o fio de DNA parcialmente condensado (Maeshima e Eltsov, 2008). Essas proteínas vão formar o esqueleto proteico, onde o DNA é “apoiado” no processo de empacotamento para formar o cromossomo metafásico. Na metáfase, os cromossomos apresentam uma maior proporção de proteínas em relação à quantidade de DNA e isso se deve aos processos de empacotamento e controle do ciclo celular (Van Hooser *et al.*, 2005).

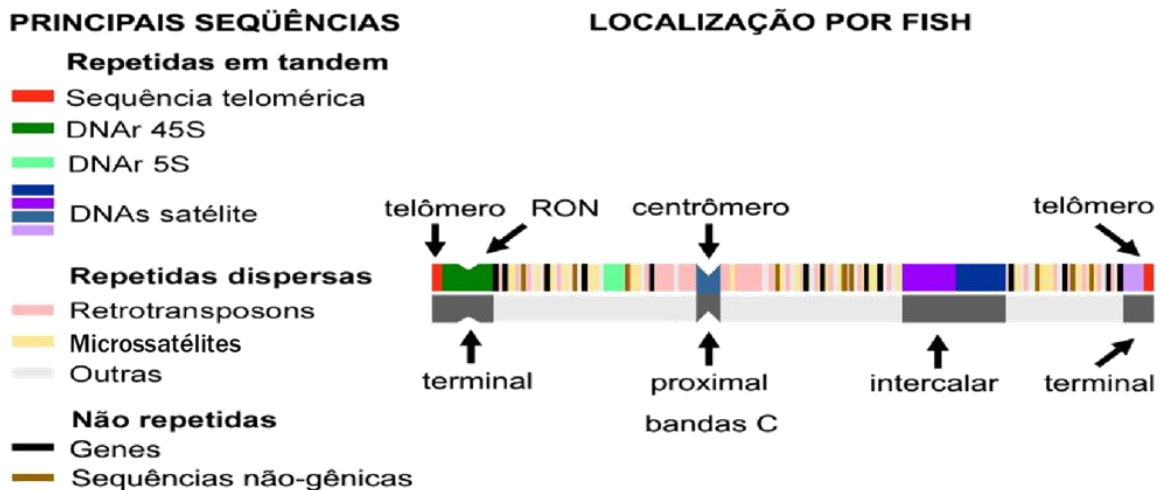


Figura 1: Esquema da distribuição dos principais tipos de sequências de DNA no cromossomo vegetal. Reproduzido de Pedrosa-Harand e Guerra (2004).

2.1.1. O centrômero

Em cromossomos metafásicos, os centrômeros tipicamente aparecem como constrições que mantêm as cromátides irmãs unidas até o início da anáfase (Pluta *et al.*, 1995). O centrômero pode estar localizado em qualquer posição entre o meio e a extremidade do cromossomo, e de acordo com sua posição, os cromossomos podem ser classificados como metacêntricos (quando o centrômero se situa aproximadamente no meio), submetacêntricos ou acrocêntricos (quando um dos braços é claramente mais curto que o outro) e telocêntricos (o centrômero se encontra na extremidade do cromossomo) (Guerra, 1986).

Durante a divisão celular, a segregação cromossômica depende da ligação dos microtúbulos aos centrômeros, que é realizada através de estruturas denominadas cinetócoros. Os cinetócoros se localizam ao lado dos centrômeros de cada cromátide irmã e estruturalmente podem ser classificados em dois tipos: o tipo *ball-and-cup* (bola na taça) que é encontrado em plantas superiores e em alguns insetos; e o tipo trilaminar que é encontrada em poucas plantas e na maioria dos animais (Sumner, 2003).

Em plantas, o complexo centrômero-cinetócoro é constituído principalmente por um pequeno grupo de proteínas cinetocóricas, tais como CENP-A, CENP-B e CENP-C que estão presentes em todo o ciclo celular interagindo com o DNA (Hong-Guo *et al.*, 2000). Nos mamíferos, estas proteínas também estão presentes em conjunto com outras proteínas que são importantes para formação e manutenção do cinetócoro, tais como CENP-G e as INCENPs (Zeng *et al.*, 2004). O complexo centrômero-

cinetócoro atua no alinhamento dos cromossomos no plano equatorial da célula, assim como auxilia a migração dos cromossomos aos pólos opostos da célula no momento da anáfase. Essas funções são independentes do tipo de cinetócoro e estão altamente conservadas tanto em plantas quanto em animais (Dernburg, 2001).

Na maioria dos organismos, o DNA centromérico é formado por sequências de DNA altamente repetitivas. Ao contrário do que é esperado para uma região de fundamental importância para a organização cromossômica e divisão celular, o DNA centromérico não é bem conservado entre os eucariotos, podendo variar até mesmo dentro de um mesmo gênero (Gill *et al.*, 2009). Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, o DNA centromérico é composto pelos oligonucleotídeos AATAT e AAGAG com comprimento superior a 150 Kb, onde também estão presentes retroelementos e sequências únicas (Sun *et al.*, 1997). Em milho, o maior integrante do DNA centromérico são os elementos repetitivos dispersos (Mroczek e Dawe, 2003).

2.1.2. O telômero

Os telômeros correspondem às regiões terminais dos cromossomos e funcionam como “capas protetoras” que desempenham um importante papel na manutenção da integridade do cromossomo. Esta região cromossômica impede que terminais de diferentes cromossomos se fusionem e que ocorra degradação destes por enzimas que, na falta dos telômeros, reconheceriam o material cromossômico como DNA danificado (Nogueira Cano, 2006).

A região telomérica é altamente conservada e consiste de curtas sequências de DNA repetidas centenas ou milhares de vezes e organizadas em tandem. O número de repetições pode variar de espécie para espécie e mesmo entre cromossomos. A sequência telomérica em plantas é formada pelo oligonucleotídeo TTAGGG (Richards e Ausubel, 1988), embora possam ocorrer variações. Por exemplo, dentro da ordem Asparagales, vários gêneros apresentam a variante telomérica TTAGGG (Sýkorová *et al.*, 2003).

A estrutura do DNA telomérico é geralmente formada por uma fita mais longa e rica em guanina, enquanto a fita mais curta é rica em citosina (Gonzalez-Suarez e Gonzalo, 2008). Em algumas espécies de mamíferos e plantas observa-se a formação de uma alça formada pela fita mais longa do DNA telomérico, que se insere na fita dupla adjacente. Esta estrutura, denominada *t-loop*, pode ser encontrada nos terminais livres (Nogueira Cano, 2006).

A cada divisão celular, a extremidade telomérica tende a se tornar mais curta devido a não finalização da replicação do DNA cromossômico até a extremidade de uma das fitas. Para manter a estabilidade cromossômica e concluir a síntese da extremidade dessa fita do DNA telomérico, uma enzima denominada telomerase é recrutada. A telomerase é formada por um componente proteico e por uma molécula de RNA. Quando a telomerase liga-se ao telômero, ocorre o pareamento dos nucleotídeos da fita mais longa com o RNA da telomerase, permitindo que novos nucleotídeos sejam adicionados ao telômero (Alberts *et al.*, 2002). Desta forma, a habilidade de anexar às sequências teloméricas novos nucleotídeos a cada ciclo celular fornece um importante mecanismo para estabilizar e reparar quebras cromossômicas (Heslop-Harrison, 2000).

2.1.3. Heterocromatina

Heitz (1928) foi o primeiro a perceber que algumas regiões cromossômicas ou cromossomos inteiros permaneciam condensados, mesmo após o fim da telófase mitótica. Essas regiões, que se mantinham condensadas durante todo o ciclo celular, foram denominadas de heterocromatina enquanto as que apresentavam a cromatina descondensada ao final da mitose se tornando difusa no núcleo interfásico foram denominadas de eucromatina (Heitz, 1928). Inicialmente a heterocromatina era definida como uma região desprovida de genes, em vista de seu estado permanentemente condensado. Atualmente, diversos trabalhos mostram que essas regiões podem ser transcricionalmente ativas (Gonzalez-Suarez e Gonzalo, 2008). Por outro lado, a eucromatina é caracteristicamente rica em genes (Holmquist e Ashley, 2006).

A heterocromatina pode ser distinguida em dois tipos: constitutiva e facultativa (Brown, 1966). A heterocromatina constitutiva (HC) é caracterizada por ser pobre em genes e apresentar um conjunto de propriedades que são compartilhadas tanto por células animais quanto vegetais, entre elas: uma grande redução de recombinação meiótica, inativação gênica e replicação tardia durante a fase S (Dimitri *et al.*, 2009). Diferentemente da HC, a heterocromatina facultativa corresponde regiões eucromáticas (uma região cromossômica específica, um cromossomo ou todo o genoma) cuja atividade está sujeita ao controle epigenético, podendo ser alternativamente funcionais (com expressão gênica) ou silenciadas. Este tipo de heterocromatina é encontrada em poucos organismos, como por exemplo, no cromossomo X humano (Plath *et al.*, 2002).

A heterocromatina constitutiva geralmente é composta por sequências altamente repetitivas cujo padrão de distribuição nos cromossomos gera uma alta variabilidade

cariotípica, sendo em geral um bom parâmetro para identificar tipos cromossômicos, como observado em plantas do gênero *Citrus* (Moraes *et al.*, 2007). Sua distribuição nos cromossomos geralmente forma blocos de DNA repetitivo em regiões terminais, centroméricas e menos comumente em regiões intersticiais (Guerra, 2000). Dentro de uma mesma espécie pode haver heteromorfismos quanto ao tamanho e ao número de bandas heterocromáticas (Golub *et al.*, 2004). Entre as técnicas mais utilizadas na citogenética para a visualização da heterocromatina constitutiva estão o bandejamento C e a coloração com fluorocromos CMA e DAPI (Kenton, 1991; Vanzela e Guerra, 2000).

2.1.4. O DNAr 5S e 45S

Os RNAs ribossomais em associação a várias classes de proteínas complexas, constituem a fábrica de tradução para a síntese de proteínas (Neves *et al.*, 2005). De acordo com o coeficiente de Svedberg, os RNAr são nomeados em 5S, 5.8S, 18S e 25/28S (25S em plantas e 28S em mamíferos).

Os RNAr 5.8S, 18S e 25S são resultados da fragmentação de uma molécula maior, o RNAr 45S. O loco do DNAr 45S é formado por unidades repetidas em tandem dos genes de RNAr 18S-5.8S-25S que estruturalmente se encontram separados por dois espaçadores internos, o ITS1 e o ITS2 (Figura 3), e que são sempre transcritos como um único RNAm (Eickbush e Eickbush, 2007). Rogers e Bendich (1987) observaram que esses espaçadores eram amplamente variáveis apresentando um comprimento de 1 a 12 kb para diferentes espécies.

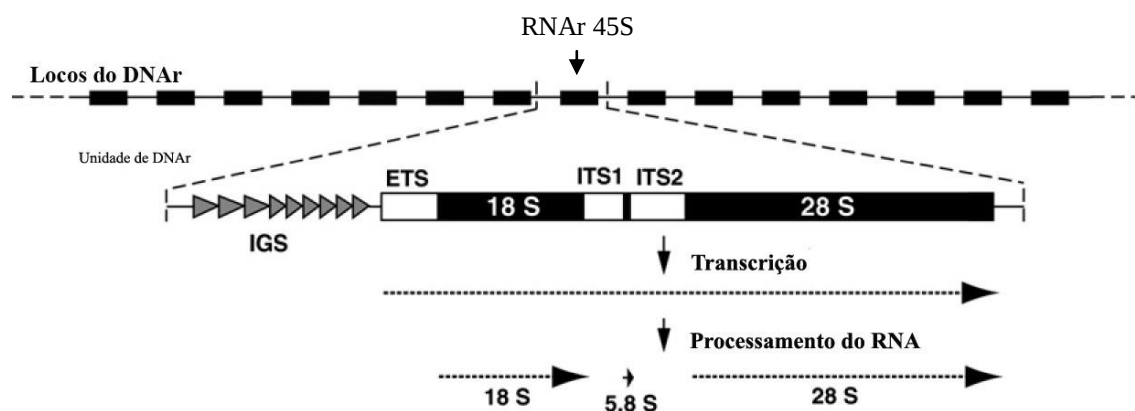


Figura 3: Organização dos genes de RNAr nos eucariotas. IGS: Espaçoador inter-gênico; ETS: Espaçoador transcrito externo e ITS: Espaçoador transcrito interno. Esquema extraído de Eickbush e Eickbush (2007).

O RNAr 45S é sintetizado na célula pelas RONS, que correspondem às constrições secundárias observadas nas preparações cromossômicas convencionais (Neves *et al.*, 2005). Contudo, sítios muito pequenos ou de baixa atividade podem existir em cromossomos que aparentemente não formam constrições secundárias (Guerra *et al.*, 1996). Centenas ou milhares de cópias dessas unidades de repetição podem estar presentes e juntas representarem até aproximadamente 10 % do genoma de plantas (Badaeva *et al.*, 1996). A elevada redundância desses genes na maioria dos eucariotas não parece ser necessária, já que apenas uma pequena fração das unidades do DNAr são transcritas. Por exemplo, em ervilha foi demonstrado que apenas cerca de 5% das unidades de RNAr são transcritas (González-Melendi *et al.*, 2001).

Em muitas espécies, grande parte do DNAr redundante encontra-se inativo e parece envolver um alto nível de condensação da cromatina (Neves *et al.*, 2005). Santoro (2005) estudando as modificações epigenéticas para este tipo de cromatina especificamente, concluiu que os genes de RNAr apresentavam dois diferentes tipos de estrutura: uma denominada “aberta” que corresponde aos genes transcricionalmente ativos e outra denominada “fechada” que representava os genes silenciados. Outros autores, como Huang *et al.* (2006) sugerem haver três estados para a cromatina do RNAr: o estado inativo que é similar a heterocromatina e dois estados eucromáticos que incluem um transcricionalmente competente, mas não ativo e o estado transcricionalmente produtivo, que mesmo assim nem sempre é transcrito.

O DNAr 5S é formado por uma região transcrita com aproximadamente 120 pb e uma região espaçadora que não é transcrita e varia tanto em tamanho quanto em número de sequência em diferentes espécies (Figura 4). Uma típica unidade de DNAr 5S apresenta 500 pb de comprimento (Douet e Tourmente, 2007). Os genes de RNAr 5S geralmente não estão associados às RONS e sua sequência é um pouco mais variável posicionalmente que a do DNAr 45S (Guerra, 2004).

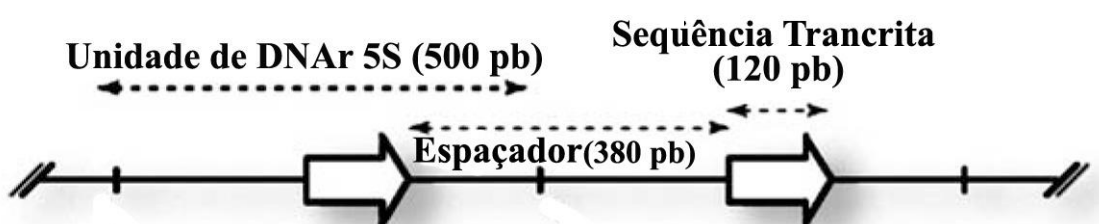


Figura 4: Estrutura da unidade de DNAr 5S de *Arabidopsis thaliana*. Reproduzido de Douet e Tourmente (2007).

A análise da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S tem sido extensivamente realizada em espécies vegetais com cromossomos monocêntricos (ver por exemplo, Moraes *et al.*, 2007; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2008). O DNAr 5S e o DNAr 45S são localizados em um ou muitos sítios por conjunto cromossômico e suas posições características nos cromossomos provém bons marcadores para identificação de alguns cromossomos do complemento (Moraes *et al.*, 2007). Na maioria dos eucariotas, eles são organizados em locos separados, apesar de, em alguns organismos, como por exemplo, em leveduras, em musgos e hepáticas e em algumas espécies de *Artemisia* (Asteraceae), os genes RNAr 18S-26S e 5S estarem no mesmo loco (Sone *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2009).

2.2. Hibridização *in situ* fluorescente – FISH

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma das técnicas mais importantes em citogenética molecular. O desenvolvimento da FISH permitiu a localização de diversos tipos de sequências de DNA nos cromossomos e o padrão de hibridização dessas sequências tem sido fundamental para a caracterização de pares cromossômicos e montagem de mapas físicos (Jiang e Gill, 2006).

O princípio da técnica consiste na flexibilidade da estrutura da molécula do DNA. O DNA é formado por uma dupla fita e esta pode ser facilmente separada em fita simples com o aumento da temperatura, assim como pode posteriormente ser renaturada e voltar a sua estrutura de dupla fita original (Figura 2). Fragmentos de DNA marcados com moléculas de fácil detecção (fluorocromos) funcionam como sondas para detecção de sequências complementares de nucleotídeos no DNA cromossomal. A hibridização pode ser de DNA/DNA ou DNA/RNA (Guerra, 2004). Durante a renaturação as cópias da sonda competirão com as fitas do DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas *in situ*, ou seja, no sítio exato onde aquela sequência ocorre naturalmente (ver abaixo).

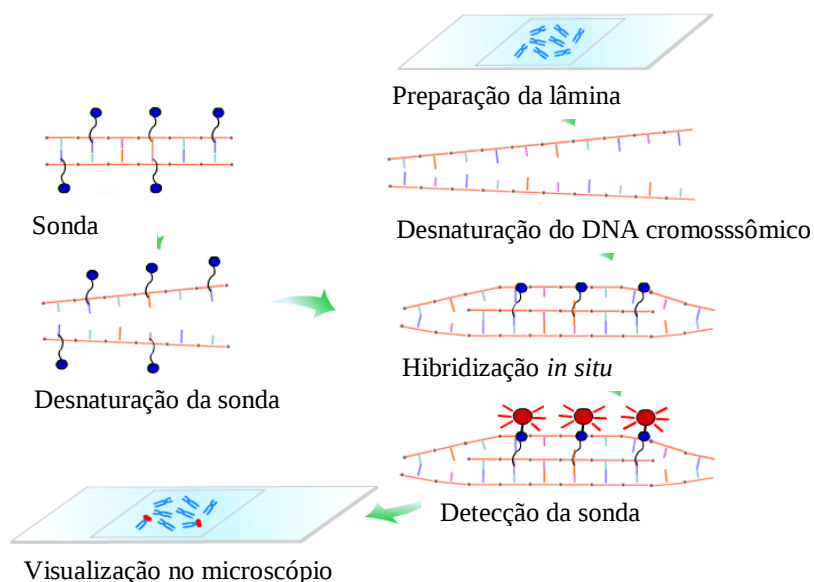


Figura 2: Princípio da técnica de FISH. Esquema cedido pelo Prof. Cícero Carlos de Souza Almeida – Universidade Federal de Alagoas.

Vários tipos de sondas podem ser utilizados como marcadores, como por exemplo, sequências repetitivas organizadas em tandem (DNA satélite, DNAr); repetitivas dispersas no genoma (retrotransposons); as que apresentam poucas cópias ou são únicas; sondas genômicas e cromossômicas (Guerra, 2004). Entre todos esses tipos de sonda, as de DNA repetitivo em tandem como o DNAr 5S e 45S são as mais utilizadas (Jiang e Gill, 2006).

2.3. Cromossomos holocinéticos

2.3.1 Características gerais

Com relação à disposição do cinetócoro e a presença da constrição primária, dois tipos cromossômicos podem ser observados nos eucariotos: cromossomos monocêntricos, que apresentam uma constrição primária ou centrômero bem definido e cinetócoro restrito à região pericentromérica, e cromossomos holocêntricos, que não apresentam constrição primária evidente e cujo cinetócoro é difuso e distribuído ao longo de toda extensão do cromossomo (Nagaki *et al.*, 2005). O termo holocêntrico é utilizado por alguns autores pra denotar o oposto de monocêntrico (cromossomos com centrômero localizado) e não expressam a característica mais marcante desse tipo cromossômico que se refere à presença do cinetócoro ao longo da extensão do

cromossomo. Com isso, o termo holocinético é o mais apropriado para definir essa peculiaridade (Luceño e Guerra, 1996; Mola e Papeschi, 2006).

Apesar das diferenças na arquitetura cromossômica, os cinetócoros são estruturalmente muito similares entre organismos com cromossomos holocinéticos e monocêntricos, uma vez que muitas proteínas cinetocóricas são conservadas (Monen *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2010). Embora o DNA centromérico possa variar drasticamente, cinetócoros de espécies com cromossomos holocinéticos e monocêntricos desempenham a mesma função celular, pois permitem a interação entre o cromossomo e os microtúbulos do fuso que levam ao alinhamento dos cromossomos no plano metafásico e ao deslocamento dos cromossomos na anáfase (Maddox *et al.*, 2004).

Os cromossomos holocinéticos surgiram independentemente em várias linhagens de eucariotos, sendo encontrados tanto em plantas quanto em animais (Mola e Papeschi, 2006). Em plantas, estão presentes nas famílias Juncaceae e Cyperaceae de monocotiledôneas e em alguns gêneros de eudicotiledôneas, como *Drosera* (Droseraceae) e *Cuscuta* subgênero *Cuscuta* (Convolvulaceae) (Sheikh e Kondo, 1995; Guerra e García, 2004). Em animais, todos os nemátodes, inclusive *Caenorhabditis elegans*, insetos de várias ordens, incluindo Lepidoptera, Heteroptera, Odonata, Homoptera, Phthiraptera; alguns gêneros de aranhas, como *Dysdera*, *Segestria*, *Ariadna* e em espécies de escorpiões da família Buthidae, entre outros, apresentam esse tipo cromossômico (Mola e Papeschi, 1994, 2006; Manicardi *et al.*, 1998; Mandrioli, 2002; Rodríguez Gil *et al.*, 2002; Golub *et al.*, 2004; Lanzone e De Souza, 2006; Labina, 2007).

2.3.2. Citologia da família Cyperaceae

A família Cyperaceae é composta por aproximadamente 5.400 espécies e 103 gêneros (Roalson, 2008), estando estreitamente relacionada filogeneticamente com a família Juncaceae. Essas famílias compartilham algumas características citológicas, como a não-formação da tétrade do grão de pólen, a presença de um cinetócoro difuso, ocorrência de meiose invertida (em algumas espécies) e evolução cariotípica associada a eventos de agmatoploidia e simploidia (Hipp *et al.*, 2009). Entre essas características, a presença do cinetócoro difuso é uma sinapomorfia para a ordem Cyperales (Roalson, 2007).

Apesar da ampla distribuição e do elevado número de espécies, a família Cyperaceae apresenta uma grande carência em estudos citogenéticos, principalmente em

relação ao estudo de gêneros tropicais. Contagens cromossômicas foram realizadas apenas em 31 gêneros e 851 espécies, sendo *Carex* o gênero mais estudado (Roalson, 2008) e um dos maiores gêneros vegetais com aproximadamente 2.000 espécies (Roalson *et al.*, 2007).

O número cromossômico mais comumente encontrado na família Cyperaceae é $n = 30$, sendo seguido por $n = 29$ e 28 (Roalson, 2008). Números cromossômicos mais baixos são menos comuns, como $n = 5$, 10 e 20 , mas estão bem representados nos gêneros *Eleocharis*, *Fimbristylis* e *Rhynchospora* (Roalson, 2008). No gênero *Carex* foi observado uma ampla série aneuploide onde o número cromossômico haploide variava de $n = 6$ a 68 (Roalson *et al.*, 2007). Uma das possíveis explicações atribuídas para essa variação cariotípica extrema dentro do gênero é a ocorrência de agmatoploidia. Outras análises cariológicas e moleculares, como o estudo do DNA nuclear em espécies do gênero *Luzula* e a filogenia molecular da tribo Rhynchosporeae, têm sido feitas para auxiliar na compreensão das relações intra e interespecíficas assim como para o entendimento da organização do genoma dessas espécies (Kuta *et al.*, 2004; Blum *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2009).

2.3.3. Comportamento durante a divisão celular

Dois tipos de divisão celular ocorrem em praticamente todos os eucariotas: a mitose e a meiose. A mitose é caracterizada pela separação das cromátides irmãs em dois conjuntos cromossômicos após a duplicação do DNA no núcleo interfásico, gerando duas células filhas com o mesmo número cromossômico da célula mãe (Alberts *et al.*, 2002). Células que apresentam cromossomos holocinéticos ou monocêntricos compartilham o mesmo mecanismo de divisão mitótica, com a diferença que os cromossomos monocêntricos migram na anáfase com os centrômeros posicionados para os pólos e os telômeros direcionados para o plano equatorial, enquanto nos cromossomos holocinéticos os microtúbulos se ligam em toda sua extensão devido à condição do cinetócoro difuso e as cromátides irmãs são conduzidas paralelamente aos pólos opostos da célula em forma de bastão (Guerra *et al.*, 2006; 2010).

Na divisão meiótica ocorre a formação dos gametas, que ao final da divisão celular apresentam metade do número cromossômico da célula mãe inicial. A divisão mitótica apresenta-se dividida em duas etapas, denominadas meiose I e meiose II (Alberts *et al.*, 2002). Na meiose I acontecem os principais eventos da divisão meiótica, tais como o pareamento entre os cromossomos homólogos, sinapse, permutação e

segregação reducional (Walker e Hawley, 2000), enquanto a meiose II é muito semelhante à divisão mitótica. Apesar dessas diferenças, tanto a meiose I quanto a meiose II apresentam quatro subfases: prófase, metáfase, anáfase e telófase, sendo a prófase I mais longa que a prófase II.

Nos organismos que possuem cromossomos holocinéticos a meiose pode se comportar de forma regular ou invertida (Vieira *et al.*, 2009). A meiose é denominada regular ou pré-reducional quando na meiose I ocorre à separação dos cromossomos homólogos (divisão reducional) para em seguida, na meiose II, ocorrer à separação das cromátides irmãs (divisão equacional). Esse tipo de meiose é característico de cromossomos monocêntricos (Mola e Papeschi, 2006) e também é observado em alguns organismos com cromossomos holocinéticos, como por exemplo *Caenorhabditis elegans* (Maddox *et al.*, 2004). Por outro lado, na meiose invertida ocorre a separação das cromátides irmãs na meiose I e em seguida a disjunção dos homólogos na meiose II (pós-reducional). Esse processo faz com que nas metáfases I e II seja observado o mesmo número cromossômico (Da Silva *et al.*, 2005). A meiose invertida é restrita a algumas espécies com cromossomos holocinéticos, tendo sido observada, por exemplo, em alguns gêneros da família Cyperaceae, como por exemplo em *Eleocharis* (Da Silva *et al.*, 2005) e *Rhynchospora* (Cabral, 2008), e em animais, como alguns aracnídeos (Rodríguez Gil *et al.*, 2002) e Odonata (Nokkala *et al.*, 2002).

Outra característica relevante encontrada em espécies com cromossomos holocinéticos está relacionada à ocorrência de quiasmas durante a meiose I. Os quiasmas representam os pontos de quebra entre as cromátides dos cromossomos homólogos, onde esses fragmentos originados da quebra são trocados e geram um conjunto cromossômico único que os diferencia de seus parentais (Petronczki *et al.*, 2003). Com relação à ocorrência de quiasmas, a meiose pode ser quiasmática ou aquiasmática. De maneira geral, a meiose quiasmática é encontrada na grande maioria dos organismos com cromossomos monocêntricos. Em cromossomos holocinéticos também pode ocorrer meiose quiasmática ou aquiasmática, porém a existência de meiose aquiasmática em comparação com cromossomos monocêntricos ocorre com mais frequência. Em cromossomos holocinéticos com meiose quiasmática, o número de quiasmas depende do tamanho do bivalente, sendo mais comum a formação de um ou dois quiasmas por bivalente (Nokkala *et al.*, 2004).

A limitação do número de quiasmas por bivalente em cromossomos holocinéticos representa uma desvantagem quando comparado a cromossomos

monocêntricos. Nokkala *et al.* (2004) analisando a meiose de *Psylla foersteri* (Psylloidea, Homoptera) observaram que células cujos bivalentes apresentavam mais de dois quiasmas eram eliminadas, indicando que o número de quiasmas encontra restrições estruturais nesse tipo cromossômico. Por outro lado, por ter a atividade cinetocórica em toda a sua extensão, esse tipo cromossômico é mais tolerante às fragmentações que podem surgir na meiose ou mitose (ver, por exemplo, Vanzela e Colaço, 2002). Dessa maneira, existem vantagens e desvantagens em cada um desses tipos cromossômicos.

2.3.4. Distribuição da heterocromatina

Em cromossomos monocêntricos, Guerra (2000) comparou o padrão de bandeamento C nos cariótipos de 100 angiospermas com diferentes tamanhos cromossômicos e observou que a distribuição da heterocromatina não mostrou ser ao acaso, tendo locais preferenciais de distribuição. Regiões proximais e terminais foram mais comumente bandas-C positivas em comparação a regiões intersticiais. Em cromossomos holocinéticos, a heterocromatina também mostrou um padrão de distribuição mais terminal do que intersticial e esta localização parece ser conservada para cariótipos de plantas e animais (Mola e Papeschi, 2006).

Em cromossomos holocinéticos, a análise de doze espécies do gênero *Drosera* (Droseraceae) pelas técnicas de bandeamento C e CMA-DAPI mostraram uma predominância na distribuição da heterocromatina em regiões terminais, embora bandas intersticiais mais fracas fossem encontradas em alguns cromossomos (Sheikh e Kondo, 1995). Resultados similares foram obtidos posteriormente por Vanzela e Guerra (2000) em algumas espécies do gênero *Rhynchospora*, cuja localização terminal das bandas CMA positivas ocorriam em um ou mais cromossomos das espécies analisadas.

Em heterópteros, bandas C têm sido descritas como preferencialmente localizadas em posições teloméricas e subteloméricas. Espécies de Belastomidae, por exemplo, analisadas pela técnica de bandeamento C, exibiram bandas C teloméricas (Papeschi, 1991). Análises com CMA seguida por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foram realizadas em espécies de *Schizaphis graminum* (Hemiptera) por Mandrioli *et al.* (1999), onde revelaram que a localização dos sítios de DNAr 28S coincidiam com a localização dos blocos de heterocromatina CMA positiva no terminal de um dos telômeros dos cromossomos X. Em *Panstrongylus herreri*, a heterocromatina foi preferencialmente localizada em regiões terminais, enquanto em *P. megistus* foram

observadas bandas intersticiais nos autossomos (Tartarotti e Azeredo-Oliveira, 1999). Portanto, a localização terminal dos blocos heterocromáticos, tanto em cromossomos holocinéticos de plantas e animais, mostram um padrão similar a aqueles que apresentam cromossomos monocêntricos (Mola e Papeschi, 2006).

2.3.5. Evolução cariotípica

A evolução cariotípica dos organismos que possuem cromossomos holocinéticos está relacionada a uma série de rearranjos associados principalmente a agmatoploidia (fissão) e simploidia (fusão), que são tipos de alterações numéricas exclusivos desses organismos (Vanzela *et al.*, 2000; Guerra, 2008). Em animais, dois grupos de insetos têm sido extensamente estudados: heterópteros e odonatas. Em heterópteros, tem sido encontrada uma variação no número diploide entre $2n = 4$ (*Lethocerus sp.*, Belostomatidae) a $2n = 80$ (*Lopidea*, Miridae). Por exemplo, na família Belostomatidae (Nepomorpha) onde 27 espécies foram analisadas, foi observado que o número cromossômico modal $2n = 26 + X_1X_2Y$ (macho) ocorria em 45% das espécies, enquanto outras espécies apresentaram uma redução no número cromossômico equivalente a $2n = 14 + XY$ e em três espécies esta redução foi extremamente acentuada ($2n = 8$ em *Belostoma oxyurum* e *Lethocerus americanus* e $2n = 4$ em *Lethocerus sp.*). Com o intuito de explicar a variação cariotípica da família, Papeschi (1992) sugeriu que o atual cariótipo $2n = 26 + X_1X_2Y$ poderia ter sido derivado do cariótipo $2n = 26 + XY$ a partir da fragmentação do cromossomo X. Por outro lado, a redução cariotípica poderia ter sido originada a partir de fusões dos autossomos. Em odonatas, foram observadas variações cromossômicas de $2n = 6$ (*Macrothemis hemichlora*) a $2n = 41$ (*Orthemis nodiplaga*) sendo os números cromossômicos $2n = 23, 25$ e 27 encontrados em cerca de 90% das espécies. Nesta ordem, o número cromossômico $2n = 25$ ($24 + X$) tem sido o mais frequentemente encontrado, enquanto os outros dois números cromossômicos modais ($2n = 23$ e 27) poderiam ter sido originados apenas por uma fusão (simploidia) ou fragmentação (agmatoploidia) cromossômica, respectivamente (Mola, 1992).

Em plantas, a família Cyperaceae representa o principal grupo com cromossomos holocinéticos, apresentando número básico $x = 5$ (Guerra, 2008). Entretanto, em *Rhynchospora tenuis* ocorreu uma redução do número cromossômico de $n = 5$ para $n = 2$, provavelmente por eventos de simploidia (ver Vanzela *et al.*, 1996). Esse mesmo mecanismo foi observado em outras espécies da família, como em

Fimbristylis umbellaris ($n = 3$) (Rath e Patnaik, 1981) e *Eleocharis subarticulata* ($n = 3$) (Da Silva *et al.*, 2005). Recentemente, outro caso de simploidia foi observado dentro do gênero *Eleocharis* onde a espécie *E. maculosa* com $2n = 10$, apresentou citótipos com $2n = 8, 7$ e 6 . Sítios intersticiais de DNAr 5S nos citótipos com número cromossômico reduzido apoiam a ocorrência de fusão cromossômica e mostram a importância desse mecanismo para gerar novos cariótipos (Da Silva *et al.*, 2008b).

Em *Carex*, outro gênero da família Cyperaceae, ocorre uma grande variação numérica e a agmatoploidia foi indicada como principal mecanismo de diferenciação cariotípica. Roalson *et al.* (2007), por exemplo, observaram que em *C. brownii* ($2n = 72$) e *C. kobomugi* ($2n = 88$) o aumento no número cromossômico não estava associado com o aumento do conteúdo de DNA sugerindo que as mudanças no cariótipo não teriam sido geradas por poliploidia, mas sim por agmatoploidia. Contudo, evidências claras de agmatoploidia e simploidia não são facilmente reconhecidas (Luceño e Guerra, 1996). Por outro lado, em *Rhynchospora*, por exemplo, a poliploidia parece desempenhar um papel mais importante na evolução cariotípica do que mudanças do tipo agmatoploidia/simploidia, ocorrendo em 25 das 50 espécies desse gênero (Vanzela *et al.*, 2000).

A quantidade de DNA, como uma ferramenta de estudo da evolução cariotípica em espécies com cromossomos holocinéticos, foi também aplicada no gênero *Luzula* (Juncaceae) por Kuta *et al.* (2004). Nesse trabalho, foi observada uma ampla variação intra e interespecífica quanto ao número cromossômico e os níveis de ploidia.

2.3.6. Distribuição dos genes de RNAr 5S e 45S

Em cromossomos monocêntricos, a distribuição dos sítios de DNAr 45S parece ter uma preferência pela região subterminal e segundo Lima-de-Faria (1976) essa distribuição estaria influenciada pelas distâncias relativas desses sítios ao centrômero e telômero. Para chegar nesta conclusão, o autor analisou 506 espécies pertencentes a 34 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas onde aproximadamente 86,6% dos casos investigados apresentaram os genes ribossomais distribuídos no braço curto dos cromossomos, onde a distância do cinetócoro ao telômero é menor.

Como nas espécies com cromossomos holocinéticos não existe um centrômero localizado em um ponto determinado do cromossomo, a localização desses sítios deveria ser teoricamente ao acaso, porém dados da literatura quanto à distribuição desses sítios em cromossomos holocinéticos de plantas e animais sugerem uma

distribuição preferencialmente terminal (Vanzela *et al.*, 1998, 2003; Guerra e García, 2004; Da Silva *et al.*, 2005, 2008a; Severi-Aguiar e Azeredo-Oliveira, 2005).

Em espécies de plantas com cromossomos holocinéticos, a análise da distribuição dos sítios de DNAr 45S tem sido realizada apenas em algumas espécies, como por exemplo, nos representantes dos gêneros *Rhynchospora* e *Eleocharis* (Cyperaceae), *Cuscuta* (Convolvulaceae) e *Drosera* (Droseraceae) (Vanzela *et al.*, 1998 e 2003; Furuta e Kondo, 1999; Guerra e García, 2004; Da Silva *et al.* 2005, 2008a, 2010). Todas as espécies analisadas apresentaram sítios terminais.

Em animais com esse tipo cromossômico, a distribuição dos sítios de DNAr 45S tem sido investigada em espécies de triatomíneos (Heteroptera) onde estão presentes preferencialmente em cromossomos sexuais (Severi-Aguiar e Azeredo-Oliveira, 2005). Em afídeos (Homoptera), o DNAr 45S em geral está localizado também na região telomérica do cromossomo X, com exceção das espécies *Amphorophora idaei* e *Schizaphis graminum* nas quais se encontram em posição intersticial (Fenton *et al.*, 1994; Mandrioli *et al.*, 1999).

Os genes de RNAr 5S guardam uma relação funcional estreita com os genes de DNAr 45S e podem também ter distribuição preferencial no cromossomo (ver Barros e Silva, 2007). Em muitas espécies com cromossomos monocêntricos, os sítios de DNAr 5S ocupam uma posição intersticial, como por exemplo em *Aloe ciliaris* (Adams *et al.*, 2000) e em *Hypochaeris sessiliflora* (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2008), sendo menos frequente a distribuição desse sítio em regiões terminais, como observado em algumas espécies da família Orchidaceae por Cabral *et al.* (2006).

Por outro lado, em cromossomos holocinéticos de espécies vegetais, sua distribuição variou entre intersticial e terminal, ver Tabela 1 (Guerra e García, 2004; Da Silva *et al.*, 2008b; Da Silva *et al.*, 2010). Em animais, estudos referentes à distribuição dos sítios de DNAr 5S ainda são escassos, mas na espécie *Acyrtosiphon pisum*, analisada por Bizarro *et al.* (2000), foi observada uma distribuição intersticial. Até o presente momento, não existem estudos estatísticos que analisam a distribuição preferencial ou não dos sítios de DNAr 5S em animais ou vegetais.

Tabela 1. Número e localização dos sítios de DNAr 5S e 45S conhecidos para espécies vegetais

Espécies	2n	Número e Posição DNAr 45S DNAr 5S		Artigos
Família Convolvulaceae				
Gênero <i>Cuscuta</i>				
<i>Cuscuta approximata</i> Bab.	28	2t	6i	Guerra e García (2004)
Família Droseraceae				
Gênero <i>Drosera</i>				
<i>Drosera falconerii</i>	12	3t		Furuta e Kondo (1999)
Família Cyperaceae				
Gênero <i>Eleocharis</i>				
<i>E. acutangula</i> (Roxb.) Schult	54	8t	4t	Da Silva <i>et al.</i> (2008a); Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. bonariensis</i> Nees	20	4t	4t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. capillacea</i> Kunth.	10	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. contracta</i> Maury	20	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. debilis</i> Kunth	30	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. filiculmis</i> Kunth	30	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. flavescens</i> (Poir.) Urban	10	10t	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2008a); Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. geniculata</i> (L.) Roem & Schult.	10	4t	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. geniculata</i> (L.) Roem & Schult.	20	4	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2008a); Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. interstincta</i> (Vahl) Roem & Schult.	40	8t	4t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. laeviglumis</i> R. Trevis. & Boldrini	60	10t	4t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. liesneri</i> S. González & Reznicek	50	10t	4t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. loefgreniana</i> Boeck.	20	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem & Schult	10	6t		Da Silva <i>et al.</i> (2008a)
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem & Schult	10	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2008b); Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem & Schult	8	4t	1t e 1i	Da Silva <i>et al.</i> (2008b)
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem & Schult	7	4t	1t e 1i	Da Silva <i>et al.</i> (2008b)
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem & Schult	6	4t	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2008b)
<i>E. minima</i> Kunth	20	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. montana</i> (Kunth) Roem. & Schult	40	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2008a); Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. nana</i> Kunth	20	2t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. niederleinii</i> Boeck	20	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. obtusetrigona</i> Lindl. & Nees.	52	8t	4t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. plicarhachis</i> (Griseb.) Svenson	54	10t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. sellowiana</i> Kunth	10	4t	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. sellowiana</i> Kunth	20	8	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2008a); Da Silva <i>et al.</i> (2010)

<i>E. subarticulata</i> (Nees) Boeckl.	6	4t	2i	Da Silva <i>et al.</i> (2005); Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>E. viridans</i> Kük ex Osten	20	4t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>Eleocharis</i> sp.	10	6t	2t	Da Silva <i>et al.</i> (2010)
Gênero <i>Rhynchospora</i>				
<i>R. breviscula</i> Pfeiffer	10	4t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. ciliata</i> (Vahl) Kükenth.	10	4t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. diamantina</i> (C. B. Clarke) Kükenth.	24	16t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. pubera</i> (Vahl) Böckeler	10	6t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. rigida</i> (Kunth) Kükenth.	10	8t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. cf. riedeliana</i> C. B. Clarke	12	8t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. rosemariana</i> D. A. Simpson	50	ca. 30t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. speciosa</i> (Kunth) Kükenth.	20	18t		Vanzela <i>et al.</i> (1998)
<i>R. tenuis</i> Link.	4	2t		Vanzela <i>et al.</i> (2003)
<i>R. tenuis</i> Link.	8	4t		Vanzela <i>et al.</i> (2003)

* i, intersticial; t, terminal

3. Referências Bibliográficas

3. Referências Bibliográficas

- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Chase MW, Leitch AR (2000). Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *Amer J Bot* 87:1578-1583.
- Akey CW, Luger K (2003). Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struc Biol* 13:6-14.
- Alberts B *et al.* (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Nova York: Garland Science, p. 1127-1157.
- Badaeva ED, Friebe B, Gill BS (1996). Genome differentiation in *Aegilops*. 2. physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. *Genome* 39:1150-1158.
- Barros e Silva AE (2007). Evolução do DNA satélite na subfamília Aurantioideae (Rutaceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 120 pp., Pernambuco.
- Bizarro D, Mandrioli M, Zanotti M, Giusti M, Manicardi GC (2000). Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera). *Genetica* 108:197-202.
- Blum MJ, McLachlan JS, Saunders CJ, Herrick JD (2005). Characterization of microsatellite loci in *Schoenoplectus americanus* (Cyperaceae). *Mol Ecol Not* 5:661-663.
- Brown SW (1966). Heterochromatin. *Science* 151:417-425.
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M (2006). Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetic Mol Biol* 29:659-664.
- Cabral GCC (2008). Comportamento dos cromossomos holocinéticos em espécies de *Rhynchospora* (Cyperaceae) com meiose quiasmática e aquiasmática. Monografia de Graduação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 73 pp., Pernambuco.
- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction update* 13:313-327.

- Da Silva CRM, Gonzáles-Elizondo MS, Vanzela ALL (2005). Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. Bot J Linn Soc 149:457-464.
- Da Silva CRM, Gonzáles-Elizondo MS, de Almeida Rego LNA, Torezan JMD, Vanzela ALL (2008)a. Cytogenetical and cytotaxonomical analysis of some Brazilian species of *Eleocharis* (Cyperaceae). Aust J Bot 56:82-90
- Da Silva CRM, Gonzáles-Elizondo MS, Vanzela ALL (2008)b. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). Cytogenet Genome Res 122:175-180.
- Da Silva CRM, Quintas CC, Vanzela ALL (2010). Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). DOI: 10.1007/s10709-010-9477-5.
- Dernburg AF (2001). Here, there, and everywhere: Kinetochore function on holocentric chromosomes. J Cell Biol 153:F33-F38.
- Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G, Biamonti G (2009). Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. Chromosoma 118:419-435.
- Douet J, Tourmente S (2007). Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. Heredity 99:5-13.
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007). Finely orchestrated movements: evolution of ribosomal RNA genes. Genetica 175:477-485.
- Fenton B, Birch ANE, Malloch G, Woodford JAT, Gonzalez C (1994). Molecular analysis of ribosomal DNA from the aphid *Amphorophora idaei* and an associated fungal organism. Insect Mol Biol 3:183-189.
- Furuta T, Kondo K (1999). Sites of 18S-5.8S-26S rDNA sequences in diffused-centromeric chromosomes of *Drosera falconerii*. Chromosome Sci 3:69-73.
- Garcia S, Yoong K, Chester M, Gamatje T, Pellicer J, Vallès J, Leitch AR, Kovařík A (2009). Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. Chromosoma 118:85-97.
- Gill N, Findley S, Walling JG, Hans C, Ma J, Doyle J, Stacey G, Jackson SA (2009). Molecular and chromosomal evidence for allopolyploidy in soybean. Plant Physiol 151:1167-1174.

- Golub NV, Nokkala S, Kuznetsova VG (2004). Holocentric chromosomes of Psocids (Insecta, Psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA₃ and DAPI. *Folia Biol* 52:143-149.
- González-Melendi P, Wells B, Beven A, Shaw PJ (2001). Single ribosomal transcription units are linear, compacted christmas trees in plant nucleoli. *Plant J* 27:223-233.
- Gonzalez-Suarez I, Gonzalo S (2008). Crosstalk between chromatin structure, nuclear compartmentalization and telomere biology. *Cytogenet Genome Res* 122:202-210.
- Guerra M (1986). Reviewing the chromosome nomenclature of Levan *et al.* *Rev Brasil Genet* 4:741-743.
- Guerra M, Kenton A, Bennett MD (1996). rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. *Ann Bot* 78:157-161.
- Guerra M (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 23:1029-1041.
- Guerra M (2004). Hibridização *in situ*: princípios básicos. In “FISH Conceitos e Aplicações na Citogenética”. Ed. M. Guerra (organizador), Sociedade Brasileira de Genética.
- Guerra M, García MA (2004). Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximate* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47:134-140.
- Guerra M, Brasileiro-Vidal AC, Arana P, Puertas MJ (2006). Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* 126:33-41.
- Guerra M (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120:339-350.
- Guerra M, Cabral G, Cuacos M, González-García M, González-Sanchez M, Vega J, Puertas MJ (2010). Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of the centromeric rules. *Cytogenet Genome Res* 129:82-96.
- Heitz E (1928). Das Heterochromatin der Moose. *Jb Wiss Bot* 69:762-818.
- Heslop-Harrison JS (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* 12:617-635.

- Hipp AL, Rothrock PE, Roalson EH (2009). The evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *Bot Rev* 75:96-109.
- Holmquist GP, Ashley T (2006). Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* 114:96-125.
- Hong-Guo Y, Evelyn N, Dawe NH, Dawe RK (2000). The plant kinetochore. *Trends Plant Sci* 5:543-547.
- Houben A, Demidov D, Carpeta AD, Karimi R, Agueci F, Vlasenko L (2007). Phosphorylation of histone H3 in plants – a dynamic affair. *Biochim Biophys Acta* 1760:308-315.
- Huang S, Rothblum LI, Chen D (2006). Ribosomal chromatin organization. *Cell Biol* 84:444-449.
- Jiang J, Gill BS (2006). Current status and future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.
- Kenton A (1991). Heterochromatin accumulation, disposition and diversity in *Gibasis kawinskyana* (Commelinaceae). *Chromosoma* 100:467-478.
- Kuta E, Bohanec B, Dubas E, Vižitin L, Przywara L (2004). Chromosome and nuclear DNA study on *Luzula* – a genus with holokinetic chromosomes. *Genome* 47:246-256.
- Labina ES (2007). A chromosomal study of 11 species of *Psylinea* (Insecta: Homoptera). *Comparative Cytogenet* 1:149-154.
- Lanzone C, De Souza MJ (2006). C-banding, fluorescent staining and NOR location in holokinetic chromosomes of bugs of the Neotropical genus *Antiteuchus* (Heteroptera: Pentatomidae: Discocephalinae). *Eur J Entomol* 103: 239–243.
- Li R, Taylor S, Jenkins G (2001). Unravelling the phylogeny of tetraploid *Vicia amoena* (Fabaceae) and its diploid relatives using chromosomal landmarks. *Hereditas* 134:219-224.
- Lima-de-Faria A (1976). The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83:1-22.
- Luceño M, Guerra M (1996). Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 49:301-309.
- Maddox PS, Oegema K, Desai A, Cheeseman IM (2004). “Holo” er than thou: Chromosome segregation and kinetochore function in *C. elegans*. *Chromosome Res* 12:641-653.

- Maeshima K, Eltsov M (2008). Packaging the genome. The structure of mitotic chromosomes. *J Biochem* 143:145-153.
- Mandrioli M (2002). Cytogenetic characterization of telomeres in the holocentric chromosomes of the lepidopteran *Mamestra brassicae*. *Chromosome Res* 10:279-286.
- Mandrioli M, Ganassi S, Bizzaro D, Manicardi GC (1999). Cytogenetic analysis of the holocentric chromosomes of the aphid *Schizaphis graminum*. *Hereditas* 131:185-190.
- Manicardi GC, Bizarro D, Mandrioli M, Bianchi U (1998). Silver staining as a new banding technique to identify aphid chromosomes. *Chromosome Res* 6:55-57.
- Mola LM (1992) Estudios cromosômicos en libélulas (Orden Odonata). Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. pp III+184.
- Mola LM, Papeschi AG (1994). Karyotype evolution in *Aeshna* (Aeshnidae, Odonata). *Hereditas* 121:185-189.
- Mola LM, Papeschi AG (2006). Holokinetic chromosomes at a glance. *J Basic App Genetic* 16:1-17.
- Monen J, Maddox PS, Hyndman F, Oegema K, Desai A (2005): Differential role of CENP-A in the segregation of holocentric *C. elegans* chromosomes during meiosis and mitosis. *Nat Cell Biology* 7: 1248-1262.
- Morais AP, Lemos RR, Brasileiro-Vidal AC, dos Santos Soares Filho W, Guerra M (2007). Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. *Cytogenet Genome Res* 119:275-281.
- Mroczek RJ, Dawe RK (2003). Distribution of retroelements in centromeres and neocentromeres of maize. *Genetics* 165:809-819.
- Nagaki K, Kashiwara K, Murata M (2005). Visualization of diffuse centromeres with centromere – specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. *Plant Cell* 17: 1886 – 1893.
- Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecílio L, Viegas W (2005). Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res* 109:104-111.
- Nogueira Cano MI (2006). A vida nas ‘pontas’ dos cromossomos. *Ciência Hoje* 39:16-23.

- Nokkala S, Laukkanen A, Nokkala C (2002). Mitotic and meiotic chromosomes in *Somatochlora metallica* (Cordulidae, Odonata). The absence of localized centromeres and inverted meiosis. *Hereditas* 136:7-12.
- Nokkala S, Kuznetsova VG, Maryanska-Nadachowska A, Nokkala C (2004). Holocentric chromosomes in meiose. I. Restriction of the number of chiasmata in bivalents. *Chromosome Res* 12:733-739.
- Papeschi AG (1991). DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma* (Heteroptera, Belostomatidae). *Hereditas* 115:109-114.
- Papeschi AG (1992) Estudios citogenéticos y evolutivos en Heteroptera. Doctor en Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. pp VII+259.
- Pedrosa-Harand A, Guerra M (2004). Contribuição da FISH para a citogenética de plantas. In 'FISH, Conceitos e Aplicações na Citogenética'. Ed. Guerra M, pp. 33-59 Sociedade Brasileira de Genética.
- Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112:423-440.
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinov DA, Panning B (2002). Xist RNA and the mechanism of x chromosome inactivation. *Ann Rev Genet* 36:233-278.
- Pluta AF, Mackay AM, Ainsztein AM, Goldberg G, Earnshaw WC (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* 270:1591-1594.
- Rath SP, Patnaik SN (1981). Cytological studies in Indian species of *Fimbristylis* Vahl (Cyperaceae) with special reference to taxonomy. In "Perspective in Cytology and Genetics". Ed. Manna GK and Sinha U, pp. 175-181 Hindasia Publishers.
- Richards EJ, Ausubel FM (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53:127-136.
- Roalson EH, McCubbin AG, Whitkus R (2007). Chromosome evolution in Cyperales. *Aliso* 23:62-71.
- Roalson EH (2008). A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. *Bot Rev* 74:209-393.
- Rodríguez Gil SG, Mola LM, Papeschi AG, Scioscia CL (2002). Cytogenetic heterogeneity in common Haplogyne spiders from Argentina (Arachnida, Araneae). *J Arachnology* 30:47-56.

- Rogers SO, Bendich AJ (1987). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol* 9:509-520.
- Santoro R (2005). The silence of the ribosomal RNA genes. *Cell Mol Life Sci* 62:2067-2079.
- Severi-Aguiar GDC, Azeredo-Oliveira MTV (2005). Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genetics Mol Res* 4:704-709.
- Sheikh SA, Kondo K (1995). Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *Amer J Bot* 82:1278-1286.
- Sone T, Fujisawa M, Takenaka M, Nakagawa S, Yamaoka S, Sakaida M, Nishiyama R, Yamato KT, Ohmido N, Fukui K, Fukuzawa H, Ohyama K (1999). Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Mol Biol* 41:679-685.
- Sumner A (2003). *Chromosomes Organization and Function*, ed. Adrian T. Sumner, Blackwell Publishing.
- Sun X, Wahlstrom J, Karpen G (1997). Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91:1007-1069.
- Sýkorová E, Lim KY, Kunická Z, Chase MW, Bennett MD, Fajkus J, Leitch AR (2003). Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proc R Soc Lond B* 270:1893-1904.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT (1999). Heterochromatin patterns in triatomines of the genus *Panstrongylus*. *Cytobios* 99:113-122.
- Thomas WW, Araújo AC, Alves MV (2009). A preliminary molecular phylogeny of the Rhynchosporae (Cyperaceae). *Bot Rev* 75:22-29.
- Van Hooser AA, Yuh P, Heald R (2005). The perichromosomal layer. *Chromosoma* 114:377-388.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceño M (1996). *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios* 88:219-228.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Jouva N, Luceño M, Guerra M (1998). Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosome of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chromosome Res* 6: 345-349.

- Vanzela ALL, Guerra M (2000). Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* 23: 453-456.
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M (2000). Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Bot J Linn Soc* 134:557-566.
- Vanzela ALL, Colaço W (2002). Mitotic and meiotic behavior of γ irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Acta Scientiarum* 24:611-614.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Guerra M (2003). Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* 26:199-201.
- Viera A, Page J, Rufas J (2009). Inverted meiosis: the true bugs as a model to study. *Genome Dyn.* 5: 137-156.
- Walker MY, Hawley RS (2000). Hanging on to your homolog: the roles of pairing, synapsis and recombination in the maintenance of homolog adhesion. *Chromosoma* 109:3-9.
- Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS, Stuessy TF (2008). Karyotype diversification and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. *Ann Bot* 101: 909–918.
- Zeng K, de las Heras JI, Ross A, Yang J, Cooke H, Shen MH (2004). Localisation of centromeric proteins to a fraction of mouse minor satellite DNA on a mini-chromosome in human, mouse and chicken cells. *Chromosoma* 113:84-91.

***4. Manuscrito a ser submetido à revista
Micron***

**DISTRIBUIÇÃO DOS SÍTIOS DE DNAR 5S E 45S EM CROMOSSOMOS
HOLOCINÉTICOS DE ESPÉCIES VEGETAIS**

Aretuza Sousa dos Santos^a, Ana Emília Barros e Silva^b, Marccus Alves^a e Marcelo Guerra^{a,*}

^a Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50570-910 Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58397-000 Areia, PB, Brasil.

* Autor para correspondência:

Tel. + 55 81 2126 8846

Fax. + 55 81 2126 8348

E-mail: msfguerra@hotmail.com

Resumo

Os sítios de DNAr estão localizados preferencialmente na região terminal dos cromossomos. Essa distribuição foi avaliada estatisticamente em espécies com cromossomos monocêntricos e supostamente está relacionada à existência de um “campo cromossômico” compreendido entre o centrômero e o telômero, no qual determinados eventos citogenéticos ocorreriam preferencialmente. Se essa hipótese for verdadeira, em cromossomos holocinéticos, os quais não apresentam um centrômero localizado, essa distribuição preferencial não deverá ocorrer. Para testar essa hipótese foi feito um estudo comparativo da distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S, por hibridização *in situ* fluorescente, em representantes dos gêneros *Eleocharis*, *Diplacrum*, *Fimbristylis*, *Kyllinga* e *Rhynchospora*, todos pertencentes à família Cyperaceae. O número de sítios por complemento diplóide variou de 2 a ~10 para o DNAr 5S e de 2 a ~45 para o DNAr 45S. Todas as 11 espécies analisadas apresentaram os sítios de DNAr 45S localizados terminalmente nos cromossomos enquanto os sítios de DNAr 5S mostraram distribuição geralmente terminal, exceto nas espécies de *Rhynchospora*, onde a localização foi quase sempre intersticial. Esses dados, juntamente com outros da literatura, sugerem que a variação em número e posição dos sítios de DNAr em espécies com cromossomos holocinéticos é não-aleatória e semelhante à encontrada em espécies com cromossomos monocêntricos. Portanto, a localização preferencialmente terminal dos sítios de DNAr 45S observada em cromossomos monocêntricos não parece ser influenciada pela polarização centrômero-telômero, como sugerida pela hipótese do “campo cromossômico”.

Palavras-chave: Campo cromossômico, cromossomos holocinéticos, DNAr 5S, DNAr 45S.

1. Introdução

A região organizadora do nucléolo (RON) é a região cromossômica melhor e mais extensamente estudada, principalmente por formar a constrição secundária, constituída por genes de RNAr 45S repetidos em tandem (Huang *et al.*, 2006). Com o advento da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), os sítios de ocorrência dos genes de RNAr 45S puderam ser mais facilmente detectados e se tornaram também a região mais extensamente investigada por FISH. Em muitos casos, os sítios de DNAr 45S foram restritos às RONs, mas em várias espécies, outros sítios menores ou menos ativos foram também localizados (ver por exemplo, Guerra *et al.*, 1996; Carvalho e Guerra, 2002). Com a técnica de FISH foi possível também localizar os sítios de DNAr 5S em um grande número de espécies, que logo se tornaram a segunda família gênica mais estudada por FISH (ver por exemplo, Röser *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2010).

Lima-de-Faria (1976) comparou a posição da RON em centenas de espécies com cromossomos monocêntricos e concluiu que em ~86% dos casos a RON estava situada na região cromossômica terminal ou subterminal. Até então, a detecção das RONs era feita principalmente pela observação da constrição secundária, uma região incompletamente condensada do cromossomo relacionada a ativação gênica dessa região na intérfase anterior (Neves *et al.*, 2005).

Para esse autor, a posição preferencialmente terminal da RON seria condicionada por um distanciamento mínimo do sítio ao centrômero. Em espécies com cromossomos monocêntricos, a presença do centrômero definiria um campo polarizado pelo centrômero de um lado e o telômero do outro. Nesse campo, que corresponde ao braço cromossômico, determinados fenômenos, como a posição dos quiasmas e da região organizadora do nucléolo (RON), ocorrem de forma não-aleatória (Lima-de-Faria, 1976, 1980). A hipótese da existência desse “campo cromossômico” dependeria portanto da ocorrência de um centrômero localizado e seria restrita aos cromossomos monocêntricos.

Cromossomos holocêntricos ou holocinéticos são caracterizados por não possuírem um centrômero ou constrição primária evidente e por apresentarem nas células somáticas o cinetócoro difuso, distribuído ao longo de toda extensão do cromossomo (Nagaki *et al.*, 2005). Este tipo cromossômico parece ter surgido independentemente em várias linhagens de plantas e animais. Em plantas, são conhecidos apenas em alguns gêneros de eudicotiledôneas, como *Drosera*

(Droseraceae), *Myristica* (Myristicaceae) e *Cuscuta* (Convolvulaceae) e nas famílias de monocotiledôneas Juncaceae e Cyperaceae (Mola e Papeschi, 2006).

Estudos referentes à distribuição dos sítios de DNAr 45S em cromossomos holocinéticos são escassos e, em plantas, têm sido realizados apenas em algumas espécies dos gêneros *Rhynchospora* (Vanzela *et al.*, 1998, 2003) e *Eleocharis* (Da Silva *et al.*, 2005, 2008a, 2010), da família Cyperaceae, *Cuscuta* (Guerra e García, 2004) e *Drosera* (Furuta e Kondo, 1999). Por outro lado, a localização do DNAr 5S foi estudada somente em *Cuscuta approximata* e em espécies de *Eleocharis* (Guerra e García, 2004; Da Silva *et al.*, 2008b; Da Silva *et al.*, 2010). Nesses casos, a localização dos sítios de DNAr 45S foi terminal, enquanto a localização do DNAr 5S foi intersticial em *Cuscuta* e terminal ou intersticial em *Eleocharis* (Guerra e García, 2004; Da Silva *et al.*, 2008b; Da Silva *et al.*, 2010).

No presente trabalho foi analisada a distribuição cromossômica dos sítios de DNAr 5S e 45S em representantes de cinco gêneros de Cyperaceae, visando verificar se a distribuição desses sítios em cromossomos holocinéticos ocorre ao acaso ou tem distribuição preferencial. Além disso, algumas particularidades dos números cromossômicos e dos sítios de DNAr observados serão discutidos por serem os primeiros registros desses dados na literatura.

2. Material e Métodos

Material vegetal

Foram analisadas 11 espécies da família Cyperaceae: seis do gênero *Rhynchospora* [*R. pubera* (Vahl) Böckeler, *R. cephalotes* (L.) Vahl, *R. ciliata* (Vahl) Kükenth., *R. contracta* (Nees) Raynal, *R. holoschoenoides* (Rich.) Herter e *R. tenuis* Link], duas do gênero *Fimbristylis* [*F. dichotoma* (L.) Vahl e *F. cymosa* Lam.], *Diplacrum capitatum* (Willd.) Boeck., *Kyllinga brevifolia* Rottb e *Eleocharis confervoides* (Poir.) Miq. As amostras foram coletadas e, mantidas em cultivo no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco e os vouchers depositado no herbário UFP (Tabela 1).

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas, pontas de raízes obtidas a partir de plantas adultas cultivadas em jarros foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 20 h a

10 °C, fixadas em etanol-ácido acético (3:1; v/v) por 2 a 24 h à temperatura ambiente e estocadas a

–20 °C até a utilização. As raízes fixadas foram lavadas em água destilada e digeridas em uma solução enzimática com 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma), a 37 °C por 1 h. O meristema foi macerado em uma gota de ácido acético 45% e a lamínula foi retirada em nitrogênio líquido.

As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para selecionar as melhores preparações. Posteriormente, elas foram descoradas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 min à temperatura ambiente, mantidas em etanol absoluto a 10 °C até o dia seguinte e estocadas a –20 °C para posterior análise.

Hibridização in situ fluorescente (FISH)

Os sítios de DNAr 5S foram localizados usando o clone Rhy2 de *R. tenuis* e os sítios de DNAr 45S foram localizados usando a sonda R2, um fragmento de 6,5 kb da unidade repetitiva do DNAr 18S-5,8S-25S de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck *et al.*, 1997). As sondas de DNAr 5S e 45S foram marcadas por *nick translation* (Invitrogen) com Cy3-dUTP (GE Healthcare) e digoxigenina-11-dUTP (Roche), respectivamente. O procedimento de FISH utilizado foi baseado em Pedrosa *et al.* (2002) com pequenas modificações, incluindo o pré-tratamento das lâminas com pepsina na concentração de 0,2 mg/ml. A mistura de hibridização foi constituída por 50% de formamida (v/v), 5% de dextran sulfato (w/v), 2× SSC e 5 ng/µl de cada sonda. A sonda de DNAr 45S foi detectada com anti-digoxigenina produzida em ovelha, conjugada com FITC (Roche), e o sinal amplificado com anticorpo anti-IgG de ovelha, produzido em coelho, conjugado com FITC (Sigma). Todas as preparações foram contra-coradas e montadas com 2 µg/ml de DAPI em Vectashield (Vector). As imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo Cohu, usando o programa QFISH da Leica e depois editadas no programa Adobe Photoshop CS3.

Medições cromossômicas e construção dos idiogramas

O tamanho dos cromossomos e dos sítios de DNAr 5S e 45S foi estimado a partir de medições feitas com a ferramenta “ruler tool” do Adobe Photoshop. Cinco metáfases mitóticas foram utilizadas para a medição dos cromossomos e dos sítios de DNAr 5S e 45S. Em *K. brevifolia*, devido ao grande número de cromossomos, foram

avaliados apenas os limites de variação dos tamanhos dos cromossomos, estimados pela medição dos cinco maiores e dos cinco menores cromossomos de três células. Os cromossomos foram desenhados utilizando o programa CorelDraw Graphics Suite X4.

3. Resultados

O número cromossômico variou entre as espécies analisadas de $2n = 4$ a $2n = \sim 120$ enquanto o tamanho cromossômico variou de cerca de 0,9 a 6,1 μm . Em todas as espécies, os sítios de DNAr 45S estavam sempre localizados na região terminal dos cromossomos enquanto os sítios de DNAr 5S ocuparam posições terminais ou intersticiais. O número de sítios por complemento diplóide variou de 2 a ~ 10 para o DNAr 5S e de 2 a ~ 45 para o DNAr 45S. A Tabela 1 apresenta uma síntese da variação observada no número e tamanho cromossômico e no número e posição dos sítios de DNAr nas espécies analisadas. As Figuras 1 e 2 mostram metáfases de todas as espécies investigadas e a Figura 3 apresenta um idiograma para cada uma dessas espécies, com exceção de *Kyllinga brevifolia*, para a qual a posição dos sítios de DNAr não pôde ser definida com segurança. Nos idiogramas, as regiões com sítios ribossomais terminais ou subterminais foram arbitrariamente posicionadas para cima.

Em *Rhynchospora tenuis* ($2n = 4$) foi detectado um sítio de DNAr 5S no maior par cromossômico e um sítio de DNAr 45S no menor par, em posições diferentes (Fig. 1a). Em *R. pubera* ($2n = 10$), cada par cromossômico foi caracterizado por um padrão distinto de sítios de DNAr 5S e 45S. Nessa espécie, foram encontrados seis pares de sítios de DNAr 5S, sendo quatro pares maiores e dois menores. Os dois pares menores, localizados em cromossomos que já apresentavam um sítio de DNAr 5S maior, nem sempre foram detectados (Fig. 1b e 3).

Rhynchospora ciliata ($2n = 10$) e *R. contracta* ($2n = 18$) apresentaram distribuição de sítios ribossomais semelhantes, ambas com apenas um par de sítios de DNAr 5S intersticial e um par de sítios de DNAr 45S terminal (Figs. 1c, d). *Rhynchospora cephalotes* apresentou variação intra-individual de número cromossômico, sendo $2n = 19$ encontrado em 87% das células analisadas (Fig. 1e) enquanto apenas 13% apresentou $2n = 18$. Foram localizados nessa espécie um par de sítios de DNAr 5S intersticiais e um par de sítios de DNAr 45S terminais. Em *Rhynchospora holoschoenoides* ($2n = 20$) foram detectados três pares de DNAr 45S e dois pares de DNAr 5S, sendo um deles muito pequeno e nem sempre visualizado.

Em *Diplacrum capitatum* ($2n = 36$) foi observado um par de sítios de DNAr 5S e um par de sítios de DNAr 45S distribuídos terminalmente. Curiosamente, os sítios de DNAr 5S apresentaram uma marcação um pouco difusa durante a metáfase e geralmente mais condensada nos núcleos interfásicos (Fig. 2a e b). As duas espécies de *Fimbristylis* apresentaram cariótipos distintos. *Fimbristylis dichotoma* ($2n = 30$) apresentou cromossomos com quatro sítios de DNAr 45S terminais e quatro sítios de DNAr 5S, sendo dois sítios de DNAr 5S intersticiais e dois sítios terminais, enquanto *F. cymosa* ($2n = 50$) apresentou sítios sempre terminais, sendo dois de DNAr 5S e quatro de DNAr 45S.

Em *Kyllinga brevifolia* foi observado o maior número cromossômico dentre as espécies analisadas, $2n = \sim 120$. O cariótipo foi aparentemente simétrico, com todos os cromossomos medindo cerca 0,9 a 1,8 μm . Em quase todas as células analisadas, os numerosos sítios de DNAr pareciam intimamente associados ou sobrepostos, dificultando a contagem do número de sítios. Nas duas células melhor espalhadas, foram encontrados de 8 a 10 sítios de DNAr 5S e 40 a cerca de 45 sítios de DNAr 45S. A Figura 2e mostra uma metáfase com cerca de 45 sítios de DNAr 45S, localizados geralmente na região terminal dos cromossomos e aproximadamente 10 sítios de DNAr 5S aparentemente também terminais (Fig. 2f).

Em *Eleocharis confervoides* foram observadas células com $2n = 40$ e $2n = 41$. Entretanto, após análise com FISH, um dos cromossomos menores e com coloração DAPI mais apagada marcava inteiramente com a sonda de DNAr 45S, indicando que se tratava de um satélite. Nesse caso, o número cromossômico mais provável para essa espécie é $2n = 40$. Nessa espécie, os sítios de DNAr 5S ocorreram no maior par cromossômico enquanto os sítios de DNAr 45S ocorreram em ao menos 14 cromossomos (Fig. 2g), todos com localização terminal.

4. Discussão

Os números cromossômicos observados neste trabalho coincidiram com os dados da literatura (Luceño *et al.*, 1998b; Vanzela *et al.*, 2000), com exceção de *Fimbristylis cymosa* ($2n = 50$) e *F. dichotoma* ($2n = 30$). Para *F. cymosa* os registros prévios são de $n = 5$ e $2n = 32$, enquanto para *F. dichotoma* existem registros de $2n =$

32, $n = 5$ e $n = 10$ (IPCN, 2010), sendo todas essas contagens feitas em amostras procedentes da Índia. A diferença de números cromossômicos em relação à amostra brasileira pode ser devida à existência de citótipos poliplóides diferentes, muito freqüentes na família Cyperaceae (Luceño et al., 1998b). Contudo, o registro de $2n = 32$, feito por Subramanian (1988) para essas duas espécies, possivelmente se trata de um erro de contagem cromossômica, uma vez que esse autor reportou os números $2n = 16$ ou 32 em todas as espécies de *Fimbristylis* que analisou e foi o único a reportar esses números entre mais de 20 outros autores que analisaram a citologia do gênero (IPCN, 2010). Para *Diplacrum capitatum* ($2n = 36$) e *Eleocharis confervoides* ($2n = 40$) esse foi o primeiro registro de número cromossômico. Em *K. brevifolia*, a determinação do número cromossômico foi aproximada porque as metáfases contadas variaram amplamente, sendo os números mais frequentes em torno de 120 cromossomos. Para *R. cephalotes*, os números $2n = 18, 19$ confirmam algumas das contagens de Luceño et al. (1998a) que reportaram $2n = 17, 18$ e 19, baseados em análise meiótica da mesma população deste estudo. Devido à similaridade dos cromossomos dessa espécie, não foi possível estabelecer com segurança qual o cromossomo excedente nas células com $2n = 19$.

Em relação aos sítios de DNAr 45S, três das seis espécies analisadas de *Rhynchospora* (*R. ciliata*, *R. pubera* e *R. tenuis*) haviam sido previamente investigadas por Vanzela et al. (1998, 2003), com idênticos resultados. Para as demais espécies de *Rhynchospora* e para as espécies de *Eleocharis*, *Diplacrum*, *Fimbristylis* e *Kyllinga*, esse é o primeiro registro para os sítios de DNAr 5S e 45S. Numericamente, os sítios de DNAr 45S foram mais variáveis que os de DNAr 5S, não havendo correlação entre o número de sítios e o nível de ploidia ou o número cromossômico. Vanzela et al. (1998) observaram que entre as espécies de *Rhynchospora* com $2n = 10$ foram encontradas 4, 6 ou 8 sítios de DNAr 45S. Similarmente, em *R. speciosa* (Vanzela et al., 1998) e *R. holoschoenoides*, ambas com $2n = 20$, o número de sítios de DNAr 45S variou de 18 na primeira para apenas 6 na última. Por outro lado, as duas espécies analisadas do gênero *Fimbristylis* apresentaram o mesmo número de sítios de DNAr 45S (quatro) com números cromossômicos muito diferentes ($2n = 30$ em *F. dichotoma* e $2n = 50$ em *F. cymosa*).

Em relação aos sítios de DNAr 5S, a maioria das espécies aqui analisadas apresentou apenas um ou dois pares por espécie, em acordo com os resultados de Da Silva et al. (2008b, 2010) para *Eleocharis*. *Rhynchospora pubera*, com sítios de DNAr

5S em quase todos os cromossomos, parece uma condição mais rara. Em espécies com cromossomos monocêntricos, sítios múltiplos de DNAr 5S também são menos frequentes, mas alguns exemplos são conhecidos, como em *Alstroemeria* (Baeza *et al.*, 2007) e *Brassica* (Schrader *et al.*, 2000).

Em *Diplacrum capitatum* foi observado que os sítios de DNAr 5S pareciam parcialmente difusos ou descondensados em metáfase, diferentemente das demais espécies. Sinais de hibridização *in situ* parcialmente difusos em metáfase têm sido reportados apenas para o DNAr 45S, tanto de espécies com cromossomos holocinéticos (Vanzela *et al.*, 1998) quanto com cromossomos monocêntricos (Berjano *et al.*, 2009), e tem sido frequentemente associado com mudanças nos padrões de metilação do DNA e da histona H3 (Pontes *et al.*, 2007; McStay e Grummt, 2008). Contudo em *Arabidopsis*, loops de DNAr 5S distendidos, ricos em H3K9 acetilada e H3K4 metilada transcricionalmente ativos, têm sido observados (Mathieu *et al.*, 2003).

Em todas as espécies analisadas neste trabalho, os sítios de DNAr 45S foram observados na posição terminal. Igualmente em 23 espécies de *Eleocharis* examinadas por Da Silva *et al.* (2008, 2010) e nas únicas espécies de *Drosera* e *Cuscuta* investigadas (Furuta e Kondo, 1999; Guerra e García, 2004), os sítios de DNAr 45S foram sempre terminais. Em animais, onde um maior número de espécies com cromossomos holocinéticos foram estudados com FISH, sítios de DNAr 45S foram encontrados na região intersticial de algumas poucas espécies, como, por exemplo, em *Planococcus citri* (Homoptera) e em *Amphorophora idaei* (Hemiptera) (Fenton *et al.*, 1994; Ferraro *et al.*, 1998). Esses dados indicam que em cromossomos holocinéticos os sítios de DNAr 45S têm uma preferência pela posição terminal igual ou mais marcante que nos cromossomos monocêntricos. Lima-de-Faria (1976) observou, com base em dados da literatura, que cerca de 86% dos eucariotos apresentavam RONS terminais ou subterminais. Entretanto, a localização dos sítios de DNAr por FISH pode revelar um número maior de sítios e alterar substancialmente esses dados. O significado da posição preferencial dos sítios de DNAr 45S é desconhecido, mas é possível que o maior potencial que esses sítios possuem para recombinação ectópica, gerando translocações cromossômicas, tenha restringido sua distribuição às regiões cromossômicas terminais (Hanson *et al.*, 1996; Pedrosa-Harand *et al.*, 2006).

Em relação aos sítios de DNAr 5S, estes apresentaram uma maior variação quanto a sua localização, ocorrendo principalmente na região intersticial das espécies de *Rhynchospora* e nas regiões subterminais e terminais das demais espécies aqui

analisadas. Em *Cuscuta approximata* foram encontrados dois pares de sítios de DNAr 5S subterminais e um par intersticial (Guerra e García, 2004). Em *Eleocharis*, apenas quatro das 23 espécies previamente analisadas tiveram sítios intersticiais (Da Silva *et al.*, 2010). Uma análise estatística da distribuição dos sítios de DNAr 5S em cromossomos monocêntricos não é conhecida, embora dados preliminares sugiram que estes ocorram preferencialmente na região intersticial (Fernando Roa, comunicação pessoal).

Esses dados sugerem que ao menos o DNAr 45S ocupa uma região preferencial no cromossomo, independentemente da presença de um centrômero localizado. Portanto, a distribuição desse sítio não parece ser influenciada pela polarização centrômero-telômero, como admitido na hipótese do “campo cromossômico” proposta por Lima-de-Faria (1976, 1980). É possível que a localização preferencial desses sítios nas regiões terminais esteja simplesmente relacionada a uma maior frequência de rearranjos inter-locos em sequências repetidas em tandem. Quando essas sequências estão situadas nas regiões terminais dos cromossomos, os rearranjos não-alélicos não afetam substancialmente os grupos de ligação e, portanto, teriam pouco ou nenhum efeito no equilíbrio gênico do organismo (Hanson *et al.*, 1996; Pedrosa-Harand *et al.*, 2006).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos doutorandos Artur Felipe, Fernando Roa e Luiz Gustavo R. Souza pelo auxílio com os idiogramas e imagens, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de A. S. e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro concedido para desenvolvimento do projeto.

Referências Bibliográficas

- Baeza, C., Schrader, O., Budahn, H., 2007. Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstoemeria* L. species (Chile) using FISH of tandemly repeated DNA sequences and RAPD analysis. *Plant Syst. Evol.* 269, 1-14.
- Berjano, R., Roa, F., Talavera, S., Guerra, M., 2009. Cytotaxonomy of diploid and poliploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI bands and 5S and 45S rDNA sites. *Plant Syst. Evol.* 280, 1615-6110.
- Carvalho, R., Guerra, M., 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136, 159-168.
- Da Silva, C.R.M., Gonzáles-Elizondo, M.S., Vanzela, A.L.L., 2005. Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Bot. J. Linn. Soc.* 149, 457-464.
- Da Silva, C.R.M., Gonzáles-Elizondo, M.S., de Almeida Rego, L.N.A., Torezan, J.M.D., Vanzela, A.L.L., 2008a. Cytogenetical and cytotaxonomical analysis of some Brazilian species of *Eleocharis* (Cyperaceae). *Aust. J. Bot.* 56, 82-90.
- Da Silva, C.R.M., Gonzáles-Elizondo, M.S., Vanzela, A.L.L., 2008b. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenet. Genome Res.* 122, 175-180.
- Da Silva, C.R.M., Quintas, C.C., Vanzela, A.L.L., 2010. Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). DOI: 10.1007/s10709-010-9477-5.
- Fenton, B., Birch, A.N.E., Malloch, G., Woodford, J.A.T., Gonzalez, C., 1994. Molecular analysis of ribosomal DNA from the aphid *Amphorophora idaei* and an associated fungal organism. *Insect Mol. Biol.* 3, 183-189.
- Ferraro, M., Epifani, C., Bongiorno, S., Nardone, A.M., Parodi-Delfino, S., Prantera, G., 2002. Cytogenetics characterization of the genome of mealybug *Planococcus citri* (Homoptera, Coccoidea). *Caryologia* 51, 37-49.
- Furuta, T., Kondo, K., 1999. Sites of 18S-5.8S-26S rDNA sequences in diffused-centromeric chromosomes of *Drosera falconerii*. *Chromosome Sci.* 3, 69-73.
- Greilhuber, J., 1995. Chromosome of the monocotyledons (general aspects), in: Rudall, P.J., Cribb, P.J., Cutler, D.F., Humphries, C.J. (Eds.), *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. Royal Botanic Gardens: Kew, pp. 379-414.

- Guerra, M., Kenton, A., Bennett, M.D., 1996. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. *Ann. Bot.* 78, 157-161.
- Guerra, M., García, M.A., 2004. Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47, 134-140.
- Hanson, R.E., Islam-Faridi, M.N., Percival, E.A., Crane, C.F., Ji, Y., McKnight, T.D., Stelly, D.M., Price, H.J., 1996. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Glossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105, 55-61.
- Huang, S., Rothblum, L.I., Chen, D., 2006. Ribosomal chromatin organization. *Cell Biol.* 84, 444-449.
- IPCN-Index to Plant Chromosome Numbers: Search the IPCN for Acessions 2010. Internet references <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html> retrieved (21.03.10).
- Lima-de-Faria, A., 1976. The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. *Hereditas* 83, 1-22.
- Lima-de-Faria, A., 1980. Classification of genes, rearrangements and chromosomes according to the chromosome field. *Hereditas* 93, 1-46.
- Luceño, M., Mendes, A.P., Vanzela, A.L.L., Alves, M.V., 1998a. Agmatoploidy and symploidy in *Rhynchospora cephalotes* (L.) Vahl (Cyperaceae). *Cytologia* 63, 79-81.
- Luceño, M., Vanzela, A.L.L., Guerra, M., 1998b. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can. J. Bot* 76, 440-449.
- Mattieu, O., Jasencakov, Z., Vaillant, I., Gendrel, A-V., Colot, V., Schubert, I., Tourmente, S., 2003. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2929-2939.
- McStay, B., Grummt, I., 2008. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 131-157.
- Mola, L.M., Papeschi, A.G., 2006. Holokinetic chromosomes at a glance. *J. Basic. App. Genetic.* 16, 1-17.

- Nagaki, K., Kashihara, K., Murata, M., 2005. Visualization of diffuse centromeres with centromere – specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. Plant Cell 17, 1886-1893.
- Neves, N., Delgado, M., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecílio, L., Viegas, W., 2005. Ribosomal DNA heterochromatin in plants. Cytogenet. Genome Res. 109, 104-111.
- Pedrosa, A., Sandal, N., Stougaard, J., Schweizer, D., Bachmair, A., 2002. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. Genetics 161, 1661-1672.
- Pedrosa-Harand, A., Souza de Almeida, C.C., Mosiolek, M., Blair, M.W., Schweizer, D., Guerra, M., 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. Theor. Appl. Genet. 112, 924-933.
- Pontes, O., Lawrence, R.J., Silva, M., Sasha, P., Costa-Nunes, P., Earley, K., Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C.S., 2007. Postembryonic establishment of megabase-scale gene silencing in nucleolar dominance. PLoS ONE 11, 1-11.
- Roa, F., Guerra, M., 2009. Preferential positions of 5S ribosomal RNA genes in plant genomes. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas (Abstracts) Búzios, Rio de Janeiro (BR): 2009. p 180.
- Röser, M., Winterfeld, G., Grenbenstein, B., Hemleben, V., 2001. Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). Mol. Phylogenet. Evol. 21, 198-217.
- Schrader, O., Budahn, H., Ahne, R., 2000. Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence *in situ* hybridization. Theor. Appl. Genet. 100, 665-669.
- Subramanian, D., 1988. Cytotaxonomical studies in south Indian Cyperaceae I. Species from the plains. Cytologia 53, 67-72.
- Vanzela, A.L.L., Cuadrado, A., Jouva, N., Luceño, M., Guerra, M., 1998. Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosome of *Rhynchospora* (Cyperaceae). Chromosome Res. 6, 345-349.
- Vanzela, A.L.L., Luceño, M., Guerra, M., 2000. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). Bot. J. Linn. Soc. 134, 557-566.

Vanzela, A.L.L., Cuadrado, A., Guerra, M., 2003. Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). Genet. Mol. Biol. 26, 199-201.

Legenda das Figuras

Fig. 1 – Distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em cromossomos de *Rhynchospora tenuis* (**a**), *R. pubera* (**b**), *R. ciliata* (**c**), *R. contracta* (**d**), *R. cephalotes* (**e**) e *R. holoschoenoides* (**f**). Insertos em **b** e **f** mostram sítios de DNAr 5S visto com o filtro Cy3, em maior contraste. Cabeças de seta vermelhas e verdes indicam, respectivamente, sítios de DNAr 5S e 45S menores. Barra em **f** corresponde a 10 μ m.

Fig. 2 – Distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em cromossomos de *Diplacrum capitatum* (**a**, **b**), *Fimbristylis dichotoma* (**c**), *F. cymosa* (**d**), *Kyllinga brevifolia* (**e**, **f**) e *Eleocharis confervoides* (**g**). Observe sítios de DNAr 5S ligeiramente difusos na metáfase (**a**) e no núcleo interfásico (**b**). Insertos em **a** e **g** mostram sítios de DNAr 45S menores em maior ampliação. Cabeças de seta indicam os sítios de DNAr 5S, em **f**, e 45S em **d**. Barras em **e**, **f** e **g** correspondem a 10 μ m. Barra em **f** válida para todas as demais figuras, exceto **e** e **g**, que encontra-se em maior ampliação.

Fig. 3 – Idiogramas do complemento cromossômico haplóide de espécies de *Rhynchospora*, *Fimbristylis*, *Diplacrum* e *Eleocharis* mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde). Barra corresponde a 2 μ m.

Tabela 1. Números cromossômicos e número e posição dos sítios de DNAr 5S e 45S em 11 representantes da família Cyperaceae

Espécies	Número de herbário	Local de coleta	2n	Tamanho cromossômico (µm)	Número e posição* dos sítios de DNAr	
					5S	45S
<i>Diplacrum capitatum</i> (Willd.) Boeck.	————	Dois Irmãos-PE	36	1,5 - 1	2t	2t
<i>Eleocharis confervoides</i> (Poir.) Miq. [▪]	UFP 44895	Dois Irmãos-PE	40	1,8 - 1,2	2t	14t
<i>Fimbristylis cymosa</i> (Lam.) R. Br.	UFP 53283	Paiva-PE	50	1,4 - 0,9	2t	4t
<i>F. dichotoma</i> (L.) Vahl	UFP 52628	Campus UFPE-PE	30	2,7 - 1,9	2i e 2t	4t
<i>Kyllinga brevifolia</i> Rottb	UFP 52631	Campus UFPE-PE	~120	1,8 - 0,9	~10	~ 45
<i>Rhynchospora cephalotes</i> (L.) Vahl	UFP 60484	Dois Irmãos-PE	18, 19	2,5 - 1,7	2i	2t
<i>R. ciliata</i> (Vahl) Kükenth	UFP 60483	Campus UFPE-PE	10	4 - 3	2i	4t
<i>R. contracta</i> (Nees) Raynal	UFP 52629	Campus UFPE-PE	18	1,9 - 1,2	2i	2t
<i>R. holoschoenoides</i> (Rich.) Herter	UFP 53281	Paiva-PE	20	3,3 - 2,2	2i	6t
<i>R. pubera</i> (Vahl) Böckeler	UFP 60486	Dois Irmãos-PE	10	6,1 - 4	6-8i e 4t	6t
<i>R. tenuis</i> Link	UFP 12171	Porto de Galinhas-PE	4	4,7 - 3,6	2i	2t

* i, intersticial; t, terminal

[▪] Tratada anteriormente como *Websteria confervoides* (Poir.) S. S. Hooper

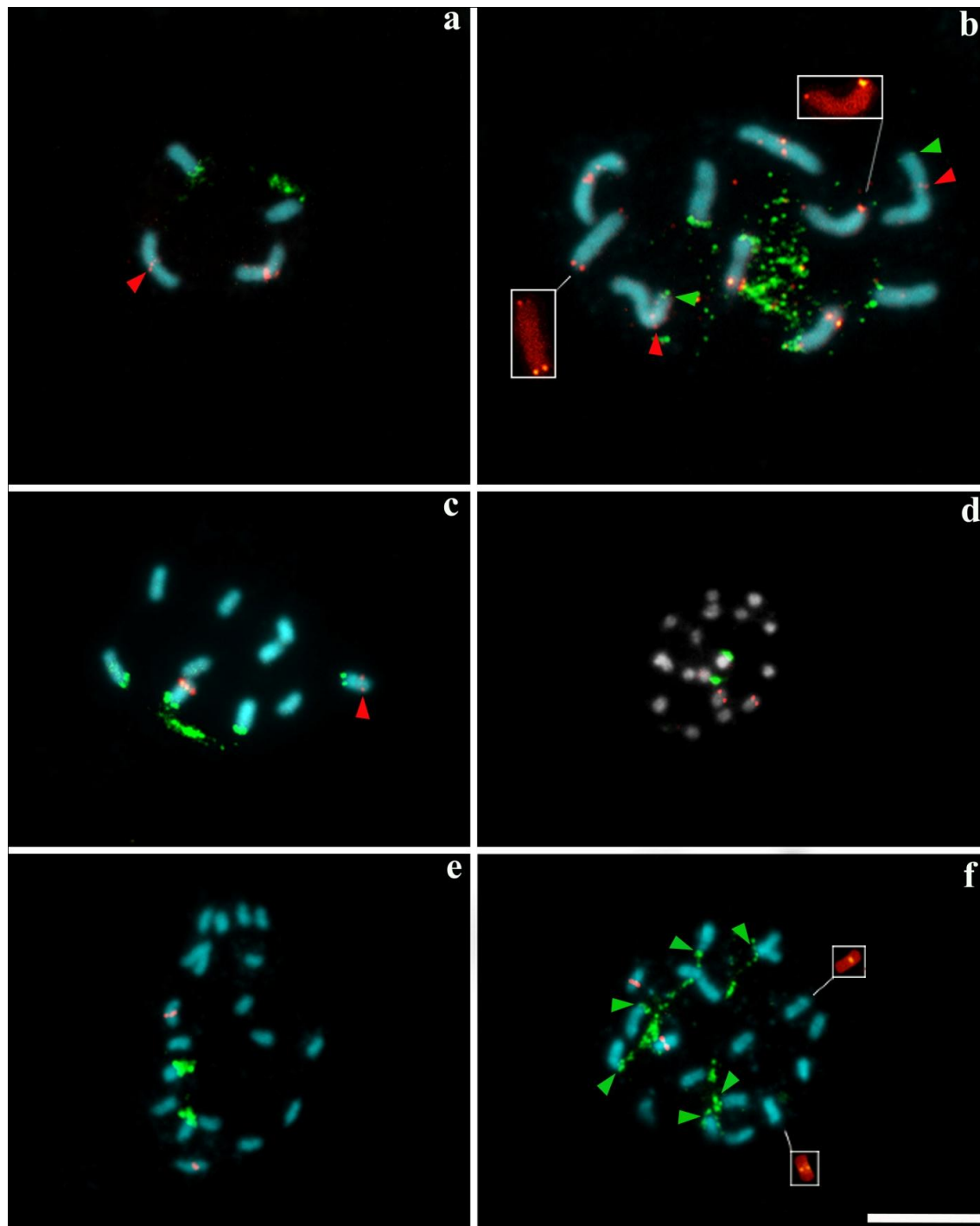


Fig. 1 – Distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em cromossomos de *Rhynchospora tenuis* (a), *R. pubera* (b), *R. ciliata* (c), *R. contracta* (d), *R. cephalotes* (e) e *R. holoschoenoides* (f). Insertos em b e f mostram sítios de DNAr 5S visto com o filtro Cy3, em maior contraste. Cabeças de seta vermelhas e verdes indicam, respectivamente, sítios de DNAr 5S e 45S menores. Barra em f corresponde a 10 μ m.

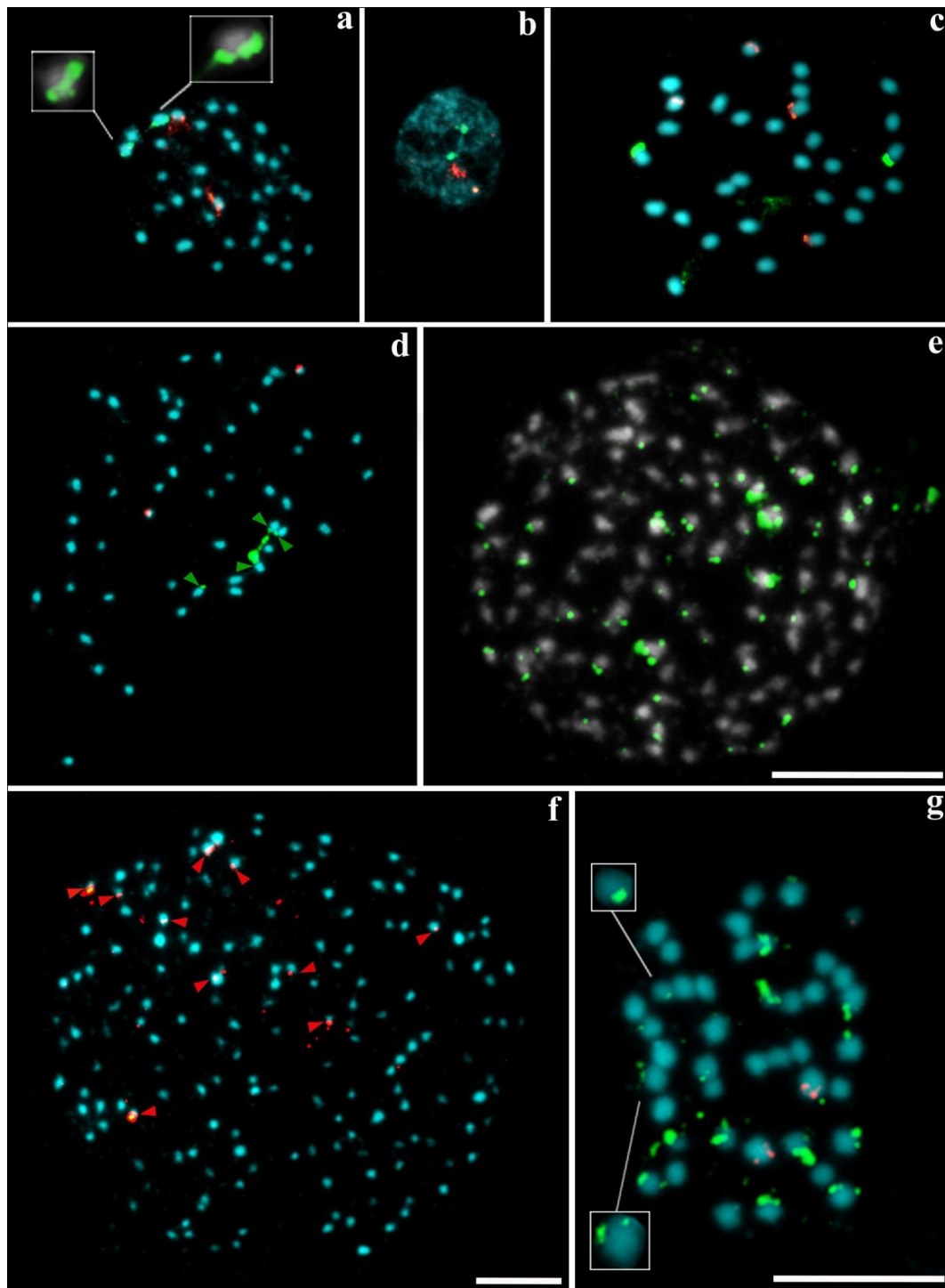


Fig. 2 – Distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) em cromossomos de *Diplacrum capitatum* (**a**, **b**), *Fimbristylis dichotoma* (**c**), *F. cymosa* (**d**), *Kyllinga brevifolia* (**e**, **f**) e *Eleocharis confervoides* (**g**). Observe sítios de DNAr 5S ligeiramente difusos na metáfase (**a**) e no núcleo interfásico (**b**). Insertos em **a** e **g** mostram sítios de DNAr 45S menores em maior ampliação. Cabeças de seta indicam os sítios de DNAr 5S, em **f**, e 45S em **d**. Barras em **e**, **f** e **g** correspondem a 10 μ m. Barra em **f** válida para todas as demais figuras, exceto **e** e **g**, que encontra-se em maior ampliação.

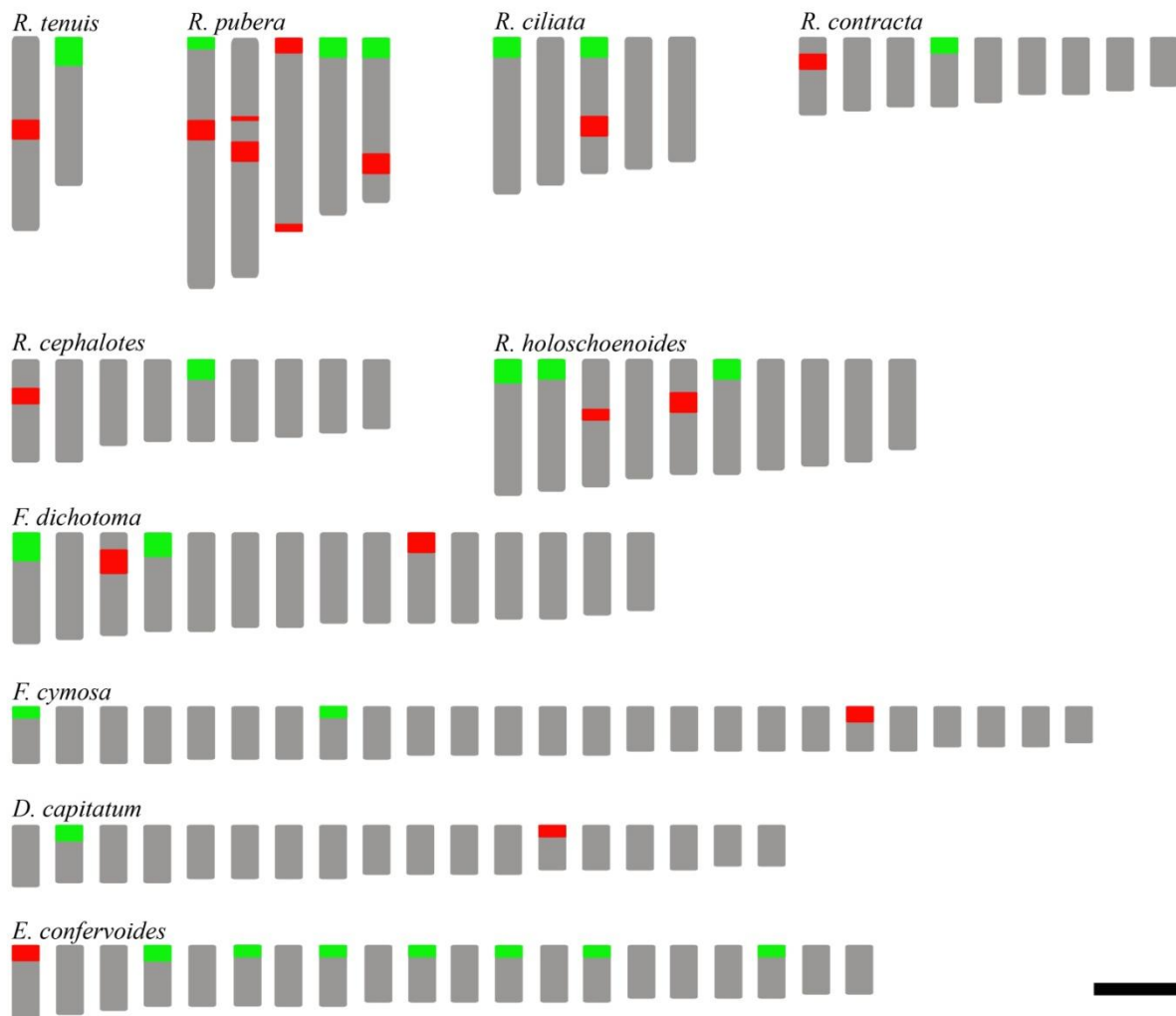


Fig. 3 – Idiogramas mostrando a distribuição dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde) no complemento cromossômico haplóide de espécies de *Rhynchospora*, *Fimbristylis*, *Diplacrum* e *Eleocharis*. Barra corresponde a 2 μm.

5. Conclusões

5. Conclusões

- Nas espécies aqui analisadas, os sítios de DNAr 45S mostraram uma distribuição preferencial nas regiões cromossômicas terminais, enquanto os sítios de DNAr 5S mostraram distribuição mais variável.
- Nas seis espécies de *Rhynchospora*, os sítios de DNAr 5S foram localizados preferencialmente na região intersticial, enquanto nos poucos representantes dos demais gêneros a distribuição foi fortemente concentrada nas regiões terminais.
- O número de sítios de DNAr 5S e 45S parece não guardar nenhuma relação com o número cromossômico ou com o nível de ploidia.
- A distribuição preferencialmente terminal dos sítios de DNAr 45S, observada tanto em plantas com cromossomos monocêntricos quanto nessas com cromossomos holocinéticos, sugere que essa distribuição não seja influenciada pela presença do centrômero, como sugerido na literatura.

5. Normas da revista *Micron*

Guidelines for Authors

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/475/authorinstructions#25000

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>. The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing; do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title. Concise and informative.** Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax

numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

- *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should consist of no more than 500 words and should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

✉ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For

color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "2010" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com>) and Reference Manager (<http://www.refman.com>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style

which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "*et al.*" and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).

Kramer *et al.* (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: ➡ <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: ➡ <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): ➡ <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: ➡ <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These

will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://epsupport.elsevier.com>.