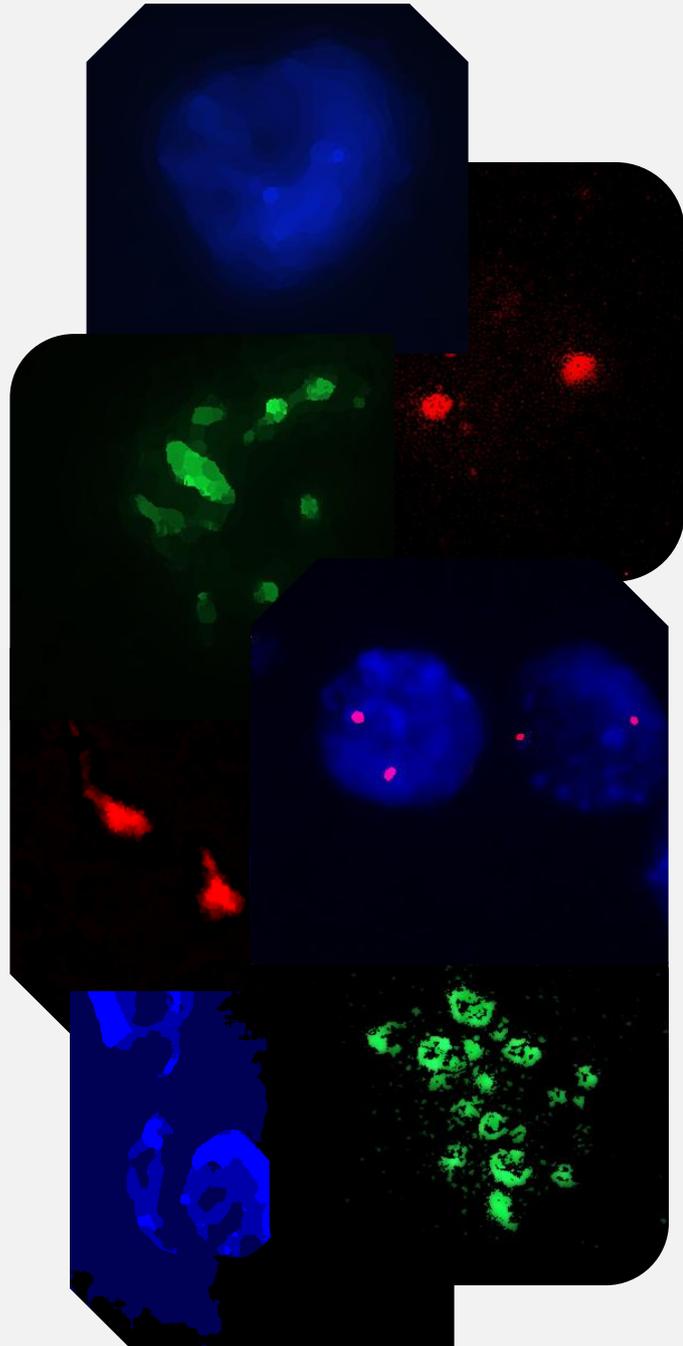


**“Estudo das alterações epigenéticas
induzidas por Stress Térmica em centeio”**



Projecto 2010

Biologia

ORIENTADORA: DOUTORA MANUELA SILVA

JOÃO MIGUEL RODRIGUES DA SILVA BRAZÃO

João

[Escrever o nome da empresa]

[Escolher a data]

21 DE JUNHO DE 2010

Agradecimentos

A Bolsa de integração à investigação lançou-me para uma longa e excelente experiência que se estendeu à disciplina de projecto e fecha agora um capítulo. Trabalhar na Secção de Genética contribui para um enorme crescimento académico e pessoal da minha pessoa, sendo indispensável deixar registado as pessoas que contribuíram e acompanharam a minha evolução.

Ao Centro de Botânica Aplicada à Agricultura e à Professora Wanda Viegas, estou muito grato pela possibilidade de ter desenvolvido todo este trabalho de investigação.

Sempre pronta, disponível, com recursos ilimitados e com uma grande atenciosidade deixo um enorme obrigado e um sentimento de admiração à Augusta por toda a ajuda e apoio que me deu.

À Diana, Miguel, Sofia, Róis e Edna agradeço por toda a boa companhia que foram e por todos os conhecimentos que transmitiram-me!

Sem poder deixar de lado, um muito obrigado aos restantes professores, investigadores e colegas da genética que contribuíram para a minha integração e bem-estar neste laboratório.

Sempre pronta para me ensinar e motivar em tudo que foi preciso, muito paciente com os prazos, sempre elogiadora do meu trabalho mas crítica, simpática, alegre e uma grande professora, são as referências que tenho da minha orientadora, Doutora Manuela Silva, a quem lhe deixo o maior obrigado de todos e a terei sempre como exemplo a seguir!

Índice

Sumário	Pág.1
Introdução	Pág.2
1. Estrutura da Cromatina	Pág.2
2. Cromatina Ribossomal	Pág.3
3. Cromatina Subtelomérica	Pág.4
4. Objectivo	Pág.4
Material e Métodos	Pág.5
Preparação do Material	Pág.5
Hibridação <i>in situ</i>	Pág.6
Observação e Análise	Pág.8
Resultados	Pág.9
Tratamento de Stresse de Alta Temperatura	Pág.9
Tratamento de Stresse de Baixa Temperatura	Pág.14
Discussão e Conclusão	Pág.17
Referências	Pág.20

Estudo das alterações epigenéticas induzidas por Stresse Térmico em centeio

Sumário

A modulação epigenética tem sido correlacionada com alterações de padrões de expressão em plantas como resposta a stresses ambientais. No entanto, a influência de stresses abióticos, particularmente de stresses térmicos, na organização da cromatina ainda é pouco conhecida. Deste modo, o objectivo deste trabalho foi estudar o efeito de stresses de altas e baixas temperaturas na conformação da cromatina em núcleos interfásicos de centeio utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente. Para isso, foram caracterizados os padrões de organização da cromatina ribossomal em núcleos interfásicos de ápices radiculares e de coleótilos de plântulas submetidas a alta temperatura (SAT, 4h a 40°C) e foram quantificados os sinais de *in situ* de sequências de rDNA e subteloméricas em núcleos de ápices radiculares de plântulas submetidas a stresse de baixa temperatura (24h a 4°C). Os resultados obtidos demonstram que o SAT induz descondensação da cromatina ribossomal, efeito que pode estar correlacionado com o potencial de transcrição necessário ao ajuste provocado pela exposição a altas temperaturas. Por outro lado, o tratamento de baixa temperatura induz a compactação da cromatina ribossomal e subtelomérica. Estes resultados sublinham o papel da remodelação da cromatina na resposta das plantas a condições de stresse.

Introdução

Acompanhando a evolução do ser humano, as plantas têm ocupado sempre um lugar de destaque, com utilizações que vão desde a utilização das suas propriedades medicinais até ao propósito mais básico, a alimentação. O seu conhecimento tem assumido uma enorme importância no desenvolvimento das civilizações, tendo sido sempre objecto de estudo e investigação. Devido à sua forte componente sócio-económica, os cereais são das espécies mais estudadas em situações de campo e em laboratório, sendo o centeio uma das principais espécies modelo (Baier, 1994). O centeio é uma gramínea aparentada da cevada e do trigo, pertencente à tribo *Triticeae*. É cultivado em grande escala para colheita dos seus grãos e forragem, apresentando uma forte resistência a solos ácidos e climas secos ou frios.

Para o sucesso das plantas cultivadas, vários parâmetros têm que ser considerados, como a luz, oxigénio, dióxido de carbono, azoto, nutrientes, água e temperatura. Alterações destes parâmetros podem provocar condições de stresse nas plantas, induzindo respostas específicas. Estas respostas envolvem a modulação da expressão génica, decisiva para a adaptação da planta, podendo alterar a conformação da cromatina (Chinnusamy & Zhu, 2009).

1. Estrutura da Cromatina

A cromatina corresponde à associação de DNA e proteínas, sendo composta por distintas fracções que se podem observar citologicamente: heterocromatina, fracção que permanece condensada durante todo o ciclo celular, e eucromatina, caracterizada por uma maior descondensação, associada principalmente às regiões ricas em genes do genoma (Redi *et al.*, 2001; Avramova, 2002). A heterocromatina é maioritariamente composta por sequências repetitivas que podem estar agrupadas em pequenas ilhas e diferencia-se em heterocromatina constitutiva, a qual permanece sempre condensada em todas as células de um organismo, e facultativa, que apenas permanece condensada em determinados tipos celulares (Kunze *et al.*, 1996; Weichenhan *et al.*, 1998; Avramova, 2002).

A conformação da cromatina e o nível de transcrição são regulados por factores epigenéticos, maioritariamente associados a modificações das histonas e metilação do DNA. As sequências associadas a heterocromatina transcripcionalmente inactivas encontram-se normalmente hipermetiladas nos resíduos de citosina. Em *Arabidopsis*, o mapeamento de citosinas metiladas revela um aumento no nível de metilação de regiões eucromaticas para regiões pericentroméricas heterocromaticas. Modificações pós-translacionais das histonas, tais como, acetilação, fosforilação e ubiquitinação estão normalmente associadas a actividade transcripcional, enquanto a biotinylation e sumoilação estão preferencialmente associadas a repressão génica. A trimetilação da histona H3K4 está relacionada com a actividade transcripcional, enquanto a dimetilação da histona H3K9 está usualmente associada à inibição da transcrição. Deste modo, como já destacado em vários estudos, as

modificações das histonas estão frequentemente associadas ao nível de transcrição (Chinnusamy & Zhu, 2009).

2. Cromatina Ribossomal

O RNA ribossomal, um dos principais constituintes dos ribossomas, é codificado em regiões específicas do genoma. De acordo com o coeficiente de Svedberg, os rRNAs são designados por 5S, 5.8S, 18S e 25S (em plantas). Os 5.8S, 18S e 25S rRNAs resultam da remoção dos intrões (splicing) de uma sequência única transcrita 45S, codificada pelos genes ribossomais

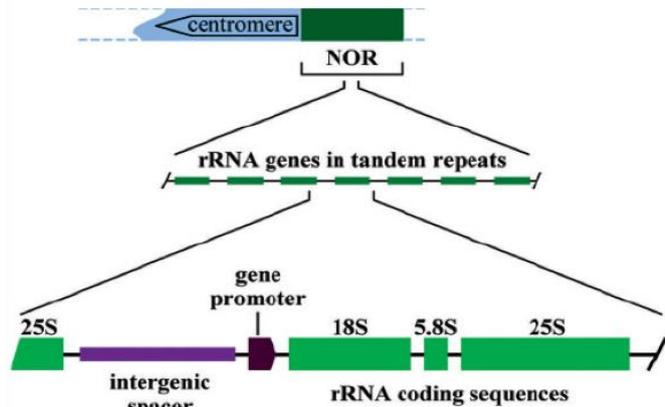


Fig.1 - Organização das unidades de rDNA nos NORs (adaptado de Neves *et al.*, 2005.)

agrupado nos NORs (Nucleolar Organizer Region) (Fig.1) (Sumner, 1990; Pederson & Politz, 2000; Helsop-Harrison, 2000). O fragmento rRNA 5S resulta da transcrição de genes localizados noutras regiões do genoma. Por uma questão prática e de utilização na literatura, rDNA refere-se apenas às sequências que codificam para o rRNA 45S. As sequências de rDNA encontram-se agrupadas em repetições dispostas em tandem que podem atingir vários Mpb de comprimento e possuem sequências intergênicas não transcritas situadas entre sequências codificantes de unidades de rDNA adjacentes (McClintock, 1934; revisão em Pikaard, 2002). A transcrição do 45S rRNA leva à formação do nucléolo em interfase, sendo os fragmentos 5S transcritos noutras locais do genoma e importados para o nucléolo, onde são produzidas as subunidades pré-ribossomais. No final da profase, os nucléolos desaparecem devido à interrupção da transcrição durante a mitose. No entanto, o resultado da actividade dos NORs pode ser visualizado na metáfase seguinte como constrição secundária (McClintock, 1934), reflectindo o nível de descondensação de rDNA durante a interfase antecedente que permitiu a transcrição (Jimenez *et al.*, 1988).

O número de cópias de genes ribossomais em células vegetais é muito elevado quando comparado com células animais (González-Melendi *et al.*, 2001). No entanto, a quantidade de genes activos no nucléolo é semelhante em ambos os tipos de células. Na maioria das plantas, apenas uma pequena percentagem de genes ribossomais estão a ser transcritos activamente, como já foi demonstrado em *Pisum Sativum*, em que apenas 5% das unidades são transcritas (González-Melendi *et al.*, 2001). Consequentemente, uma pequena fracção de genes ribossomais de um único *locus* parece ser suficiente para suportar toda a maquinaria ribossomal, sugerindo que a maioria do DNA ribossomal permanece transcripcionalmente silenciado (Caperta *et al.*, 2002). Além disso, normalmente os NORs homólogos têm um comportamento similar na expressão, ou são ambos transcritos ou silenciados (Zurita *et al.*, 1999).

Em várias espécies, a inativação de DNA ribossomal parece estar associada à condensação da cromatina. Utilizando a técnica de hibridação *in situ* usando uma sonda específica para rDNA em núcleos de cereais, observaram-se blocos densos de cromatina na periferia da área nucleolar (localização perinuclear) que correspondiam à fracção condensada de rDNA (Leitch *et al.*, 1992; Delgado *et al.*, 1995; Shaw & Jordan, 1995; Morais-Cecílio *et al.*, 2000; Pontes *et al.*, 2003). Como demonstrado em *Pisum sativum*, os blocos perinucleolares podem descondensar, estando esta alteração correlacionada com o aumento do volume nucleolar (Shaw *et al.*, 1993). Resultados recentes, de detecção da incorporação de BrUTP, reforçam a ideia de que a condensação interfásica dos blocos perinucleolares de rDNA está claramente associada ao silenciamento dos genes de rRNA (Silva *et al.*, 2008). Estas observações estão de acordo com o modelo de organização da cromatina ribossomal, sugerindo que a condensação de parte dos genes de rRNA leva à diminuição da acessibilidade da maquinaria de transcrição e conseqüente silenciamento, enquanto a outra fracção é activamente transcrita (Leitch *et al.*, 1992; Morais-Cecílio *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2008).

O genoma de centeio é caracterizado por setes pares de cromossomas, estando os genes ribossomais localizados em apenas um par de cromossomas (par 1R). Foi mostrado por marcação sequencial de prata e hibridação *in situ* que em centeio os blocos de rDNA não transcritos residem no domínio centromérico proximal do NOR, encontrando-se a região telomérica do NOR descondensada e transcripcionalmente activa no interior do nucléolo (Caperta *et al.*, 2002).

3. Cromatina Subtelomérica

As várias regiões heterocromáticas de cromossomas de centeio dividem-se em famílias organizadas em sequências tandem de DNA (Bedbrook *et al.* 1980, Appels *et al.* 1981, McIntyre *et al.*, 1990). Dessas famílias, podemos destacar a família da sequência subtelomérica pSc200 que corresponde a 2.5% do genoma de centeio (Vershinin *et al.*, 1995). As sequências repetitivas de pSc200 estão organizadas em dímeros que resultam de associações de monómeros com orientação cabeça-cauda, podendo igualmente encontrar-se dímeros com a orientação cabeça-cabeça ou cauda-cauda (Vershinin *et al.*, 1995). As sequências de pSc200 estão localizadas em bandas na região próximas da parte final do braço dos cromossomas, designadas por bandas C-heterocromaticas (Vershinin *et al.*, 1996).

4. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo caracterizar as alterações na cromatina induzidas por stresses térmicos, nomeadamente: alterações da cromatina ribossomal em núcleos interfásicos de ápices radiculares e de coleótilos expostos a tratamento de alta temperatura; e alterações da conformação de regiões ribossomais e sequências subteloméricas em núcleos interfásicos de ápices radiculares expostos a tratamento de baixa temperatura. A referida caracterização foi realizada através da técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH), usando sondas de rDNA e a sonda pSc200.

Material e Métodos

Tendo como objectivo a avaliação citogenética da influência de condições de stresse térmico na organização da cromatina, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente em núcleos interfásicos da ápices radiculares e de coleótilos de plântulas de centeio.

O material utilizado incluiu duas linhas isogénicas de centeio (*Secale cereale*, genoma RR, $2n=2x=14$): “Imperial” e uma linha fornecida pelo Prof. Neil Jones (Aberystwyth University).

Preparação do Material - Germinação e Tratamentos

Os esfregaços de ápices e coleótilos de centeio foram obtidos através do procedimento adaptado do previamente descrito por Schwarzacher&Heslop-Harrison (2000):

- As sementes foram colocadas em caixas de petri com papel de filtro saturado em água destilada e mantidas a 4°C no escuro durante 3 dias, de modo a sincronizar a germinação;
- De seguida as plântulas foram expostas aos seguintes tratamentos:

Linha de centeio	Condições e duração de crescimento		Choque térmico*
Centeio Imperial Stresse de alta temperatura e controlo**	3 dias		SAT – Rampa de aumento de temperatura até atingir os 40°C e permanência por 4 horas
	16 horas –Dia 22°C	8 horas – Escuro 15°C	
Centeio linha de Aberystwyth Stresse de baixa temperatura e controlo**	10 dias		SBT – permanência 24 horas a 4°C
	16 horas - Dia 22°C	8 horas – Escuro 15°C	

**As plântulas controlo foram mantidas a 16 horas – dia a 22°C, 8 horas – escuro a 15°C durante o período de choque térmico.

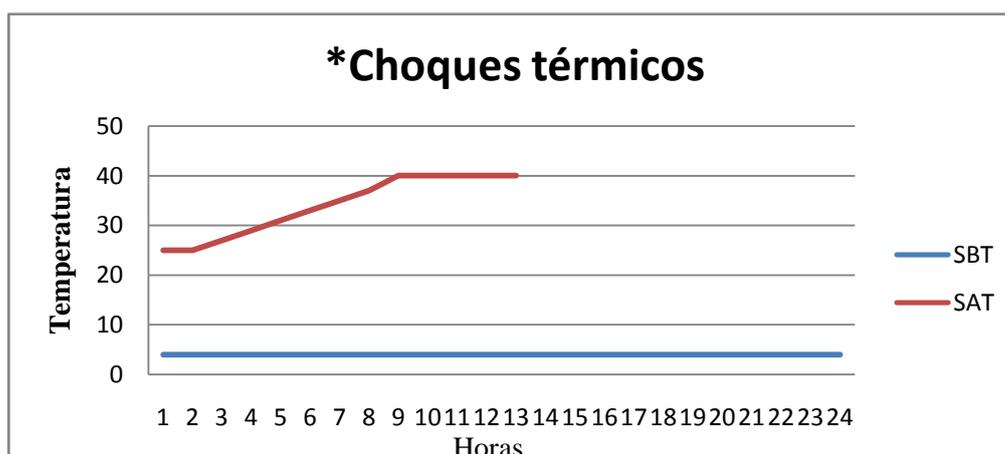


Gráfico 1 – Tratamentos de choque térmico: SAT – Stresse de Alta Temperatura, SBT – Stresse de Baixa Temperatura.

- Após este período, os tecidos controlo e com tratamento de ápices radiculares e coleóptilo foram fixados em etanol: ácido acético (3:1 vol/vol) durante 16 horas à temperatura ambiente com agitação e renovação da solução cerca de 4 a 5 vezes durante esse período. Por fim, o fixador foi novamente renovado e o material foi armazenado a -20°C. Parte dos ápices controlo foram também sujeitos a um tratamento em gelo fundente anterior à fixação, sendo imersos em água durante 24 horas, tratamento que teve como objectivo produzir c-metáfase;
- Imediatamente antes da realização dos esfregaços, os ápices radiculares e coleóptilos foram lavados 2x 10 minutos em 2-5ml de Tampão Enzimático (TE)*, para remover o fixador, e foram posteriormente digeridos com Solução Enzimática (SE)* a 37°C, por um período de 90 a 120 minutos;
- Cada ápice ou coleóptilo foi dissecado individualmente numa lâmina com ácido acético a 65% para dispersar as células; a lamela foi aplicada e de seguida retirou-se o excesso de líquido com papel de filtro e foi exercida pressão através de uma agulha histológica de modo a dispersar o material;
- Cada lâmina foi verificada em microscópio de contraste de fase e as lâminas seleccionadas foram expostas a CO₂ comprimido por forma a remover a lamela do esfregaço.

Hibridação *in situ*

A técnica de fluorescência em hibridação *in situ* foi adaptada de Schwarzacher & Heslop-Harrison (2000):

- Os esfregaços seleccionados foram enumerados e posteriormente tratados com 200 µl de solução 1:75 pepsina/0,01 M HCl cobertos com uma lamela de plástico por 10 minutos a 37°C em câmara húmida;
- Após lavagem 3x 5 minutos em 2xSSC*, as lâminas foram tratadas com 200 µl de uma solução de 1:100 de RNAase (Ribonuclease A, R-9134, Sigma) em 2xSSC cobertas com uma lamela de plástico por 60 minutos a 37°C em câmara húmida;
- Após novas lavagens 3x 5 minutos com 2xSSC, as lâminas foram desidratadas em etanol a 70% durante 3 minutos, seguido de etanol a 100% durante 3 minutos e finalmente secas ao ar por um período mínimo de 30 minutos;

* Tampão Enzimático (10x): 40 ml 100 mM ácido cítrico + 60 ml 100 mM tri-sódio-citrato (10x stock, ajustado para pH4.8). Armazenado em solução stock a 4 °C. (para solução de trabalho diluir 1:10 em água).

Solução Enzimática: mistura de 1.8% (w/v) de celulase de *Aspergillus niger* (Calbiochem, 21947, 4000unidades/g; concentração final: 80 unidades/ml), 0.2% 'Onozuka' RS celulase (5000 unidades/g, concentração final de 10unidades/ml), e 3% (v/v) pectinase de *Aspergillus niger* (solução em 40% glicerol, Sigma P4716, 450unidades/ml; concentração final de 13.5unidades/ml). Produzido em 1x tampão de enzima. Armazenado em aliquotas a -20°C.

2x SSC: diluído do stock 20x SSC. (20x SSC consiste em 3M de cloreto de sódio e 300mM de citrato de trisódio)

RNase 10 mg/ml: solução de DNase-freeribonuclease A (Sigma R4642, 70 unidades/mg) em 10 mM Tris-HCl, pH 8. Armazenada a -20 °C em aliquotas.

- A solução de hibridação foi obtida através da seguinte mistura:

Reagentes		Concentração final/quantidade na mistura de hibridação	Quantidade por Lâmina
100% Formamida		50%	20 µl
20x SSC		2x	2 µl
50% Sulfato de Dextrano		10%	8 µl
Esperma de Salmão DNA 1µg/µl		1µg	1 µl
Sondas*	Biotina		2-6µl
	Digoxigenina	5%	2 µl
10% SDS		0.125%	0.5 µl
Água esterilizada			Até atingir o volume final
Total			40µl

*Sondas marcadas com biotina (Bio): pTa71, um fragmento de 9 Kb de EcoRI de rDNA de trigo (*Triticum aestivum*), contendo o 5.8S, o 18S, 25S e a região intergênica não transcrita (Gerlach e Bedbrook, 1979), fornecido pela departamento de Genética (2 µl por lâmina); e a sonda rDNA 18S/25S, que resultou da amplificação de três fragmentos distintos do plasmídeo pTa71, dois fragmentos localizados no 25S (com 1043bp e 1186bp) e um fragmento localizado no 18S (com 880bp) (Fig. 2). Estes fragmentos foram obtidos de reacções de amplificação independentes, usando os seguintes primers: 25S1for CTTAGTAACGGCGAGCGAAC e 25S1rev CACTTGGAGCTCTCGATTCC; 25S2forAACTCACCTGCCGAATCAAC e 25S2rev GCCGAAGCTCCCACTTATC; e 18Sfor ACTGTGAAACTGCGAATGG e 18SrevCCCGACTGTCCCTGTTAATC e foram utilizados 3 µl por lâmina, de numa proporção de 1:1:1 de cada fragmento).

Sonda marcada com digoxigenina (Dig): pSc200: sequência subtelo mérica específica de *S. cereale* (Vershinin et al., 1995) amplificada por PCR utilizando os primers pSc200for TCTTTGATCACCGTTTCTTCG e pSc200rev CCCACCCATGTATGGATAA.

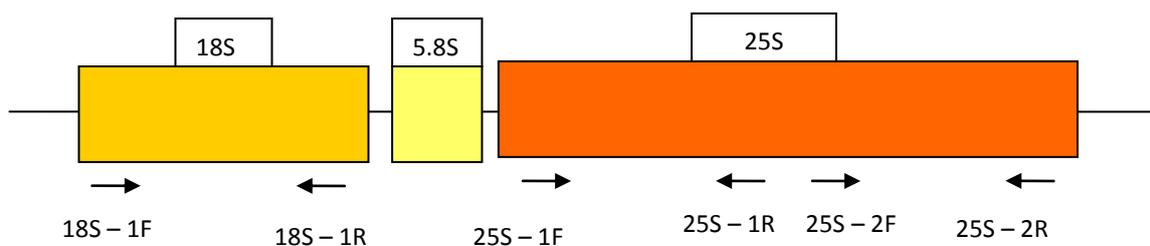


Figura 2. – Representação esquemática da sonda 18S/25S rDNA: fragmentos 18S, 25S1 e 25S2.

- A mistura de hibridação foi desnaturada a 100°C durante 10 minutos num banho de água fervente e imediatamente incubada em gelo por 5 minutos; após a desnaturação, foram aplicados 40 µl a cada lâmina, sendo cobertas com lamelas de plástico;
- De seguida, todas as lâminas foram colocadas num Termociclador programado para um aumento de temperatura gradual até 77,5°C, mantendo-se por 5 minutos a esta temperatura, seguindo-se de uma diminuição gradual da temperatura até atingir os 37°C. As lâminas foram então mantidas em câmara húmida a 37°C durante a noite;
- As lavagens pós-hibridação ocorreram pela seguinte ordem: 2xSSC por 3 minutos a 42°C, formamida 20% em 0.1xSSC por 10 minutos a 42°C, 2xSSC por 2x 5 minutos a 42°C; 2xSSC por 2x 5 minutos a temperatura ambiente e 4xSSC/tween (0.2%)* por 2x 5 minutos a temperatura ambiente;
- Após as lavagens, as lâminas foram bloqueadas com uma solução de BSA* 5% em 4xSSC/Tween, cobertas com uma lamela de plástico, por 5 minutos à temperatura ambiente;
- A detecção foi realizada através da adição de 50 µl por lâmina de uma mistura de streptavidina-Cy3(1/200 de fluorocromo vermelho) e anti-digoxigenina-FITC (1/25, fluorocromo verde) em BSA 5% em 4xSSC/tween, cobertas com lamelas de plástico e colocadas em câmara húmida a 37°C durante uma hora;
- Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em 4xSSC/Tween por 3x 5 minutos;
- Para finalizar, o DNA foi corado com DAPI* (15 µl/lâmina) e cada lâmina coberta com uma lamela de vidro, sendo as lâminas guardadas no escuro a 4°C durante a noite;
- Os esfregaços foram observados em um microscópio de epifluorescência (LeitzBiomed), usando-se os filtros adequados para visualizar DNA marcado com DAPI a azul, sinais de rDNA a vermelho e as regiões subteloméricas a verde.

Observação e Análise

A avaliação da organização de rDNA em tratamento de alta temperatura e controlo foi realizada em 3 lâminas por cada tecido e material, sendo considerados aproximadamente 50 núcleos por cada lâmina. A avaliação baseou-se na observação e contagem de núcleos, de acordo com diferentes padrões de organização de rDNA, tendo sido igualmente determinada a média de sinais *in situ*. A análise estatística dos parâmetros descritos foi efectuada utilizando o teste χ^2 e o teste T-Student, respectivamente.

A análise e avaliação do padrão de organização dos núcleos expostos a tratamento de baixa temperatura consistiram numa quantificação da área correspondente aos sinais *in situ* das sondas ribossomal e pSc200 utilizando o software ImageJ. Esta avaliação foi efectuada em três lâminas por cada tratamento, tendo sido fotografados aproximadamente 10 núcleos em cada lâmina. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o teste T-Student.

*4x SSC/ Tween (Tampão de detecção): 4x SSC (diluído de 20x SSC) contendo 0.2% (v/v) Tween 20

BSA - Albumina de Soro de Bovino (Sigma B-8894)

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma). Preparar a solução stock de DAPI através de 100 µg/ml em água

Resultados

O recurso à hibridação *in situ* fluorescente (FISH) permitiu efectuar a caracterização dos padrões de organização de rDNA 45S e de regiões subteloméricas em núcleos interfásicos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas de centeio expostas a diferentes tratamentos térmicos: stresse de alta temperatura (SAT, 4h 40°C) ou stresse de baixa temperatura (SBT, 24h 4°C).

A técnica FISH foi realizada usando duas sondas de rDNA e a sonda pSc200 descritas anteriormente em Material e Métodos:

- pTa71: 9kb um fragmento EcoRI que corresponde a toda a unidade de rDNA de trigo (*Triticum aestivum*), contendo os genes que codificam para o transcrito primário 45S e a região intergénica não-transcrita (Gerlach e Bedbrook, 1979);
- Uma sonda designada como rDNA 18S/25S, que corresponde à amplificação de três fragmentos distintos de rDNA do plasmídeo pTa71: dois fragmentos localizados no 25S e um fragmento localizado no 18S, que foram usados numa mistura com a proporção 1:1:1.
- pSc200: sequência subtelomérica específica de *S. cereale* (Vershinin et al., 1995) amplificada por PCR.

Ambas as sondas ribossomais foram testadas em c-metafases de ápices radiculares tratadas com gelo, não tendo sido detectadas diferenças entre os sinais obtidos. Deste modo, as duas sondas foram usadas para avaliar a organização da cromatina ribossomal em núcleos interfásicos.

1. Tratamento de Stresse de Alta Temperatura

Na avaliação da organização do rDNA foram utilizadas pelo menos 3 lâminas por cada tratamento / órgão e foram analisados aproximadamente 50 núcleos por lâmina.

Considerando os padrões de organização de rDNA, os núcleos interfásicos analisados foram classificados como:

- Condensados (cond) – núcleos com dois blocos de rDNA;
- Descondensados (descond) – núcleos com mais de dois blocos, com sinais de rDNA descondensados ou com descondensações lineares nos sinais de *in situ*.

Complementarmente, foram determinados os números médios de sinais *in situ* de rDNA por núcleo.

Núcleos interfásicos de ápices radiculares

Dos 170 núcleos interfásicos de ápices radiculares de centeio controlo (Tabela 1), 66,5% apresentam um padrão de organização condensado e 33,5% correspondem a um padrão descondensado. Os núcleos condensados apresentam dois blocos de rDNA com forma e dimensão semelhantes (Fig.3, **a** e **b**). Os núcleos classificados como descondensados correspondem maioritariamente a núcleos com blocos irregulares e menos compactos e com mais de dois blocos. O número médio de sinais de rDNA obtido em controlo foi de 2,12.

Tabela 1. Núcleos interfásicos de ápice radiculares						
	Controlo		Controlo Gelo		SAT (4h 40°C)	
Núcleos interfásicos apresentando diferentes padrões de organização de rDNA						
	cond	Descond	cond	descond	cond	descond
Número	113	57	71	40	36	131
Frequência	66,5%	33,5%	64,0%	36,0%	21,6%	78,4%
Número total	170		139		167	
p - Teste Chi²			0,646496421		1,03139E-16	
Número médio de blocos de rDNA / núcleo						
Média	2,12		2,14		2,38	
Desvio Padrão	0,43		0,38		0,71	
p – Teste T-student			0,698845687		3,01456E-05	

Dos 167 núcleos interfásicos analisados de plantas sujeitas a tratamento de alta temperatura (Tabela 1), apenas 21,6% apresentam padrão condensados e 74,8% apresentam padrão descondensado. O fenótipo descondensado abrange vários estados de organização: (i) núcleos com blocos de rDNA com textura e forma irregular (Fig.3, **c** e **d**); (ii) núcleos onde a descondensação dos blocos é observada como uma cauda bem destacada proveniente destes (Fig.3, **e** e **f**); e (iii) núcleos com mais de dois sinais *in situ* (Fig.3, **g** e **h**), correspondendo este fenótipo a quase metade dos núcleos analisados. O número médio de blocos de rDNA por núcleo corresponde a 2,38, sendo o número máximo de blocos observado por núcleo de 5.

Na análise estatística, através do teste do Chi², revelou existirem diferenças significativas entre as distribuições de frequências obtidas em controlo e em núcleos SAT (p=1.031E-16). Além disso, o teste T-Student também demonstrou existir diferenças significativas entre o número médio de sinais de rDNA em núcleos controlo e em núcleos SAT (p=3.015E-05).

Os núcleos interfásicos de ápice radiculares expostos a tratamento de gelo também foram analisados (Tabela 1). A análise estatística não revelou diferenças significativas tanto no que diz respeito à média de blocos por núcleo, como relativamente à distribuição de núcleos apresentando diferentes padrões de organização do rDNA. A observação de 139 núcleos interfásicos de ápices radiculares tratados com gelo revelou que 64,0% apresenta um padrão de organização condensado enquanto a restante percentagem apresenta um padrão descondensado. A média de blocos de rDNA foi de 2,14.

Núcleos interfásicos de Coleóptilos

Foram analisados 180 núcleos interfásicos de coleóptilos de plântulas controlo (Tabela 2), dos quais 66,5% apresentaram um padrão condensado e os restantes 33,5% apresentaram um padrão de organização descondensado. Os blocos de rDNA condensados são semelhantes aos observados em núcleos interfásicos de ápice radiculares controlo, embora em ápices radiculares controlo os blocos pareçam ser comparativamente mais compactados (Fig.3 i e j). Os núcleos com padrão descondensados apresentaram descondensações óbvias e núcleos com mais de dois blocos. No entanto, a classe de núcleos com mais de dois blocos assume menor expressão em coleóptilo quando comparados com os núcleos interfásicos controlo de ápices radiculares. A média de blocos rDNA obtida foi de 2,05 por núcleo.

Tabela 2. Núcleos interfásicos de Coleóptilo				
	Controlo		SAT (4h 40°C)	
Núcleos interfásicos apresentando diferentes padrões de organização de rDNA				
	cond	descond	cond	descond
Número	112	68	31	95
Frequência	66,5%	33,5%	24,6%	75,4%
Número total	180		126	
p - Teste Chi²			8,52972E-11	
Número médio de blocos de rDNA / núcleo				
Média	2,05		2,06	
Desvio Padrão	0,22		0,24	
p – teste T-student			0,620594577	

Em relação aos núcleos interfásicos de coleóptilo expostos a tratamento de alta temperatura, foram analisados 126 núcleos, sendo que 24,6% apresentam um padrão condensado, enquanto 75,4% apresentaram um padrão descondensado. Contrariamente ao observado em núcleos de ápice radiculares, os blocos de rDNA dos núcleos descondensados SAT de coleóptilo apresentam uma dimensão maior, uma textura granular e uma menor frequência de núcleos com mais de dois blocos de

rDNA (Fig.3, **l** e **m**). Esta frequência menor é exposta no cálculo do número médio de blocos por núcleo, o qual foi de 2,06 blocos por núcleo, não revelando diferenças significativas relativamente a núcleos interfásicos controle de coleóptilos.

Assim como observado em núcleos de ápices radiculares, a análise estatística da frequência de núcleos controle e SAT de coleóptilo revelou existir diferenças significativas entre as duas situações ($p=8,529E-11$). No entanto, a análise pelo teste T-student não revelou diferenças significativas entre a média de blocos de rDNA de núcleos interfásicos controle e núcleos SAT ($p=0,621$).

A comparação entre núcleos interfásicos de ápice radiculares e de coleóptilo, controle e SAT não revelaram diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3. Ápices radiculares vs. Coleóptilo		
	Controlo	SAT (4h 40°C)
Núcleos interfásicos apresentando diferentes padrões de organização de rDNA		
	Controlo	SAT
p - Teste Chi²	0,403377298	0,521616251
Número médio de blocos de rDNA / núcleo		
	Controlo	SAT
p – Teste T-student	0,024361253	9,3125E-08

Figura 3 – Núcleos interfásicos SAT e controlo

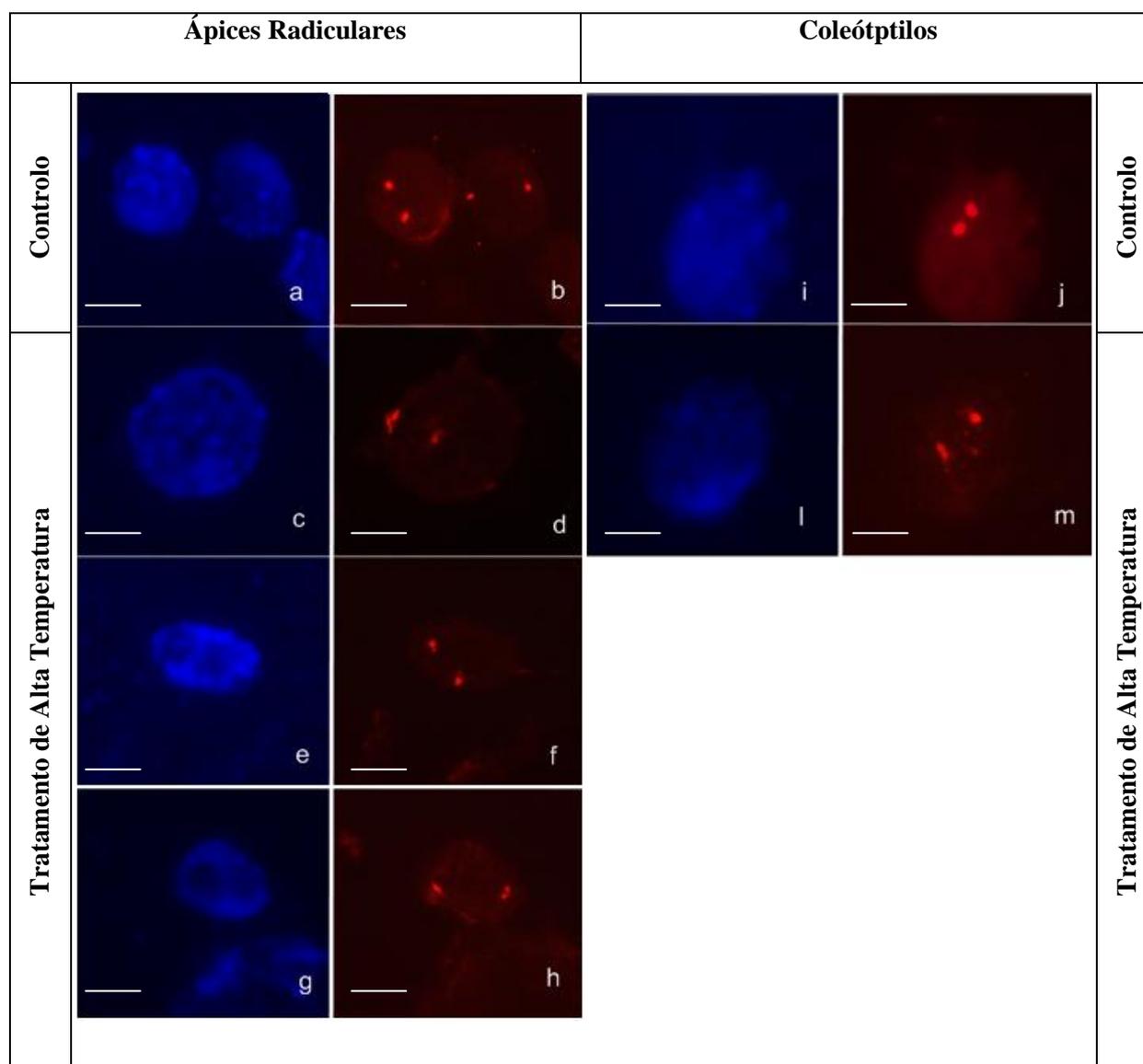


Figura 3

a,b - Núcleos interfásicos de ápices radiculares controlo; DAPI (azul) e sonda rRNA 18S/25S (vermelho) Bar, 5 μ m.

c, d, e, f, g, h - Núcleos interfásicos de ápices radiculares SAT; DAPI (azul) e sonda rRNA 18S/25S (vermelho) Bar, 5 μ m.

i, j - Núcleos interfásicos de coleóptilos controlo; DAPI (azul) e sonda rRNA 18S/25S (vermelho) Bar, 5 μ m.

k, l, m, n - Núcleos interfásicos de coleóptilos SAT; DAPI (azul) e sonda rRNA 18S/25S (vermelho) Bar, 5 μ m.

2. Tratamento de Stresse de Baixa Temperatura

A análise do efeito de stresse de baixa temperatura na organização da cromatina ribossomal e de pSc200 foi efectuada em núcleos interfásicos de ápices radiculares utilizando a técnica FISH com a sonda rDNA 18S/25S e a sonda pSc200 descritas anteriormente em Material e Métodos.

A obtenção de resultados foi realizada através da quantificação dos sinais DAPI, pSc200 e rDNA em imagens de núcleos interfásicos de ápices radiculares de centeio utilizando software ImageJ. Para esta quantificação foram fotografados aproximadamente 10 núcleos por lâmina de cada uma de três lâminas de controlo e três lâminas de ápices radiculares tratados. O programa ImageJ foi utilizado para quantificar a área de sinais de *in situ* de rDNA e pSc200, tendo sido também calculada a razão entre essas áreas e a área total de cada núcleo (DAPI).

Núcleos interfásicos – rDNA

Na análise da área de rDNA em núcleos interfásicos foram observados 33 núcleos controlo e 32 núcleos expostos a tratamento de frio (Tabela 4). Nos primeiros obteve-se uma área total média de sinal de rDNA por núcleo de $4,039 \mu\text{m}^2$ e um valor médio da razão rDNA/DAPI de 2,46% (Fig.4, **a** e **b**). Em núcleos interfásicos SBT, a média da razão rDNA/DAPI foi 1,98% e a média da área de sinais de rDNA foi de $3,270 \mu\text{m}^2$ (Fig.4, **d** e **e**).

A análise estatística utilizando o teste T-Student, revelou existirem diferenças significativas entre a área média dos sinais de rDNA de núcleos controlo e núcleos SBT ($p=8,59\text{E}-04$) e demonstrou que os valores obtidos para as médias das razões (rDNA/DAPI) em controlo e em SBT apresentam diferenças significativas ($p=1,65\text{E}-05$). Todos os núcleos apresentaram dois blocos, não expondo assim diferença significativa.

Tabela.4 Núcleos interfásicos de ápices radiculares					
Núcleos interfásicos apresentando diferentes padrões de organização de rDNA					
	DAPI	rDNA			Total de Núcleos
	Área média +- Desvio Padrão (μm^2)	Área média +- Desvio Padrão (μm^2)	Número médio de Blocos +- Desvio Padrão	rDNA/DAPI +- Desvio Padrão x100%	Número Total
Controlo	165 +- 42,7	4,039 +- 1,008	2,00 +- 0	2.46 +-0,49	36,00
SBT (24h 4°C)	163,5+-33,8	3,270+-1,1149	2,00 +- 0	1,98+-0,57	32,00
p- Teste T-Student	0,818403	0,000859		1,65E-05	

Núcleos interfásicos – pSc200

Relativamente à quantificação e análise de sinais *in situ* de pSc200, foram observados 35 núcleos interfásicos controlo e 32 núcleos interfásicos SBT (Tabela 5). A área média dos sinais *in situ* controlo e SBT foi respectivamente de 42,865 μm^2 e de 27,828 μm^2 (Fig.4, c e f). Relativamente a núcleos controlo obteve-se uma razão de pSc200/DAPI média de 25,94%, valor que em núcleos SBT foi de 17,62% (Fig.4, a, c, d e f). A observação ao microscópio de epifluorescência permitiu verificar que os sinais *in situ* de pSc200 em núcleos interfásicos SBT apresentam uma maior individualização e condensação em relação aos núcleos controlo.

No tratamento estatístico, com recurso ao teste T-Student apurou-se que a razão média dos sinais pSc200 controlo e SBT apresentam diferenças significativas ($p=4,53\text{E}-07$). Da análise da área média dos sinais *in situ* controlo e SBT também se pode concluir que há diferenças significativas ($p=1,88\text{E}-06$). Por outro lado, a comparação do número médio de sinais utilizando o teste T-Student não mostrou diferenças significativas ($p=0,463$).

Os núcleos interfásicos controlo e SBT apresentam uma área média (DAPI) muito próxima, de 165 μm^2 e 163,5 μm^2 respectivamente, não apresentando assim diferenças significativas, o que permitiu efectuar a análise das razões da área entre os sinais de *in situ* obtidos para as duas sondas utilizadas e a área nuclear.

Tabela 5. Núcleos interfásicos de ápices radiculares					
Núcleos interfásicos apresentando diferentes padrões de organização de pSc200					
	DAPI	pSc200			Total de Núcleos
	Área média +-Desvio Padrão (μm^2)	Área média +-Desvio Padrão (μm^2)	Número médio de Blocos +-Desvio Padrão	pSc200/DAPI +- Desvio Padrão x100%	Número total
Controlo	165 +- 42,7	42,865+-15,06	14,00 +- 5,08	25,94+-7	35,00
SF (24h 4°C)	163,5+-33,8	27,828+-6,06	15,00 +- 5,27	17,62+-4	32,00
Teste T-Student	0,818403	1,88E-06	0,462977	4,53E-07	

Figura 4 – Núcleos interfásicos SBT e controlo

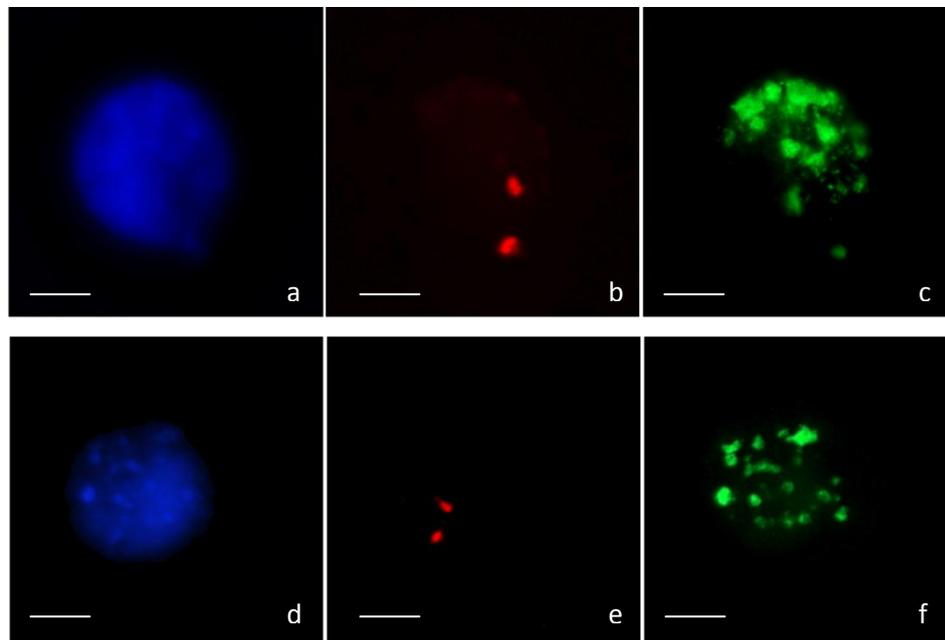


Figura 4

a, b, c - Núcleos interfásicos de ápices radiculares controlo; DAPI (azul), sonda rRNA 18S/25S (vermelho) e sonda pSc200 (verde) Bar, 5 μ m.

d, e, f - Núcleos interfásicos de ápices radiculares SBT; DAPI (azul), sonda rRNA 18S/25S (vermelho) e sonda pSc200 (verde) Bar, 5 μ m.

Discussão e Conclusão

O objectivo deste trabalho foi estudar o efeito de stresses térmicos na conformação da cromatina em núcleos interfásicos de centeio utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente. Para isso, foram caracterizados os padrões de organização de sequências ribossomais em núcleos interfásicos de ápices radiculares e de coleóptilos de plântulas submetidas a alta temperatura (4h a 40°C) e procedeu-se à quantificação de sinais de *in situ* de sequências de rDNA e subteloméricas em núcleos de plântulas submetidas a stresse de baixa temperatura (24h a 4°C).

Além do pTa71, que corresponde à unidade completa de rDNA de trigo e é a sonda ribossomal mais frequentemente usada, neste trabalho usou-se uma nova sonda para detectar rDNA, que denominámos rDNA 18S/25S. Para obter essa sonda, foram desenhados três pares de primers para amplificaram três fragmentos, dois localizados na sequência 25S e o terceiro localizado na sequência 18S. Por observação de células c-metafásicas, confirmou-se que esta sonda híbrida exclusivamente no *loci* de rDNA, produzindo resultados equivalentes aos obtidos com pTa71, em ambos os tecidos analisados. Deste modo, a sonda rDNA 18S/25S, usada pela primeira vez, pode substituir a sonda pTa71 com sucesso e com vantagem, uma vez que é produzida e marcada por PCR em simultâneo, sendo assim mais fácil de produzir e preparar.

Para avaliar a organização dos padrões interfásicos da cromatina ribossomal em núcleos submetidos a tratamento de alta temperatura (SAT) e controlo, como descrito nos resultados, foram considerados dois parâmetros: frequência de núcleos com padrão de organização condensados e descondensados e o número médio de sinais *in situ* de rDNA por núcleo. A análise estatística revelou em ambos os tecidos diferenças significativas nos dois parâmetros, demonstrando claramente que o tratamento de alta temperatura induz a descondensação da cromatina ribossomal. Essa conclusão é demonstrada por: (i) um aumento na frequência de núcleos com um padrão de organização de rDNA descondensado; (ii) um aumento no número médio de sinais *in situ* de rDNA por núcleo.

O primeiro parâmetro resulta da classificação de núcleos interfásicos em diferentes tipos de organização da cromatina, sendo considerados como núcleos descondensados: núcleos com blocos de rDNA com forma e textura irregular; núcleos com descondensações em forma de cauda proveniente dos blocos de rDNA; e núcleos com mais de dois sinais *in situ*. O número superior a dois sinais *in situ* por núcleo resultará de regiões de rDNA mais descondensadas intercaladas com regiões mais condensadas e transcricionalmente inactivas, uma vez que, como demonstrado em trigo, essas regiões condensadas não se encontram colocadas com incorporação de BrUTP (Silva *et al.*, 2008). O aumento do número médio de sinais *in situ* de rDNA por núcleos pode assim ser interpretado como um aumento da descondensação da cromatina ribossomal, uma vez que o aumento de descondensações

intercalares flanqueadas por blocos de rDNA condensados, como foi observado na avaliação da organização da cromatina ribossomal em *Arabidopsis* (Early *et al.*, 2006).

Embora em ambos os núcleos, de ápices radiculares e coleóptilo, o tratamento de alta temperatura tenha induzido descondensação do rDNA, revelado pelo aumento da frequência de núcleos descondensados, o padrão de organização da cromatina ribossomal foi considerado qualitativamente diferente entre os dois tipos de núcleo. Os núcleos interfásicos SAT revelaram um padrão com blocos de rDNA maiores e com uma textura granulosa, mostrando assim um padrão de organização ribossomal diferente face aos núcleos de ápices radiculares. Estas variações parecem estar relacionadas com a natureza do tecido, que desenvolverá mecanismos de resposta distintos face ao tratamento de alta temperatura, no que diz respeito à organização da cromatina ribossomal. De facto, durante o desenvolvimento de *Arabidopsis*, a organização dos padrões de rDNA sofre alterações, estando estas modificações correlacionadas com diferentes padrões epigenéticos e diferentes níveis de expressão (Pontes *et al.*, 2007). Por outro lado, e como descrito anteriormente, os padrões de descondensação variam nos vários núcleos. Assim, foi observado mais de um fenótipo de descondensação num mesmo tecido em todos os casos analisados. Esta ocorrência pode dever-se a diferentes exposições das células ao tratamento de alta temperatura, quer em termos da posição celular na estrutura tridimensional no órgão, quer em termos da fase do ciclo celular considerado. Estas diferenças podem implicar diferentes respostas no padrão organização da cromatina ribossomal ao tratamento de alta temperatura.

Na avaliação dos núcleos interfásicos expostos a tratamento de baixa temperatura recorreu-se à quantificação da área dos sinais *in situ* para perceber o efeito do stresse de baixa temperatura no nível de compactação da cromatina ribossomal e subtelomérica. Observou-se que em média a área dos sinais *in situ* ribossomais em núcleos SBT representam 1,98% do tamanho do núcleo, enquanto os sinais dos núcleos controlo correspondem a 2,46%. Esta diferença permite-nos afirmar que a área dos sinais ribossomal tende a diminuir com baixas temperaturas, ou seja, há uma maior condensação dos *loci* ribossomais, efeito oposto comparativamente ao observado em núcleos provenientes de plântulas expostas altas temperaturas. Na observação das regiões subteloméricas de núcleos interfásicos expostos a tratamento de baixa temperatura, a quantificação do sinal *in situ* pSc200 corresponde a 17,62% de área no núcleo, enquanto em núcleos interfásicos controlo os sinais de pSc200 correspondem a 25,94% do núcleo. Deste modo, observamos que as regiões subteloméricas têm um comportamento semelhante às regiões ribossomais quando expostos a temperaturas baixas, no sentido de um aumento da compactação da cromatina.

Em suma, quer a cromatina ribossomal quer as regiões não codificantes subteloméricas condensam em resposta a stresse de baixa temperatura. Este efeito, no sentido de uma maior compactação da cromatina, eventualmente relacionada com uma menor disponibilidade para a transcrição no que diz

respeito aos genes ribossomais, pode enquadrar-se num cenário de diminuição da actividade metabólica que ocorre em situações de hipotermia.

As vias epigenéticas estão fortemente relacionadas com o estabelecimento e manutenção de certos estados da organização da cromatina ribossomal. Observações recentes, demonstraram que a indução artificial de hipometilação de DNA induz modificações da organização da cromatina ribossomal de centeio e dos seus níveis de transcrição (Caperta *et al.*, 2007). Adicionalmente, Somers *et al.* (1992) demonstram a ocorrência de um aumento da transcrição de vários genes, nomeadamente genes codificantes para proteínas de choque térmico, em centeio e trigo quando expostos a um tratamento a 40°C durante duas horas. Deste modo, as vias epigenéticas tem um papel decisivo na resposta ao stresse por parte das plantas e os nossos resultados obtidos em centeio enfatizam o papel da modulação da organização da cromatina em respostas face ao stresse.

Estas conclusões abrem novas perspectivas. Neste contexto, já estamos a estudar o efeito dos stresses térmicos analisados neste trabalho nos níveis de transcritos das sequências ribossomais e subteloméricas de centeio, com recurso à quantificação de transcritos por real-time PCR quantitativo. Pretende-se igualmente estender este estudo do efeito do stresse de baixa temperatura na conformação da cromatina a outros tecidos, nomeadamente a coleóptilos e a folhas.

Referências

- **Appels R, Dennis ES, Smith DR, Peacock WJ:** Two repeated DNA sequences from the heterochromatic regions of rye, *Secale cereale*, chromosomes. *Chromosoma* vol.84: 265-277 (1981).
- **Avramova ZV: Heterochromatin in animals and plants:** Similarities and differences. *Plant Physiology* 129: 40–49 (2002) (citado em Neves *et al.*, 2005).
- **Baier AC:** Centeio: Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT. 29 p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 15) (1994).
- **Bedbrook JR, Jones J, O'Dell M, Thompson R, Flavell R:** A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* vol.19: 545-560 (1980).
- **Caperta AD, Neves N, Morais-Cecílio M, Malhó R, Wanda V:** Genome restructuring in rye affects the expression organization and disposition of homologous rDNA loci. *Journal of Cell Science* 115: 2839-2846 (2002)
- **Caperta AD, Neves N, Viegas W, Pikaard CS, Preuss S:** Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizers in *Secale* cereal. *Protoplasma*. doi: 10.1007/s00709-007-0277-4 (2007).
- **Chinnusamy V, Zhu J-K:** Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 1-7 (2009).
- **Delgado M, Morais-Cecílio L, Neves N, Jones RN, Viegas W:** The influence of B chromosomes on rDNA organization in rye interphase nuclei. *Chromosome Res* 3: 487–491 (1995) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W, Pikaard CS:** Erasure of histone acetylation by Arabidopsis HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes & Dev.* 2006 20: 1283-1293. doi:10.1101/gad.1417706 (2006).
- **Gerlach WL, Bedbrook JR** Cloning and Characterization of Ribosomal-RNA Genes from Wheat and Barley. *Nucleic Acids Research* 7: 1869–1885 (1979).
- **González-Melendi P, Wells B, Beven A, Shaw PJ:** Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *Plant J* 27:223–233 (2001) (citado por Caperta *et al.*, 2002).
- **Goodpasture C, Bloom SE:** Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37–50 (1975) (citado por Caperta *et al.*, 2002).
- **Heslop-Harrison JS:** Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* 12: 617–635 (2000).
- **Jimenez R, Burgos M, Diaz de la Guardia RA:** Study of the Ag-staining significance in mitotic NORs. *Heredity* 60: 125–127 (1988) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Kunze B, Weichenhan D, Virks P, Traut W, Winking H:** Copy numbers of a clustered long-range repeat determine C-band staining. *Cytogenet Cell Genet*73:86–91 (1996) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Leitch AR, Mosgoller W, Shi M, Heslop-Harrison JS:** Different patterns of rDNA organization at interphase nuclei of wheat and rye. *J Cell Sci* 101:751–757 (1992) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **McIntyre CL, Pereira S, Moran L, Appels R:** New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat. *Genome* vol.33: 317-323 (1990).
- **McClintock B:** The relationship of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 21:294– 328 (1934) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Morais-Cecilio L, Delgado M, Jones RN, Viegas W:** Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. *Chromosome Res* 8:341–351 (2000) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Neves N, Delgado M, Silva M, Caperta A, Morais-Cecilio L, Viegas W:** Ribosomal DNA heterochromatin in plants *Cytogenet Genome Res* 109: 104–111 (2005).
- **Pederson T, Politz JC:** The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J Cell Biol* 148: 1091–1095 (2000) (citado por Neves *et al.*, 2005).

- **Pikaard CS:** Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance, and repression of ribosomal RNA genes, in Somerville CR, Meyerowitz EM (eds): *The Arabidopsis Book* (American Society of Plant Biologists, Rockville MD 2002) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Pontes O, Lawrence RJ, Neves N, Silva M, Lee J-H, Chen ZJ, Viegas W, Pikaard CS:** Natural variation in nucleolar dominance reveals the relationship between nucleolar organizer chromatin topology and rRNA gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11418–11423 (2003) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Pontes O, Lawrence RJ, Silva M, Preuss S, Costa-Nunes P, et al.:** Postembryonic Establishment of Megabase-Scale Gene Silencing in Nucleolar Dominance. *PLoS ONE* 2(11): e1157. doi:10.1371/journal.pone.0001157 (2007).
- **Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M, Capanna E:** The other chromatin. *Chromosoma* 110: 136–147 (2001) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Robert-Fortel I, Junéra HR, Géraud G, Hernandez-Verdun D:** Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 102:146–157 (1993) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Shaw PJ, Jordan EG:** The nucleolus. *Annu Rev Cell Devel Biol* 11:93–121 (1995) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Shaw PJ, Rawlins DJ, Highett MI:** Nuclear and nucleolar structure in plants, in Heslop-Harrison JS, Flavell RB (eds): *John Innes Review – The Chromosome*, pp 161–171 (Bios Scientific Publishers, Oxford (1993) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Silva M, Pereira HS, Bento M, Santos AP, Shaw P, et al.:** Interplay of Ribosomal DNA *Loci* in Nucleolar Dominance: Dominant NORs Are Up-Regulated by Chromatin Dynamics in the Wheat-Rye System. *PLoS ONE* 3(12): e3824. doi:10.1371/journal.pone.0003824 (2008).
- **Somers DJ, Gustafson JP, Filion WG:** The influence of the rye genome on expression of heat shock proteins in triticale. *Theor Appl Genet* 83:987-993 (1992).
- **Sumner AT:** Nucleolar organizers (NORs), in: *Chromosome Banding: 187–205* (Unwin Hyman Ltd, London 1990). (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Vershinin AV, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS:** The Large-Scale Genomic Organization of Repetitive DNA Families at the Telomeres of Rye Chromosomes. *The Plant Cell*, Vol. 7: 1823-1833 (1995).
- **Vershinin AV, Alkhimova EG, Heslop-Harrison JS:** Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some Triticeae species. *Rapid Science Publishers, Chromosome Research Vol 4:517-525* (1996).
- **Weichenhan D, Kunze B, Traut W, Winking H:** Evolution by fusion and amplification: the murine Sp100-rs gene cluster. *Cytogenet Cell Genet* 80: 226–231 (1998) (citado por Neves *et al.*, 2005).
- **Zurita F, Jimenez R, Diaz de la Guardia R, Burgos M:** The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and in situ hybridization study. *Chromosome Res.* 7: 563-570 (1999) (citado por Caperta *et al.*, 2002).