Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Arquitetura da cromatina na região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais

Larissa Mara de Andrade

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2011 Larissa Mara de Andrade Bacharel em Ciências Biológicas

Arquitetura da cromatina na região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais

Orientador: Prof. Dr. MATEUS MONDIN

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Andrade, Larissa Mara de Arquitetura da cromatina na região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais / Larissa Mara de Andrade. - -Piracicaba, 2011.

80 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Citogenética 2. Cromatina 3. Cromossomos 4. DNA 5. Expressão gênica 6. Genes 7. Genomas 8. Nucléolo I. Título

> CDD 574.87322 A553a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais Paulo e Vera

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sonho do Mestrado alcançado, pela força e coragem na superação das dificuldades ao longo do caminho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ pela bolsa concedida.

Ao Pesquisador e Prof. Dr. Mateus Mondin pela oportunidade, orientação, paciência e ensinamentos durante todo o percurso deste trabalho. Ao crescimento pessoal e profissional... meu muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Gustavo Kuhn, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela pronta disponibilidade e ajuda prestada.

A Prof. Ricardo Antunes de Azevedo pela ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos membros desta banca, pela disposição em ler este trabalho e pelas críticas que complementarão meus conhecimentos e aprendizados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela estrutura, conhecimento e disponibilidade em ajudar na condução deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas pelo convívio e aprendizado, me incentivando e ajudando nos momentos difíceis, e também pelos momentos de alegria comigo divididos.

A Renata por todo apoio, dedicação e amizade. Pessoa que tive o privilégio de conviver. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos da Pós-Graduação em especial ao Daniel, Jucelene (Juci), Wellington (Dr.), que tornaram os estudos mais divertidos.

Aos amigos do Kit André, Gré *(in memorian)* e Lilian pelos conselhos, ajudas e os deliciosos momentos de descontração e alegria.

A Renatinha, Titi e Caio agradeço pela convivência contínua, e aos demais amigos que mesmo de longe sempre apoiaram e torceram por mim.

Ao Rodrigo agradeço pelo incentivo e apoio. Meu companheiro, sempre presente com sua alegria contagiante, me deu forças para a concretização desse sonho.

A minha família escolhida: cunhadas Lú e Dani, cunhados Emil e Stefano, sobrinhos Davi, Miguel, Giulia, Laura e sogros Valdecir e Cida. Muito obrigada pela ajuda, conselhos, apoio, força e alegrias durante o percurso deste trabalho.

As minhas irmãs Cibele e Daniela, amigas e companheiras, e meu cunhado Henrique, muito obrigada pelo apoio e incentivo. Sempre acreditaram em mim, quando eu mesma estava descrente, mostrando que as dificuldades são necessárias para os grandes aprendizados.

Aos meus sobrinhos amados Julia, Pedro e João Henrique. Meus Tesouros que tornaram minha vida mais feliz, com a pureza e amor verdadeiros.

Aos meus avós Romário e Shirley que sempre estiveram presentes em todos os momentos.

Aos meus Pais Paulo e Vera, agradeço pela oportunidade desta vida. Durante esta primeira experiência profissional me ensinaram que o amor, dedicação, verdade e o respeito pelos companheiros de trabalho são os alicerces para se colher bons frutos! Meus agradecimentos nunca serão suficientes por toda dedicação e esforços infinitos... Vocês são meu exemplo de conduta!

A todos que não foram citados, mas não menos importantes durante esta caminhada, meus sinceros agradecimentos!

MUITO OBRIGADA!

"Quase tudo é possível quando se tem dedicação e habilidade. Grandes trabalhos são realizados não pela força, mas pela perseverança."

(Diego Lima)

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Região organizadora do nucléolo: rDNA 45S e o Nucléolo	17
2.2 Estruturas da Cromatina e o Controle Epigenético	21
2.3 <i>locus</i> adicional de rDNA 45S	26
2.4 Por que utilizar Crotalaria juncea para estudos do controle genético e epigene	ético do
locus de rDNA 45S?	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Material	35
3.2 Métodos	35
3.2.1 Germinação	35
3.2.2. Sincronização Celular	35
3.2.3 Pré-tratamento de raízes com inibidores do fuso mitótico	37
3.2.4 Coloração pelo método de Feulgen	37
3.2.5 Preparação de lâminas	
3.2.6 Bandamento Ag-RON	
3.2.7 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	
3.2.7.1 Sondas	
3.2.7.2 Hibridação molecular <i>in situ</i> (FISH) das sondas de rDNA 45S	
3.2.8 Imunocitoquímica	40
3.2.8.1 Anticorpos	40
3.2.8.2 Preparação de lâminas para imunocitoquímica de modificações N- termin	ais das
histonas H3 e H4	40
3.2.8.3 Imunocitoquímica para metilação de DNA com anti-5'-metilcitosina	41
3.2.9 Fibra de DNA estendida (Fiber FISH)	42
3.2.9.1 Extração de núcleos	42
3.2.9.2 Extensão das fibras de DNA	42
3.2.9.3 Detecção da citosina metilada no rDNA 45S	43

SUMÁRIO

3.2.10 Microscopia e análise de imagens	. 43
4 RESULTADOS	. 45
5 DISCUSSÃO	. 59
5.1 Nucleologênese e o comportamento do nucléolo no ciclo celular	. 59
5.2 Controle epigenético da transcrição de genes de rRNA 45S	. 61
5.3 Atividade ribossomal e a dominância nucleolar	. 63
6 CONCLUSÃO	. 69
REFERÊNCIAS	. 71

RESUMO

Arquitetura da cromatina na região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais

O nucléolo é uma organela nuclear responsável pela produção dos ribossomos, através das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs). Espécies que possuem mais de um par de cromossomos contendo NORs terão, obrigatoriamente, pelo menos um par ativo, sendo as demais NORs funcionais de acordo com a demanda celular. O mecanismo de compensação de dose é visualizado e bem estabelecido em híbridos interespecíficos, conhecido como dominância nucleolar, com a inativação de NORs de um dos parentais por outras homeólogas ativas que as dominam. A arguitetura da cromatina nas NORs e o controle da sua expressão foram estudados com o objetivo de se entender os mecanismos envolvidos no fenômeno da dominância nucleolar em espécies diplóides que possuem múltiplas NORs. A espécie modelo utilizada neste estudo foi Crotalaria juncea (Leguminosae-Papilionoideae), caracterizada por conter 2n=2x=16, e NORs no braço curto do cromossomo 1, sendo este o principal organizador do nucléolo, e no braço longo do cromossomo 4 adjacente à heterocromatina centromérica, sendo este um sítio adicional (sítio menor) e de expressão facultativa, previamente determinada. Nas raízes de C. juncea sincronizadas, observou-se que a nucleologênese tem seu início durante o final da telófase, em que os 4 sítios de genes ribossomais podem ter atividade e formar até 4 nucléolos, os guais tendem a se fundir durante a interfase. A Hibridação in situ fluorescente (FISH) permitiu estudos da arguitetura da cromatina, com a visualização dos territórios cromossômicos, onde a cromatina não está organizada de forma aleatória dentro do núcleo, e consequentemente o rDNA 45S dentro do nucléolo. Observou-se também que todos os sítios de rDNA 45S possuem diferença no tamanho do arranjo repetitivo. Assim sendo, a hierarquia de dominância está de acordo com o tamanho de cada arranjo (sítio), e estes são ativados de acordo com a demanda celular. As análises das modificações nas histonas mostraram que a H3K9Met1 apresentou marcas fracas no nucléolo, enquanto no restante da cromatina nuclear sua marcação foi intensa. Já a H3K9Met2 apresentou marcação fortemente associada à cromatina presente no nucléolo, com alguns pequenos pontos heterocromáticos dispersos no núcleo. Pela observação entende-se que ambas metilações controlam diferentes tipos de heterocromatinas, ou seja, a H3K9Met2 controla principalmente heterocromatinas associadas aos genes ribossomais, e a H3K9Met controla heterocromatinas não associadas ao rDNA. O rDNA é hiperacetilado dentro do nucléolo para a H3K14. Não foi observada marcação nucleolar para H4K8ac, mas pôde ser observadas regiões hiperacetiladas em outras regiões da cromatina. A metilação do DNA esteve diretamente associada à diferentes níveis de organização da cromatina das NORs. As heterocromatinas adjacentes ao nucléolo apareceram fortemente metiladas, enquanto a cromatina distendida dentro do nucléolo apresentou marcação dispersa, com algumas regiões mais fortemente marcadas, onde a cromatina apresentava-se mais condensada e provavelmente não associados com a cromatina ativa. As fibras estendidas permitiram uma análise de alta resolução, onde foi possível observar que regiões não metiladas apareciam intercaladas entre grandes regiões fortemente metiladas, sugerindo que estas regiões hipometiladas estão, possivelmente, associadas com as alças de transcrição dentro do nucléolo.

Esses resultados contribuem para o entendimento sobre o controle genético e epigenético na arquitetura da cromatina ribossomal, bem como seu controle na expressão dos genes ribossomais no genoma das plantas.

Palavras - chave: rDNA 45S; Nucléolo; Modificações de histonas; Metilação de DNA; FISH; *Loci* adicional; Epigenética

ABSTRACT

Nucleolus Organizer Regions chromatin architecture and its role in ribosomal genes expression

The nucleolus is a nuclear organelle responsible for the ribosomes production, by Nucleolus Organizer Regions (NORs). Species presenting more than one chromosome pair with NORs should present, one pair expressing the genes, at least; while the other pairs expressing their genes accordingly to cellular demand. Dosage compensation mechanism is visualized and well established of interspecific hybrids as a well-described phenomena named nucleolar dominance, where a NOR from one parental could lead to inactivation of a NOR from the other parental which is dominated. The chromatin architecture and expression of the NORs were studied to address the mechanism involved in the nucleolar dominance of diploid species containing multiple sites of 45S rDNA. The model species used in the present study was the crop Crotalaria juncea (Leguminosae-Papilionoideae) characterized by 2n=2x=16 chromosomes, being the main NOR mapped into chromosome 1 short arm and presenting an additional site (minor site) in the chromosome 4 long arm adjacent to a centromeric heterochromatin and facultatively expressed. Synchronized meristematic root tip cells determined to nucleologenesis starts during the late-telophase, often expressing every ribosomal gene sites, when up to four nucleoli could be observed and these become merged during interphases. FISH allowed nucleolar chromatin architecture be accessed revealing distinct chromosomal domains (territories), suggesting a non-random distribution of the 45S rDNA, even between homologous chromosomes, into the nucleolus. The 45S rDNA sites from both chromosome pairs 1 and 4 of *C. juncea* showed differences in their array sizes. The differences in the 45S rDNA array sizes and the order of loci expression suggest a hierarchy of dominance, a feature of nucleolar dominance; being the small RONs activated only on demand. Immunodetection of histone modifications showed different patterns to methylation distribution across the chromatin as a whole; where H3K9Met1 was found mainly distributed along the nuclear chromatin without an evident signal into nucleolus, while H3K9Met2 was detected as conspicuous dots in the nuclear chromatin and highly accumulated into the nucleolus. The results indicate different control on heterochromatin establishment and maintenance, being the modifications specific to certain chromosomal regions. Indeed, H3K9Met is a key component in the nucleolus chromatin architecture and expression. The chromatin inside the nucleolus showed a high accumulation of H3K14ac, with a weak fluorescent signal along the nucleus; on the other hand H4K8ac showed a strong signal homogenously distributed across the nuclear chromatin, but without evident signals inside the nucleolus. DNA methylation was directly associated with different levels of chromatin organization of the NORs. The heterochromatic regions associated to RON are highly methylated, while the chromatin inside the nucleolus showed weaker signals, with some bright spots probably in condensed regions and related to chromatin inactivity. Extended DNA fiber allowed a higher resolution mapping that revealed long methylated regions intermingled by nomethylated ones, being the last probably associated to transcriptional loops of rRNA genes into the nucleolus. The results presented herein contributes to a better understand about the nucleolar chromatin architecture and the genetic and epigenetic control of the ribosomal genes expression on plant genomes.

Keywords: 45S rDNA; *Nucleolus*; Histones modifications; DNA methylation; FISH; Additional *loci;* Epigenetics

1 INTRODUÇÃO

O funcionamento normal da tradução em uma célula é dependente da expressão dos genes ribossomais, os responsáveis pela produção dos ribossomos. Todos os organismos superiores possuem ao menos um par de cromossomos que contêm estes genes e os expressam (HESLOP-HARRISON, 2000a). O DNA ribossômico de 45S é composto por cópias dos genes de rRNA 18S, 5.8S e 25/26S arranjadas *in tandem*, intercaladas pelos espaços intergênicos transcritos (ITS1 e ITS2), e o conjunto gênico (18S-ITS1-5.8S-ITS2-25S) pelos espaçadores não transcritos (IGS) (HESLOP-HARRISON, 2000a, 2000b; LODISH et al., 2003; PIKAARD, 2000a; RAŠKA et al., 1995). Embora o sítio ribossomal contenha de centenas a milhares de cópias, nem todos os genes tem atividade transcricional. Os genes de rDNA 45S transcrevem de forma estável ao longo do ciclo celular, controlados por modificações na estrutura da cromatina, resultante dos mecanismos epigenéticos (JASENČÁKOVÁ, 2003a, 2003b).

O controle epigenético é capaz de alterar a expressão gênica e, consequentemente, fenotípica, sem que a sequência do DNA seja alterada (JASENČÁKOVÁ et al., 2000, JASENČÁKOVÁ; MEISTER; SCHUBERT, 2001; FUCHS et al., 2006; RICHARDS, 2006; GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007). A modulação da estrutura da cromatina, responsável pelo controle epigenético da expressão gênica, é determinada por modificações das histonas nas caudas C- e N- terminais e por modificações covalentes nos nucleotídeos (BOWLER et al., 2004; JASENČÁKOVÁ et al., 2000, JASENČÁKOVÁ; MEISTER; SCHUBERT, 2001; FUCHS et al., 2006; RICHARDS, 2006; GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007). As modificações nas histonas e citosinas do DNA, que atuam na compactação e/ou no relaxamento da cromatina, influenciam na ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios, ou seja, o acesso às sequências regulatórias pela maquinaria de transcrição é dependente da estrutura da cromatina (GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007; PIKAARD, 2000a).

Regiões de DNA repetitivos arranjados *in tandem* foram sempre interpretados como redundantes e sem importância para o funcionamento normal da célula. Entretanto, nos últimos anos vem ocorrendo uma revolução sobre a importância destas sequências no sistema de expressão gênica, principalmente nas vias dos RNAs de

interferência, bem como o papel destas sequências na modelagem dos genomas (McSTAY, 2006).

Especificamente no caso do arranjo repetitivo dos genes ribossomais, novos *loci* de genes ribossomais podem surgir ao longo da evolução por diferentes mecanismos, como recombinações desiguais (HESLOP-HARRISON, 2000a; RAINA; VERMA, 1979), translocações (RAINA; VERMA, 1979) e transposições (BELYAYEV et al., 2010; DUBKOVSKY; DVOŘÁK, 1995; RAINA; VERMA, 1979; RASKINA et al., 2008). Os *loci* adicionais, ou seja, aqueles fora da região organizadora do nucléolo principal têm sido interpretados como inativos, por não formar uma constrição secundária nos cromossomos metafásicos (McCLINTOCK, 1934). Todavia, estudos recentes mostram que estes *loci* podem ser funcionais ou não, de acordo com a demanda celular ou mesmo funcionarem em momentos específicos do ciclo celular (McSTAY, 2006; MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007; MONTIJN et al., 1998), e/ou da diferenciação celular e desenvolvimento (HASTEROK; MALUSZYNSKA, 2000).

Em *Crotalaria juncea* foi relatada a ocorrência da expressão de um par de *locus* adicional de genes ribossomais, detectados por precipitação de nitrato de prata (Bandamento-NOR). Neste caso, os autores puderam inferir que, certamente, a ausência de contrição secundária não necessariamente significa inatividade completa dos genes, mas sim que, seu funcionamento ocorre somente em etapas iniciais do ciclo celular, permitindo um padrão normal de condensação e a não formação da constrição secundária (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). No sentido de se comprovar tais hipóteses, o presente estudo teve como objetivo compreender como o sítio adicional de rDNA 45S funciona e quais os mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos em seu controle, e relacionar o seu tempo de atividade com a observação de estruturas morfológicas nos cromossomos.

A compreensão dos mecanismos genéticos e epigenéticos que controlam a expressão e a forma de atividade dos genes ribossomais, são de fundamental importância para o entendimento dos processos de diferenciação e desenvolvimento e principalmente para decifrar a forma de organização e de funcionamento do genoma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Região organizadora do nucléolo: rDNA 45S e o Nucléolo

Os genes de rRNA 18S-5.8S-25 ou 26S (rDNA 45S) e de rRNA 5S (rDNA 5S) estão organizados *in tandem* e são responsáveis pela formação das subunidades ribossomais de 60S e de 40S (domínio maior e menor) nos eucariotos, que juntamente a um complexo protéico originam os ribossomos. A expressão dos sítios de rDNA 45S ocorre no nucléolo, um território não membranoso no núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares, como um processo dinâmico ao longo da vida da célula (LEWIN, 2004; LODISH et al., 2003; SUMNER, 2003).

O rDNA 45S é uma das repetições mais bem caracterizadas, composta pelos genes ribossomais (rDNA 45S), espaçadores intergênicos transcritos (ITS) e, espaçadores intergênicos não transcritos (IGS) (Figura 1c). As regiões codantes do rDNA 45S são altamente conservadas entre os eucariotos, enquanto as regiões IGS variam amplamente mesmo entre espécies relacionadas, ou seja, é altamente polimórfica (FLAVELL, 1989; HESLOP-HARRISON, 2000a; LEWIN, 2004; PIKAARD, 2000a; SUMNER, 2003). Em plantas, a unidade (motivo) do rDNA 45S possui aproximadamente 10 kb e cada *locus* ou NOR possui esta unidade, repetida de centenas a milhares de vezes (HESLOP-HARRISON, 2000a). A NOR compreende uma porcentagem do genoma total, como 8% em *Arabidopsis thaliana* (HESLOP-HARRISON, 2000b), podendo chegar até 10% do genoma na maioria das espécies (HESLOP-HARRISON, 2000a).

A NOR pode ter sítios com grande atividade dos genes ribossomais, sendo responsável por 40-80% de toda a transcrição nuclear de células em crescimento e em divisão, enquanto a transcrição do rRNA é reduzida a níveis quase indetectáveis em células diferenciadas. Em grande parte das espécies de plantas, a proporção dos genes de rRNA trancricionalmente ativos é pequena em relação ao tamanho do *locus*, sendo suficiente para suprir toda a maquinaria ribossomal em uma célula (CAPERTA, 2002; passim; PIKAARD, 2000b). Desse modo, o tamanho e a forma do nucléolo dependem do estado funcional celular. Isto sugere que os diferentes tipos de nucléolos refletem os diferentes níveis de atividade funcional (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983).

A primeira correlação entre a região cromossômica de rDNA 45S e a estrutura nucleolar, normalmente denominada como "região organizadora de nucléolo" (abreviase RON ou NOR), foi feita por Heitz (1931, apud SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). A região organizadora do nucléolo, terminologia utilizada até hoje, é uma região específica do cromossomo que contém os principais genes de rRNA, que quando ativa origina um nucléolo (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). A biogênese ribossomal ocorre com a transcrição e processamento de genes de rRNA, e a posterior montagem do ribossomo (LYON; LAMOND, 2000; passim). Dentro do nucléolo, os genes ribossomais são transcritos pela RNA polimerase I (Pol I) para a produção de pré-rRNAs. Esses transcritos são processados em RNAs ribossomais associados às proteínas ribossomais importadas do citoplasma e ao RNA 5S transcrito em outra região do núcleo, formando os pré-ribossomos (DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000; RAŠKA; SHAW; CMARKO, 2006).

Na maioria dos eucariotos superiores, a biogênese ribossomal ocorre em 3 estruturas específicas do nucléolo, vistas ao microscópio eletrônico: o componente fibrilar denso (DFC), o centro fibrilar (FC) e o componente granular (GC) (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983; DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000; SUMNER, 2003; RAŠKA; SHAW; CMARKO, 2006; HERNANDEZ-VERDUN, 2006; McKEOWN; SHAW, 2009). Sua morfologia é esférica, e os diferentes componentes estão dispostos de forma concêntrica, com o FC no meio e o GC no exterior (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983), onde o DFC é uma faixa densa e estreita que envolve o FC (SUMNER, 2003). O FC contém centenas de cópias de genes rRNA arranjados in tandem (localizado nas RONs), as moléculas de RNA polimerase I e DNA topoisomerases I, e os fatores de transcrição do rRNA (LODISH et al., 2003; RAŠKA et al., 1995; SUMNER, 2003), supondo-se então que essa região do nucléolo deve ser o local da transcrição do gene ribossomal, e o DFC, o local de síntese de rRNA (RASKA et al., 1995). Os rRNAs sintetizados migram para GC, onde os grânulos representam as partículas pré-ribossomais (SUMNER, 2003) em vários estágios de maturação (RAŠKA; SHAW; CMARKO, 2006; HERNANDEZ-VERDUN, 2006, passim).

No ciclo celular, quando as células entram em mitose, a transcrição do rDNA (a partir do final da prófase) e o processamento de pré-rRNAs são interrompidos (DUNDR;

MISTELI; OLSON, 2000), e a dissociação estrutural dos nucléolos permanece até a telófase (LYON; LAMOND, 2000, passim). Durante este período, a RNA polimerase I (Pol I) e seus fatores transcrionais permanecem associados a NOR, enquanto outros componentes nucleolares ficam dispersos por todo o citoplasma (DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000; LYON; LAMOND, 2000, passim). A reorganização nucleolar inicia-se no final da anáfase ou início da telófase, imediatamente, após a segregação dos cromossomos (DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000). Então o processamento de prérRNA, anteriormente interrompido, é reativado pela interação entre os fatores trancricionais da Pol I e os elementos da maquinaria de processamento (DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000; KOOP et al., 2007; McKEOWN; SHAW, 2009), e os genes de rRNA já sintetizados tornam-se ativos, associando-se aos "corpos pré-nucleolares" (PNBs), que contêm um subconjunto de proteínas e RNAs nucleolares que estavam dispersos, no mecanismo conhecido como nucleologênese (DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000; McKEOWN; SHAW, 2009). O nível de transcrição é controlado pela carga da cromatina mediada pelo complexo Pol I nos promotores e este, por sua vez, modula a estrutura do nucléolo. Desse modo, é possível que a transcrição dirija a nucleogênese, estimulando o processamento, bem como o controle direto da síntese de rRNA (McKEOWN; SHAW, 2009).

As NORs ativas foram inicialmente identificadas como as regiões da cromatina levemente corada dos cromossomos, em que a expressão dos genes ribossomais resulta na formação (CAPERTA et al., 2002; NAVASHIN, 1927; McCLINTOCK, 1934; HESLOP-HARRISON, 2000a) ou não da constrição secundária no cromossomo metafásico como prova citológica de sua atividade (MONDIN 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). Já o rDNA 5S é encontrado em qualquer um dos cromossomo com a constrição secundária (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). Já o rDNA 5S é encontrado ou localizado no cromossomo com a constrição secundária (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). Esses *loci* de rDNA 45S e 5S têm grande importância no estudo da evolução dos cromossomos, pois suas posições nos cromossomos são relativamente conservadas, tornado-se assim importantes marcadores cromossômicos (PIKAARD, 1999, 2000a, 2000b; HESLOP-HARRISON, 2000a, 2000b; SCHWAZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000).

Por ser um marcador citologicamente visível, os primeiros estudos sobre o nucléolo e sua região organizadora foram desenvolvidos com técnicas simples de coloração. Posteriormente, foi desenvolvido um procedimento que identifica proteínas nucleolares associadas a NOR. Os componentes da maquinaria de transcrição da Pol I contem domínios ácido/argirofílico, sendo assim os nucléolos e as NORs podem ser facilmente visualizados com a precipitação de nitrato de prata (Ag-NOR) (McSTAY, 2006; passim). Portanto a precipitação do nitrato de prata tem a capacidade de localizar NORs ativas, mesmo que estas não formem constrições secundárias (HOWELL; BLACK, 1980).

No final da década de 60 foi desenvolvida uma técnica que tem como base a propriedade recombinante das cadeias complementares de DNA, a Hibridação Molecular in situ (ISH), a qual utilizava sondas radioativas, onde os sítios de DNA ligados eram detectados por autoradiografia (PARDUE; GALL, 1969). A partir dos anos 80, associada aos rápidos avanços tecnológicos, através de marcadores fluorescentes (FISH) esta técnica propiciou enorme progresso nos estudos sobre organização dos genomas (PINTO-MAGLIO, 2007). Depois que o gene de rDNA 45S foi isolado, a FISH foi rapidamente disseminada, pois se trata de um arranjo altamente conservado, portanto utilizável em todas espécies de plantas (FLAVELL, 1989; HESLOP-HARRISON, 2000a). A FISH é capaz de determinar com precisão o número e a localização física de sequências de DNA diretamente nos cromossomos, incluindo genes (HESLOP-HARRISON, 2000a; SCHWAZACHER; HESLOP-HARRISON, 2000). A técnica não é uma metodologia quantitativa, mas o tamanho do sinal detectado corresponde ao número de cópias dos genes de rRNA no locus, o qual pode variar significativamente entre loci (MALUSZYNSKA; HESLOP-HARRISON, 1993). Mesmo após o desenvolvimento dessa técnica, a utilização da técnica de precipitação por nitrato de prata é ainda a forma mais eficiente e barata de se localizar sítios de rDNA 45S ativos.

As metodologias de localização das regiões organizadoras do nucléolo contribuem significantemente para o entendimento do controle genético da expressão dos genes de rRNA 45S. Desse modo, a localização, o polimorfismo e o número de sítios de rDNA 45S são ferramentas importantes para o entendimento da evolução

cromossômica e da citotaxonomia (HESLOP-HARRISON, 2000a; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007; RAINA et al., 2001). Além disso, a estrutura nucleolar é informativa e serve como modelo para se estudar a regulação da transcrição e da cromatina, dizendo respeito à organização nuclear (McKEOWN; SHAW, 2009).

2.2 Estruturas da Cromatina e o Controle Epigenético

O DNA de eucariotos se associa as proteínas histônicas e não-histônicas de forma estável, formando a cromatina. Os dímeros das histonas H3/H4 e H2A/H2B formam um octâmero, onde dentro do sulco um trecho menor da dupla fita de DNA com 146 pares de bases (bp) irá se associar em 1,7 voltas, e as caudas N-terminais ficam dispostas para fora e as C-terminais para dentro do core de histonas (Figura 1b). Essa estrutura é estabilizada pela histona H1, formando a unidade básica de repetição da cromatina, o nucleossomo, ou seja, representa apenas o primeiro nível de conformação do DNA no núcleo da célula (TURNER, 2001; LODISH et al., 2003; LUGER et al., 1997; SUMNER, 2003; WU; BASSETT; TRAVERS, 2007), a qual compreende entre 75-90% do DNA genômico (LUGER et al., 1997; SEGAL et al., 2006; SUMNER, 2003). A repetição possui uma sequência de DNA, o DNA linker, que liga aos nucleossomos vizinhos por sequências que variam de 10-80 bp (LAM; KATO; WATANABE, 2004), formando um "colar-de-contas" (LUGER et al., 1997; SEGAL et al., 2006; SUMNER, 2003). A variabilidade no comprimento do DNA linker pode estar relacionada com funções regulatórias e controle de *loci* específicos (LAM; KATO; WATANABE, 2004) (Figura 1).

A capacidade do octâmero de histonas de envolverem diferentes seqüências de DNA em nucleossomos é altamente dependente da sequência específica do DNA, que difere grandemente na sua capacidade de dobrar (Figura 1b). Portanto, tem papel importante na ativação ou inativação dessas sequências, ou seja, da regulação da expressão gênica (SEGAL et al., 2006). Este complexo nucleoprotéico usa um código de posicionamento, resultando em posições no nucleossomo para funções específicas do cromossomo (SEGAL et al., 2006), além de ser altamente conservado em todos os genomas dos eucariotos (LUGER et al., 1997).

A estrutura da fibra de 30 nm ainda é uma grande questão não resolvida, pois não se sabe se os nucleossomos estão organizados em uma solenóide como uma hélice contínua, ou em duas hélices, formando um zigue-zague, análogo à estrutura do DNA (WU; BASSETT; TRAVERS, 2007). Embora existam algumas variações no modelo, para Maeshima Hihara; Eltsov (2010), a formação de uma fibra de 30 nm, requer a ligação lateral seletiva de nucleossomos vizinhos sobre a cadeia de DNA, conferindo uma organização para a fibra em zigue-zague. Robinson e Rhodes (2006) sugeriram em sua pesquisa que a forma de solenóide representa a cromatina "ativa", enquanto o segundo modelo, representa o estado dobrado da fibra de 30 nm, portanto "inativo". Ou seja, ambas estruturas são controladas por mecanismos de ativação ou silenciamento.

Os processos para ativação exigem que os dois filamentos de DNA se separem temporariamente, permitindo assim o acesso das polimerases e dos fatores transcricionais. Todavia, os nucleossomos (Figura 1b) e a cromatina organizada em fibras de 30 nm representam barreiras que dificultam o acesso dessas enzimas, sendo importante que as células disponham de meios para a abertura das fibras e/ou remoção temporária das histonas para permitir a modulação da cromatina nos processos de transcrição e replicação (BOWLER et al., 2004). Além das associações físicas para o acesso aos fatores de transcrição, a modulação da cromatina pode desempenhar um posicionamento das sequências codantes. que localizam-se papel no predominantemente na periferia dos territórios cromossômicos, enquanto que as sequências não codantes assumem posições mais interiores ou são aleatoriamente posicionadas no território (KURZ et.al., 1996). Portanto, a cromatina não está organizada de maneira aleatória dentro do núcleo e assim cada cromossomo deve ocupar um território distinto (domínio cromossômico). No caso dos vegetais estes domínios são discretos e estarão refletidos na orientação mitótica dos cromossomos durante o processo de divisão (RABL, 1885).

A modulação da estrutura da cromatina é a responsável pelo controle epigenético da expressão gênica. Essa regulação da estrutura é reconhecida por modificações nas caudas das histonas (Figura 1b) e por modificações covalentes nos nucleotídeos (BOWLER et al., 2004). As modificações nas histonas e citosinas do DNA

atuam na compactação e/ou no relaxamento da cromatina, influenciando na ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios, ou seja, o acesso às sequências regulatórias pela maquinaria de transcrição é dependente da estrutura da cromatina (GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007; PIKAARD, 2000a). Muitas dessas modificações são específicas para a heterocromatina ou para a eucromatina (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004; GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007). As modificações covalentes nos nucleotídeos (carbono 5' da citosina do DNA) e nas histonas (metilação e acetilação de aminoácidos na cauda N-terminal) são capazes de alterar a expressão gênica e fenotípica sem que a estrutura da sequência de DNA seja alterada (JASENČÁKOVÁ et al., 2000; JASENČÁKOVÁ; MEISTER; SCHUBERT, 2001; FUCHS et al., 2006; RICHARDS, 2006; GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007).

As metilações do DNA transferem um grupo metil para a posição 5' do anel pirimidínico das citosinas, catalisadas pela enzima metiltransferase, nos sítios CpG e CpHpG (H=C, A, T) simétricos e nos sítios CpHpH (H=C, A, T) não simétricos do DNA de plantas (GRAFI; ZEMACH; PITTO, 2007). Essa modificação da citosina, que tem como consequência o silenciamento gênico (BOWLER et al., 2004; FUCHS et al., 2006), está ausente ou quase ausente em leveduras, moscas e nematóides (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004). O nível de metilação é variável no genoma das plantas, como em *Arabidopsis* com 6% (KAKUTANI et al., 1999), e no milho 25% das citosinas metiladas (PAPA et al., 2001), ocorrendo predominantemente nos sítios CG, mas também em sítios CpHpG e CpHpH. Os retrotransposons e transposons são inativos e altamente metilados, os quais resultam na regulação dos genes vizinhos (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004; VAUGHN et al., 2007).

As modificações nas histonas estão implicadas na regulação dos genes, formação e manutenção das heterocromatinas. As principais modificações descritas até então são a acetilação, metilação, fosforilação, ribosilação de aminoácidos nos resíduos da cauda N-terminal livre (BOWLER et al., 2004; FUCHS et al. 2006, JASENČÁKOVÁ et al., 2000; JASENČÁKOVÁ; MEISTER; SCHUBERT, 2001; JASENČÁKOVÁ, 2003; BRASZEWSKA-ZALEWSKA; BERNAS; MALUSZYNSKA, 2010).

23



Figura 1 – Esquema da estrutura da NOR e do rDNA 45S. a) sítios de rDNA 45S ocupando territórios cromossômicos dentro do nucléolo; b) estrutura do nucleossomo com as caudas N-terminais dispostas para fora, onde localizam-se os resíduos de aminoácidos disponíveis para modificações epigenéticas, e consequente ativação/silenciamento gênico; c) arranjo repetitivo dos genes ribossomais 18S, 5.8S, 25S intercalados pelos ITS1 e ITS2 (espaços intergênicos transcritos), e o gene de rDNA 45S separados pelos IGSs (espaços intergênicos não transcritos) dispostos *in tandem*

Fonte: Adaptado de Pikaard (2002) e Sumner (2003).

A acetilação ocorre com a diminuição das cargas positivas no grupo NH⁺³ pela adição de um grupo acetil aos aminoácidos básicos das histonas, relaxando a estrutura

da cromatina e, consequentemente tornando o DNA acessível aos fatores de transcrição (JASENČÁKOVÁ et al., 2000, 2003; JASENČÁKOVÁ, 2003; LEWIN, 2004; LODISH et al., 2003; TURNER, 2001). A acetilação é catalisada por proteínas histona acetiltransferases (HAT) e as deacetilações pela família histona deacetilases (HDAC) (FUCHS et al., 2006; JASENČÁKOVÁ, 2003; JASENČÁKOVÁ et al., 2000). Em plantas, a acetilação aumenta nas eucromatinas e heterocromatinas na replicação durante o ciclo celular (FUCHS et al., 2006), e as NORs apresentam grandes quantidades de histonas acetiladas em cromossomos mitóticos (BELYAEV et. al., 1997 apud JASENČÁKOVÁ et al., 2003).

A metilação de histonas é catalisada pelas metiltransferases que tem como alvo determinados resíduos de arginina e de lisina, particularmente nas histonas H3 adicionando 1, 2 ou 3 grupos metil denominados como mono-, di- e tri-metilação, respectivamente (FUCHS, et al., 2006; JASENČÁKOVÁ, 2003; LAWRENCE et al., 2004; LEWIN, 2004; TURNER, 2001). Esta modificação está associada a inatividade transcricional, mas há exceções em que a metilação de histonas está correlacionada com sítios transcricionalmente ativos (FUCHS et al., 2006; JASENČÁKOVÁ, 2003; LAWRENCE et al., 2004; LEWIN, 2004; TURNER, 2001). Muitas destas modificações são específicas para eucromatina (H3K4me2) (FUCHS et al., 2006; LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004) e heterocromatina (H3K9Met1-2, H3K27Met1 e H4K20Met1), podendo exibir padrões de distribuição diferentes dependendo do tamanho do genoma (FUCHS et al., 2006).

A variedade das modificações e o elevado número de resíduos que podem ser modificados nas histonas - mais de 60 resíduos diferentes (KOUZARIDES, 2007) fornecem um "Código de Histonas", uma vez que a correlação dessas alterações e suas combinações de modificações determinam funções específicas (JASENČÁKOVÁ, 2003). A complexidade combinatória do código de histonas sugere que outras modificações podem ter funções na replicação da NOR ou outras funções nucleolares, mas estas podem variar entre as espécies (McKEOWN; SHAW, 2009). Embora os padrões de distribuição das modificações nas histonas não sejam conservados (FUCHS et al., 2006; LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004), a interação entre a metilação do DNA e a metilação de histonas é bem estabelecida em plantas (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

Normalmente, a quantidade dos genes de rRNA ativos é mantido através do ciclo celular. Todavia, essa taxa pode ser alterada por modificações na cromatina, resultante dos processos epigenéticos (JASENČÁKOVÁ, 2003). O controle epigenético é um mecanismo reversível, em que a forma modificada ou remodelada da cromatina pode ser devolvida ao seu estado original, quando a transcrição e/ou replicação estão completas. Portanto, tem papel na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação celular (FUCHS et al., 2006).

2.3 *locus* adicional de rDNA 45S

Todos os organismos superiores possuem ao menos um par de cromossomos que contêm os genes ribossomais e os expressam (HESLOP-HARRISON, 2000a). Em plantas, novos *loci* de genes ribossomais podem surgir por diferentes mecanismos ao longo da evolução, como a poliploidia (MONDIN, 2003), as recombinações desiguais (HESLOP-HARRISON, 2000a; RAINA; VERMA, 1979) e as translocações (RAINA; VERMA, 1979). Todavia, há evidências de que os sítios de rDNA 45S podem se mover no cromossomo, através dos elementos móveis, sem que ocorra translocações ou outros rearranjos cromossômicos (BELYAYEV et al., 2010; DUBKOVSKY; DVOŘÁK, 1995; RAINA; VERMA, 1979; RASKINA et al., 2008; SHISHIDO; SANO; FUKUI, 2000).

Esse tipo de mobilidade, descrito em muitas espécies diplóides de plantas, ocorre após um evento de transposição, onde o rDNA 45S pode assumir novas posições no complemento (SCHUBERT, 1984; SCHUBERT; WOBUS, 1985). A mobilidade ocorre quando os elementos de transposição En/Spm ativos, associado ao sítio ribossomal, carregam os fragmentos de rDNA 45S que serão amplificados no novo sítio inserido, originando um novo *locus* (RASKINA; BELYAEV; NEVO, 2004). Essas evidências foram observadas em NORs de *Allium cepa* L. e *A. fistulosum* L., baseada na variabilidade, tamanho, número e posição das NORs cromossômicas em cultivares de *A. cepa* e híbridos entre *A. cepa* e *A. fistulosum* (SCHUBERT, 1984; SCHUBERT; WOBUS, 1985).

Sítios adicionais de rDNA 45S tem sido descritos em várias espécies de *Crotalaria*. Além do sítio adicional descrito em *C. juncea* (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007), também foram encontrados sítios adicionais em *C. ochroleuca* (MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2011), *C. paulina, C. stipularia* e *C. incana* (MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2011). Embora estes sítios apareçam em espécies bastante relacionadas, os eventos de sua origem são independentes durante a diversificação do gênero, sugerindo que os eventos de transposição são recorrentes e independentes (MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2011; MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2011). No caso das espécies poliplóides, os sítios adicionais de rDNA são decorrentes primeiro da duplicação do número de cromossomos e não resultados de transposição (MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2011). Independentemente da forma de origem estes sítios podem ser funcionais ou não, aceitando-se que aqueles muito pequenos não são funcionais (MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007; MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2011).

Mecanismos de controle podem atuar para silenciar o rDNA 45S em espécies que possuem *locus* adicional (CAPERTA et al., 2002), pois raramente todos os *loci*/genes de rRNA são ativos simultaneamente. Estudos em *C. juncea* mostraram, por nitrato de prata, que nucléolos podem aparecer com marcação no *locus* adicional, e que a não formação de uma constrição secundária seja devido a expressão de um pequeno número de motivos do rDNA. Ou seja, a expressão de genes de rDNA 45S pode ocorrer sem que haja, necessariamente, a formação de uma constrição secundária (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

Com o grande conteúdo de genes de rRNA nos genomas eucarióticos, um mecanismo de compensação de dosagem regula o número de genes ativos. Ou seja, o controle transcricional do rDNA 45S é realizado através do ajuste no número de genes ativamente engajados na transcrição via remodelamento da cromatina, ou pelo ajuste na taxa de transcrição de cada gene ativo (JASENČÁKOVÁ, 2003; PIKAARD, 2000a; RAŠKA et al., 2004). A transcrição do gene ribossomal varia de acordo com a demanda para a produção de ribossomos e síntese protéica (LAWRENCE et al., 2004; passim; PIKAARD, 2000a; RAŠKA et al., 2004), sendo maior na divisão celular e em células não-diferenciadas. Desse modo, as evidências sugerem que os genes ribossomais são

regulados em dois níveis: i) controle de dosagem através do número de genes de rRNA expressos e, ii) modulação na frequência de iniciação da Pol I nos genes ativos (LAWRENCE et al., 2004; passim).

A atividade do rDNA e sua consequente prova citológica com a formação de constrição secundária (McCLINTOCK, 1934) não foi observada durante a obtenção de híbridos interespecíficos do gênero *Crepis*; na qual a NOR de espécies puras formam constrições secundárias, enquanto nos híbridos, a NOR de somente um parental forma a constrição (NAVASHIN, 1927). Este trabalho, utilizado para o estudo da evolução dos cariótipos através das NORs, denominou o fenômeno de ausência das constrições secundárias em um dos parentais de "differential amphiplasty", posteriormente renomeada a dominância nucleolar (PIKAARD, 1999, 2000a, 2000b).

A dominância nucleolar é um fenômeno observado em híbridos interespecíficos e alopoliplóides, na qual a NOR derivada de uma espécie parental é dominante sobre a outra (FLAVELL, 1989; LAWRENCE et al., 2004; LEWIS; CHEVERUD; PIKAARD, 2004; McSTAY, 2006; NAVASHIN, 1927). Esse mecanismo silencia os genes de RNAs ribossomais pela transcrição dos genes de um dos parentais, com o silenciamento total ou parcial dos genes do outro parental, resultante de modificações epigenéticas (PIKAARD, 1999, 2000a; RICHARDS, 2006). O mecanismo que torna uma NOR ativa na dominância nucleolar ainda não está claro. Porém sabe-se que em plantas, a NOR da mesma espécie é sempre silenciada, portanto sua expressão é independente dos efeitos maternos ou paternos, sugerindo que diferenças fundamentais ditam os sítios de rDNA dominantes e reprimidos em um híbrido, provavelmente devido às diferenças espécie-específicas nos sistemas de transcrição dos parentais (PIKAARD, 2000b).

Sabendo que a dominância nucleolar é controlada epigeneticamente, três hipóteses foram sugeridas para explicar o silenciamento dos genes ribossomais de um dos parentais: i) a de fatores de transcrição espécie-específica; e ii) a do desequilíbrio de enhancers (McSTAY, 2006; PIKAARD, 1999, 2000a, 2000b); e iii) do contexto cromossômico (PIKAARD, 2000b). A primeira hipótese propõe que a rápida evolução das seqüências regulatórias presentes nos IGSs não são, normalmente, reconhecidas pelos fatores de transcrição da Pol I de espécies não relacionadas devido à incompatibilidade, uma vez que a co-evolução dos fatores de transcrição ocorreu

independentemente. Desse modo, as sequências não reconhecidas pelos fatores de transcrição em um híbrido podem resultar no completo silenciamento dos genes de rRNA herdados deste genitor (PIKAARD, 2000b). Já na segunda hipótese, é proposto que diferenças no número de elementos repetitivos (enhancers) ou nas sequências localizadas nos IGSs resultam na maior afinidade dos fatores de transcrição pela NOR dominante, havendo uma competição entre os promotores e enhancers acessíveis aos fatores de transcrição, que estariam numa concentração limitada. Assim, a NOR que possuísse um maior número de promotores ou enhancers livres, ou uma maior afinidade dos enhancers em se ligarem aos fatores de transcrição, seria dominante sobre a outra NOR (LEWIS; CHEVERUD; PIKAARD, 2004; PIKAARD, 1999, 2000a, 2000b). A terceira sugere que o contexto cromossômico é mais importante do que a sequência do gene de rRNA, implicando em mecanismos que afetam toda a NOR ou até mesmo grandes domínios cromossômicos (PIKAARD, 2000b).

Estudos da expressão nucleolar em espécies diplóides puras com múltiplas NORs têm mostrado características relacionadas à dominância nucleolar de híbridos (CAPERTA et al., 2002; FLAVELL, 1989; LAWRENCE et al., 2004; LEWIS; CHEVERUD; PIKAARD, 2004). Hasterok e Maluszynska (2000) estudaram os meristemas das raízes primárias e adventícias de A. cepa que possui 2 pares de rDNA nos cromossomos 6 e 8. Nas raízes primárias, o sítio de hibridação com FISH correspondeu as marcações positivas por Ag-NOR, indicando atividade de todas NORs, podendo apresentar até 4 nucléolos. Enquanto nas raízes adventícias, apenas o locus com constrição secundária tem sinais de prata positivos, podendo ter no máximo 2 nucléolos por célula. A inatividade de um sítio de rDNA na raiz adventícia, ao longo do desenvolvimento da planta, está associada com a sua supressão, e pode ser explicada i) pela perda no número de cópias, ou ii) por ocorrer heterocromatização do locus, tornando o sinal da FISH menor no cromossomo metafásico. Portanto, a distribuição e a atividade diferenciadas entre as raízes, indicam uma mudança significativa na expressão dos genes de rRNA durante o desenvolvimento da planta. Essa diminuição na atividade de um par do rDNA 45S na raiz adventícia pode resultar da metilação do DNA, um mecanismo comum na regulação gênica.

Em organismos que contêm múltiplas NORs, mecanismos de controle podem atuar para silenciar uma NOR (CAPERTA et a., 2002). Os genes de rRNA possuem sequências idênticas, diferindo na organização da sua cromatina, tornando-os ativos ou inativos. O nível de associação da Pol I com a cromatina pode depender do nível de metilação da citosina presentes nas sequências do rDNA, da remodelação e modificações dos promotores na cromatina e sequências codantes (McKEOWN; SHAW, 2009; passim).

O tratamento com inibidores das DNA metiltransferases (5'-aza-2'desoxicitidinaaza-dC) acarreta na perda do silenciamento de genes ribossomais (LAWRENCE et al. 2004). A utilização de inibidores em espécies com dominância nucleolar resulta na reativação da NOR suprimida, como também no aumento da expressão da RON dominante (CAPERTA et al., 2007; LAWRENCE et al., 2004). Esses estudos têm sugerido que o silenciamento do gene ribossomal é consequência direta da metilação das citosinas. Estes genes podem mostrar diferentes níveis de metilação, e isso pode ser um determinante essencial da dominância nucleolar (LAWRENCE et al., 2004). Todavia, a metilação do rDNA é apenas um aspecto da cromatina, que podem estar envolvido na dominância nucleolar (PIKAARD, 1999). Estudos complementares mostraram que outros aspectos da organização da cromatina podem estar envolvidos, especialmente as diferentes modificações das histonas (JASENČÁKOVÁ, 2000, 2003; McKEOWN; SHAW, 2009; passim), pois a metilação do DNA não explica a dominância nucleolar em todos os organismos (PIKAARD, 1999, 2000a, 2000b; PREUSS; PIKAARD, 2007).

Em estudos realizados por Lawrence et al. (2004), relacionando acetilação/desacetilação das histonas e a desmetilação do DNA com a dominância nucleolar através dos inibidores de histonas desacetilases (butirato de sódio ou tricostatina A - TSA) e de metilação de DNA (5-Azacetidina – aza-dC), verificou-se que era possível a reativação de NOR silenciada a partir de drogas que promovem a desacetilação de histonas e a desmetilação do DNA. A observação de genes ativos mostrou um DNA hipometilado e associado com histonas H3 e H4 acetiladas, e também a trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3). Enquanto em genes silenciados o DNA está hipermetilado e associado às metilações da H3, como nas lisinas 9, 20 e 27.

Concluindo-se, então, que o estado da organização da cromatina dos genes de rRNA está envolvido na expressão gênica e, consequentemente, na dominância nucleolar (LAWRENCE et al., 2004).

Segundo Pikaard (1999), os mecanismos que controlam o número de genes de rRNA ativos em espécies puras são os mesmos mecanismos responsáveis pela dominância nucleolar em híbridos. Hipótese elucidada em estudos epigenéticos, em que a NOR dominante em híbridos são superexpressos por aza-dC ou TSA com a reativação da NOR reprimida, sugerindo que ambas as classes de genes estão sujeitos aos mesmos mecanismos de regulação negativa. Porém, os mecanismos que discriminam qual conjunto rRNA parental é dominante ou silenciado ainda não estão claros (PIKAARD, 2000b).

As evidências sugerem que a metilação de citosinas e a desacetilação de histonas são modificações complementares no silenciamento dos genes de rRNA e na dominância nucleolar no nível estrutural da cromatina (LAWRENCE et al., 2004; McSTAY, 2006). Desse modo, o conhecimento da relação entre a expressão dos genes ribossomais com as estruturas nucleares e cromossômicas permitiu o avanço nos estudos sobre a expressão gênica e os mecanismos epigenéticos envolvidos no seu controle (PIKAARD, 1999; LAWRENCE et al., 2004), contribuindo para o entendimento de como a dominância nucleolar é estabelecida (PIKAARD, 2000a, 2000b; McSTAY, 2006). Além de oferecer um excelente sistema modelo para a compreensão de compensação de dosagem em espécies puras de plantas (McKEOWN; SHAW, 2009).

2.4 Por que utilizar *Crotalaria juncea* para estudos do controle genético e epigenético do *locus* de rDNA 45S?

O gênero *Crotalaria*, pertencente à família Leguminosae e subfamília Papilionoideae, tem como principal característica a grande diversidade de espécies, com distribuição pelas regiões tropicais e subtropicais, principalmente no continente africano, onde cerca de 550 espécies foram descritas. O continente Americano é considerado um centro secundário de diversidade com cerca de 70 espécies descritas, dentre as quais 31 são endêmicas do Brasil (POLHILL, 1982; FLORES; MIOTTO, 2005; FLORES, 2004), onde predominam em habitat com alta incidência de luz como cerrados e campos (POLHILL, 1982; FLORES, 2004).

Este gênero tem grande importância na agricultura pela sua utilização nas regiões tropicais como adubo verde na fixação do nitrogênio atmosférico, para cobertura do solo no combate a erosão e no controle fitossanitário contra nematóides; na indústria se destaca na produção e extração de fibras têxteis e de celulose de alta qualidade (POLHILL, 1982); mais recentemente a indústria farmacêutica tem voltado à atenção para o gênero, principalmente pelo isolamento de alcalóides com princípios antiinflamatórios e anti-hepatotóxicos, além dos extratos que comprovadamente combatem o câncer de pulmão (AHMED; AL-HOWIRINY; MOSSA, 2006; AMABILE; FANCELLI.; CARVALHO, 2000; CACERES, 1995; DOURADO; SILVA; BOLONHEZI, 2001; WANG; SIPES.; SCHMITT, 2001; PERIN et al., 2004; PROCÓPIO et al., 2004).

A descrição de espécies do gênero e a sua organização botânica foram baseadas nas características morfológicas e presença de apêndices e peças florais, que permitem um maior ou menor grau de especialização à polinização cruzada (realizada por insetos). Estas características florais permitiram que as espécies fossem agrupadas em seções e subseções botânicas e o gênero pudesse ser dividido em dois grupos principais: seções sem especialização floral e com especialização floral (BISBY; POLHILL, 1973; POLHILL, 1982; FLORES; MIOTTO, 2003; FLORES, 2004).

Apesar da importância e da diversidade do gênero, pouca atenção foi dada a caracterização citogenética. Até recentemente, os estudos estavam restritos a contagem do número de cromossomos e a descrição de cariótipos. Estudos iniciados por Senn (1938, apud ATCHINSON, 1950) sobre o número de cromossomos permitiram o estabelecimento do número básico de cromossomos do gênero como x=8 e poliplóides múltiplos de x=8 (2n=4x=32) predominantes no continente Americano, com a exceção de um grupo de espécies e subespécies africanas (seção Chrysocalycinae, subseção Incanae) que possui x =7 (*C. incana*) (ATCHINSON, 1950; BOULTER et al., 1970; FLORES et al., 2006; MONDIN, 2003; MORALES, 2008; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999). Essas variações no número cromossômico geraram estudos, cuja finalidade foi explicar a origem das espécies com x=7 através da mitose e meiose, bem como a divisão e a evolução do gênero.

Análises citogenéticas do gênero *Crotalaria* mostraram um padrão caracterizado pela constrição secundária localizada no par cromossômico 1 (ALMADA; DAVIÑA; SEIJO, 2006; FLORES, 2004; FLORES et al., 2006; GUPTA; GUPTA, 1978a, 1978b; MONDIN, 2003; MONDIN et al., 2007a; 2007b; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999; PALOMINO; VÁZQUEZ, 1991; RAINA; VERMA, 1979; VERMA et al., 1984), e o predomínio de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, com um decréscimo gradual do tamanho dos mesmos.

Gupta (1976) realizou um estudo que estimava o conteúdo de DNA, a área e a massa seca nuclear de 13 espécies do gênero *Crotalaria. C. juncea* (2n=16) mostrou uma baixa densidade relativa de DNA em relação ao seu conteúdo (1C) de 1,23 pg (1198 Mpb), porém com o maior conteúdo de DNA por área de núcleo das espécies analisadas. Observou-se que a massa seca nucleolar não depende do conteúdo de DNA nuclear, sendo o número de repetições das sequências *in tandem* do rDNA o responsável pela variação no conteúdo nucleolar.

Estudos mais aprofundados no gênero *Crotalaria* foram realizados por Mondin (2003), com o emprego de técnicas mais avançadas corroborando para uma maior elucidação de dados antes não confirmados. Através das técnicas de bandamento cromossômico (fluorescente e Ag-NOR) e mapeamento físico de rDNA 45S e 5S por hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH) pôde-se traçar um panorama mais detalhado sobre a organização dos cromossomos e a evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* (MONDIN, 2003; MONDIN et al., 2007a; 2007b). No caso específico de *C. juncea,* o rDNA 45S foi mapeado na constrição secundária e nas heterocromatinas adjacentes do braço curto do cromossomo 1, e o rDNA 5S no braço longo. Além disso, foi mapeado um sítio adicional de rDNA 45S no braço curto do cromossomo 4, podendo este apresentar atividade transcricional, pois em algumas metáfases o sítio adicional encontrava-se marcado pela prata. O bandamento com fluorocromos revelou que o rDNA 45S são CMA+ e CMA/DA+, e as heterocromatinas pericentroméricas são CMA⁺ e CMA/DA⁻, sugerindo uma diferenciação no conteúdo de GC ou nos resíduos de AT (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

O rDNA 45S quando ativo, é um importante componente organizador do nucléolo (PIKAARD, 1999; 2000a), e da formação das constrições secundária em

cromossomos metafásicos (NAVASHIN, 1927; McCLINTOCK, 1934, PIKAARD, 1999; 2000a; 2000b). Ou seja, NORs inativas não formam constrições secundárias, não têm fatores de transcrição Pol I associados, e não se cora com Ag-NOR (CAPERTA et al., 2002). Estudos de Mondin; Santos-Serejo; Aguiar-Perecin (2007) demonstraram que a expressão de genes de rDNA 45S pode ocorrer sem que haja, necessariamente, a formação de uma constrição secundária. Nesse estudo os autores mostraram que os núcleos interfásicos em *C. juncea* são multinucleolados, porém não havia formação de constrição secundária no cromossomo portador do *locus* adicional de rDNA 45S.

Verma; Raina (1981) estudaram 35 espécies do gênero *Crotalaria*, sendo que *C. agatiflora* apresentou uma variação no número e tamanho de nucléolos, supondo que os rDNAs funcionam de acordo com o tamanho de cada sítio. A presença de nucléolo adicional tem sido atribuída a hibridação entre cinco subespécies, e consequente, dispersão de intermediários nas áreas adjacentes onde *C. agatiflora* selvagem cresce. Como não há registros de híbridos no gênero *Crotalaria* os autores não conseguiram sustentar suas conclusões, pois as características observadas são dominância nucleolar presentes em híbridos, segundo dados publicados por outros pesquisadores na época.

Mediante os estudos expostos acima, este projeto tem como objetivo entender o controle genético e epigenético do *locus* adicional de rDNA 45S de *C. juncea*. O estudo foi realizado em células sincronizadas do meristema da raiz fazendo com que as células se dividissem todas ao mesmo tempo, sendo possível determinar as fases do ciclo celular em que se encontram os nucléolos. Foram utilizadas as metodologias de Bandamento Ag-NOR que determinou se o *locus* está ativo ou não, FISH com sonda de rDNA 45S que identificou com precisão cada cromossomo e seus *loci,* e imunocitoquímica das modificações de histonas e da metilação do DNA. Estes resultados contribuíram para um melhor entendimento sobre o controle genético e epigenético da expressão nucleolar.

34

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

No presente trabalho foi estudado um acesso de *Crotalaria juncea* L., pertencente a seção Calycinae da família Leguminosae-Papilionoideae. As sementes foram cedidas pela Pirahy Sementes (Piracicaba-SP), multiplicadas e armazenadas no banco de sementes do Departamento de Genética – ESALQ / USP (acesso CJ-1). *C. juncea* é uma espécie cultivada facilmente encontrada em estradas, terrenos, e com grande importância agrícola. Seu centro de origem é a Índia, portanto é uma espécie introduzida no Brasil, a qual foi classificada e sua exsicata depositada no Herbário Alexandre Leal Costa, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (ALBC-22976) (LEWIS, 1987, apud MONDIN, 2003).

3.2 Métodos

3.2.1 Germinação

As sementes foram germinadas de acordo com o procedimento descrito por Cuco et al., (2003), que resumidamente, consiste na escarificação das sementes em ácido sulfúrico puro por tempo variando de 15 a 20 minutos e posterior lavagem em água corrente por pelo menos 5 minutos para retirada do ácido. As sementes escarificadas foram secas ao ar por 24 horas após a lavagem e armazenadas a 4°C. Para a germinação, as sementes escarificadas foram colocadas em placa de Petri com papel de filtro umedecido em água até emitirem a raiz. Após esse processo elas foram semeadas em *Sphagnum* umedecido sob temperatura controlada de 28 a 30°C até a raiz atingir o tamanho de 1 cm, quando então realizou-se as coletas e os pré-tratamentos quando necessários.

3.2.2. Sincronização Celular

Neste presente trabalho foram determinadas as condições ótimas para a eficiente sincronização do ciclo celular em células meristemáticas de raízes de *Crotalaria juncea*. A sincronização celular foi realizada em raízes de sementes recém
germinadas com no máximo 1 cm de comprimento e selecionadas, de acordo com a sua morfologia. As raízes foram incubadas em uma solução oxigenada de hidroxiuréia (HU), e após o tempo de exposição à droga, as raízes foram lavadas em água destilada para retirar o excesso da droga e iniciar a recuperação do ciclo celular em água e *Sphagnum* (Tabela 1).

Recuperação em Sphagnum														
[HU]*		[1,25mM]				[2,50mM]								
Exposição														
à HU*	18h	19h	20h	21h	22h	23h	24h	18h	19h	20h	21h	22h	23h	24h
Tempo de		deale	deale		deale	d. d.	dada	deale	d. d.	d. d.	d. d.	d. d.		d. d.
coleta	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
				R		eraçã	o em	Água						
[HU]*		[1,25mM]					[2,50mM]							
Exposição														
à HU*	18h	19h	20h	21h	22h	23h	24h	18h	19h	20h	21h	22h	23h	24h
Tempo de	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
coleta														

Tabela 1 – Sincronização de acordo com as concentrações, tempo de exposição à droga, e os tempos de coleta

*[HU]: concentração de hidroxiuréia;

**Tempo de coleta: 0; 15 min; 30 min; 45min; 1 h; 1h e 15 min; 1h e 30 min, 1h e 45 min; 2 h; 2 h e 15 min; 2 h e 30 min; 2 h e 45 min; 3 h; 3 h e 15 min; 3 h e 30 min; 3 h e 45 min; 4 h; 4 h e 15 min; 4 h e 30 min; 4 h e 45 min; 5 h; 5 h e 15 min; 5 h e 30 min; 5 h e 45 min; 6 h; 6 h e 15 min; 6 h e 30 min; 6 h e 35 min; 6 h e 40 min; 6 h e 45 min; 6 h e 50 min; 6 h e 55 min; 7 h.

As coletadas foram realizadas em tempos específicos do ciclo, logo após a exposição e fixadas em Carnoy (3 partes de álcool etílico : 1 parte de ácido acético) (Tabela 1) (DOLEŽEL et al., 1999; KAEPPLER, H. F.; KAEPPLER, S. M., 1997; MENGES; MURRAY, 2002; NEUMANN; NOUZOVÁ; MACAS, 1998; PLANCHAIS et al., 2000; TORRES; DAVIDE; BEARZOTI, 2003). A análise das concentrações, tempo de exposição à droga, bem como os tempos de coleta da sincronização foram feitas com

pontas de raízes coradas pelo método de Feulgen, para posterior análise dos nucléolos corados com nitrato de prata.

3.2.3 Pré-tratamento de raízes com inibidores do fuso mitótico

As pontas de raízes coletadas foram pré-tratadas com solução de hidroxiquinolina a 300 ppm + cicloheximida a 6,25ppm durante 1 hora e 30 minutos (CUCO et al., 2003). Este pré-tratamento tem como finalidade a inibição da polimerização das fibras do fuso, permitindo assim a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de cromossomos em prometáfase e metáfase com nitidez de sua morfologia. Após o pré-tratamento os materiais foram fixados por 24 horas em solução de Carnoy (3 partes de álcool etílico : 1 parte de ácido acético). As raízes destinadas à coloração convencional pelo método de Feulgen foram transferidas para uma solução de álcool a 70%, após a fixação; e aquelas destinadas ao bandamento Ag-NOR e hibridação molecular *in situ* (FISH) foram mantidas no fixador e conservadas em congelador a -4°C (MONDIN, 2003).

O material destinado a imunocitoquímica, com ou sem tratamento com inibidores de fuso foi fixado em uma solução a base de inibidores de proteinases para a conservação das estruturas protéicas. O fixador utilizado foi aquele descrito por Saleh; Alvarez-Venegas; Avramova (2008) com algumas modificações, com paraformaldeído na concentração final de 4%, denominado de Buffer Cross-link. A fixação foi realizada em câmara à vácuo pelo período de 10 minutos, e a seguir as raízes foram lavadas em Buffer Cross-link (sem paraformaldeído) por 10 minutos também em câmara a vácuo, sendo imediatamente utilizadas nas preparações das lâminas (BANNISTER; KOUZARIDES, 2005; SALEH; ALVAREZ-VENEGAS; AVRAMOVA, 2008).

3.2.4 Coloração pelo método de Feulgen

Para a reação pelo método de Feulgen o material conservado em álcool a 70% foi retirado do congelador para atingir temperatura ambiente, e lavado em água destilada duas vezes por 5 minutos cada. Após a lavagem as raízes foram hidrolisadas em ácido clorídrico 1N pré-aquecido a 60°C por 8 minutos, e novamente lavadas em água destilada duas vezes por 5 minutos cada, e transferidas para o reativo de Schiff. A

reação com reativo de Schiff foi realizada em câmara escura por 45 minutos à temperatura ambiente, e a seguir as raízes foram lavadas em água corrente em placas de Petri para retirada do excesso do reativo e revelação da cor.

3.2.5 Preparação de lâminas

Para a preparação de lâminas, tanto sem coloração quanto coradas pelo método de Feulgen, as raízes foram lavadas duas vezes por 5 minutos cada em tampão citrato (0,01M, pH 4,6) e colocadas em microtubos com solução enzimática contendo celulase [9,2 units.ml⁻¹] + pectinase [14,7 units.ml⁻¹] pré-aquecidas a 37°C, durante 40 minutos. Após a digestão, as raízes foram lavadas novamente em tampão citrato gelado duas vezes por 5 minutos cada, e mantidas geladas sobre um bloco de gelo. A raiz foi colocada em ácido acético 45% de 3 a 5 minutos e transferida para a lâmina, onde o meristema foi dissociado e coberto com lamínula. O meristema foi esmagado para promover o espalhamento das células e dos cromossomos.

As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico, sendo suas lamínulas removidas em ácido acético a 45% e montadas com Entellan (Merck).

As lâminas sem coloração utilizadas para a FISH, Metilação de DNA e bandamento Ag-NOR foram observadas em microscópio de contraste de fase, sendo suas lamínulas retiradas em nitrogênio liquido e secas ao ar. Após secas, as lâminas foram utilizadas ou então guardadas em cubas com sílica em gel mantidas a -20 °C.

3.2.6 Bandamento Ag-RON

A metodologia utilizada para a coloração de lâminas com nitrato de prata foi baseada no protocolo de Howell; Black (1980) modificada por Mondin (2003). O material utilizado foram raízes sincronizadas coletadas nos tempos descritos anteriormente, conservados em fixador até seu uso; e as soluções utilizadas no bandamento foram feitas imediatamente antes do uso.

Sobre a lâmina preparada e seca aplicou-se uma gota (pipeta Pasteur) da solução de nitrato de prata a 50% em água e duas gotas de uma solução coloidal (gelatina incolor) contendo ácido fórmico a 1%. A lâmina coberta com lamínula foi incubada em câmara úmida a 60°C, por 8 minutos. Após a incubação, a lamínula foi

removida e a lâmina lavada em água deionizada, seca ao ar e montada com Entellan (Merck).

3.2.7 Hibridação in situ fluorescente (FISH)

3.2.7.1 Sondas

A sonda de rDNA 45S utilizada foi a sequência do gene de rRNA 18S-5.8S-25S (unidade de 9,1 kb de milho), clonada no plasmídeo pUC8 no sítio Eco RI, cordialmente cedida pelo Dr. R. L. Phillips (University of Minnesota, EUA).

3.2.7.2 Hibridação molecular in situ (FISH) das sondas de rDNA 45S

A hibridação *in situ* consistiu, resumidamente, nas lavagens pré-hibridação com RNase (5µg/µl) e pepsina (5µg/µl), para remoção do RNA e do excesso de proteínas do material. Em seguida, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% e desidratadas em uma série alcoólica (70%, 96% e 100%) (CUCO et al., 2005; MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

A solução de hibridação, constituída da mistura de hibridação (50% formamida, 2xSSC, 10% dextran sulfato, 0,1% SDS, 1 mg/ml de "herring sperm DNA") e de 5 ng/µl da sonda de rDNA 45S, foi desnaturada a 95-98°C, por 10 minutos e imediatamente imersa em gelo. Foram aplicados 20 µl da solução de hibridação sobre as preparações cromossômicas após a sua desnaturação, e estas cobertas por lamínula, foram levadas ao termociclador (PTC-100, MJ). As lâminas foram aquecidas a 92°C por 10 minutos e imediatamente incubadas a 37°C por pelo menos 16 horas para a hibridação da sonda. Após a hibridação, as lâminas passaram pelas lavagens de estringência, sendo uma vez em 2xSSC a 42°C por 5 minutos; duas lavagens com formamida a 20%/0.5x SSC a 42°C (74% de estringência) por 5 minutos e 0,5xSSC 42°C por 5 minutos. A sonda de rDNA de 45S, marcada com biotina (via nick translation), foi detectada com o anticorpo "mouse anti-biotin" (Dako) seguido dos anticorpos "rabbit anti-mouse"- TRITC (Dako), e "sheep anti-rabbit"- TRITC. As lâminas foram contra-coradas e montadas em uma solução de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) a 0,2 µg/ml e Vectashield H-1000.

3.2.8 Imunocitoquímica

3.2.8.1 Anticorpos

Os anticorpos primários (Upstate) utilizados para a detecção das modificações N-terminais das histonas são específicos para lisinas acetiladas e metiladas:

- anti- histona H3 acetilada na Lys 14
- anti- histona -H3 dimetilada na Lys 9
- anti- histona -H3 monometilada na Lys 9
- anti- histona H4 acetilada na Lys 8

Os anticorpos primários foram detectados por um anticorpo secundário 'mouse anti-rabbit IgG' conjugado com TRITC.

O anticorpo policional primário (Fitzgerald) utilizado para a detecção da metilação do carbono 5' da citosina - anti-5'-metilcitosina (5-MC)- foi detectado pelo anticorpo secundário Rabbit-anti-Sheep conjugado com FITC.

3.2.8.2 Preparação de lâminas para imunocitoquímica de modificações Nterminais das histonas H3 e H4

Para a preparação de lâminas, as raízes foram retiradas do Buffer Cross-Link e colocadas em microtubos com solução enzimática (celulase a 9,2 units.ml⁻¹ + pectinase a 14,7 units.ml⁻¹) pré-aquecidas a 37°C, durante 40 minutos. Após a digestão, as raízes foram lavadas em 1xPBS gelado duas vezes por 5 minutos cada, e mantidas geladas sobre um bloco de gelo. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em que a raiz foi colocada sobre a lâmina, e o meristema foi dissociado em 1xPBS, o material foi coberto com lamínula, e esmagado entre papel de filtro para retirar o excesso de líquido e promover o espalhamento das células e dos cromossomos. As lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sendo suas lamínulas retiradas em nitrogênio liquido e secas ao ar. Após secas, as lâminas foram imediatamente imunodetectadas com anticorpos específicos para as modificações das histonas.

Todos os passos da imunodetecção foram realizados em uma câmara úmida a 37°C durante 1 hora. O primeiro passo da imunodetecção foi o bloqueio das lâminas em

solução de BSA a 1% em 1xPBS. Posteriormente, foi aplicado sobre as lâminas o anticorpo primário (1:200) por 1 hora, e a seguir as preparações foram lavadas 2 vezes em 1xPBS por 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (1:100) por 1 hora, e lavadas 2 vezes em 1x PBS por 5 minutos cada. As lâminas foram contra-coradas e montadas em uma solução de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) a 0,2 μg/ml e Vectashield H-1000.

3.2.8.3 Imunocitoquímica para metilação de DNA com anti-5'-metilcitosina

A imunocitoquímica para metilação de DNA seguiu o protocolo descrito por Andrade; Fernandes; Mondin (2009). Em lâminas previamente preparadas (item 3.2.5) e armazenadas a -20°C. A imunodetecção da metilação da citosina do DNA inicia-se com a desidratação das lâminas em uma série alcoólica (70%, 96% e 100%) por 2 minutos em cada e secas ao ar, ou imediatamente após as mesmas terem sido preparadas. Após secas as lâminas foram colocadas em uma chapa a 60°C por 30 minutos, e lavadas 2 vezes em 1xPBS por 5 minutos cada. As lâminas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 5 minutos a temperatura ambiente, e a seguir lavadas 2 vezes em 1xPBS por 5 minutos cada, e novamente passadas em série alcoólica 70%, 90%, 100% por 2 minutos em cada e secas ao ar. As preparações cromossômicas foram desnaturadas aplicando-se sobre as lâminas uma mistura de hibridação pura (não contendo sondas) e incubando-as em placa aquecedora a 75°C por 10 minutos. A seguir as lâminas foram imediatamente imersas em solução 1xPBS gelada (ao redor de 1°C) e mantidas nesta solução por 5 minutos, repetiu-se a lavagem nas mesmas condições mais uma vez.

Todos os passos da imunodetecção foram realizados em uma câmara úmida a 37°C durante 1 hora. O primeiro passo da imunodetecção foi o bloqueio das lâminas em solução de BSA a 1% em 1xPBS. Sobre as lâminas foi aplicado o anticorpo primário "sheep anti-5'-metilcitosina" (1:100) por 1 hora, e a seguir lavadas 2 vezes em 1X PBST 0,03% por 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário "rabbit anti-sheep"- FITC (1:50) por 1 hora, e lavadas 2 vezes em 1X PBST 0,03% por 5 minutos cada. As lâminas foram contra-coradas e montadas em uma solução de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) a 0,2 μg/ml e Vectashield H-1000.

3.2.9 Fibra de DNA estendida (Fiber FISH)

3.2.9.1 Extração de núcleos

Fibras estendidas de DNA foram obtidas a partir da adaptação do protocolo descrito por Kuhn et al. (2008). Para isolamento dos núcleos foram utilizados aproximadamente 5 g de folhas jovens e frescas do acesso CJ-1 de C. juncea. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e o material transferido para microtubos contendo 500 µL de tampão NIB (10 mM Tris-HCl pH 9.5, 10 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5 M sacarose, 4 mM spermidine, 1 mM spermine). A solução foi homogeneizada e mantida em gelo por 5 minutos. Após a incubação em gelo a solução foi filtrada em malha de nylon de 80 µm (Millipore). À solução filtrada foram adicionados 25 µL do tampão NIB + Triton X-100 (concentração final de 0,5%); a seguir o material foi homogeneizado e centrifugado a 2000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 500 μL de tampão NIB + β-mercaptoetanol (concentração final de 0,1%); a solução foi filtrada em malha de nylon de 60 µm. À solução filtrada foram adicionado 2,5 µL de NIB + Triton X-100 e centrifugada por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 200 µL de uma mistura 1:1 NIB : glicerol (100%). Nesta solução os núcleos podem ser estocados a -20 oC até o momento da preparação das lâminas.

3.2.9.2 Extensão das fibras de DNA

Para a extensão das fibras de DNA foram utilizados 6 μ L da suspensão nuclear (estoque NIB+glicerol) diluídos em 100 μ L de tampão NIB. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desartado e o *pellet* ressuspendido em 10 μ L de 1xPBS. Sobre uma lâmina tratada com poli-L-lisina foram adicionados 2 μ L da suspensão de núcleo, deixando se secar a ar por 5 minutos (solução torna-se gelatinosa). Sobre os núcleos secos aplicou-se 8 μ L do tampão de lise STE (0,5% SDS, 5 mM EDTA, 100 mM Tris pH 7,0) deixando agir por 4 minutos. A seguir com o auxílio de uma lamínula a solução foi arrastada sobre a lâmina de maneira lenta e constante, permitindo a extensão das fibras de DNA. As lâminas

foram secas ao ar por 10 minutos e a seguir fixadas em Carnoy (3:1, álcool etílico : ácido acético) por 10 minutos. Após a fixação as lâminas foram aquecidas a 60°C por 30 minutos e imediatamente utilizadas para FISH e imunodetecção.

3.2.9.3 Detecção da citosina metilada no rDNA 45S

As lâminas contendo as fibras estendidas foram fixadas em paraformaldeído 4%, e em seguida lavadas 3 vezes em 2xSSC por 5 minutos, e imediatamente desidratadas em uma série alcoólica (70%, 96% e 100%) por 2 minutos.

A solução de hibridação, constituída de (50% formamida, 2xSSC, 10% dextran sulfato, 0,1% SDS, 1 mg/ml de "herring sperm DNA"), com 10 ng/ml da sonda de rDNA 45S, foi desnaturada a 95-98°C, por 10 minutos e imediatamente imersa em gelo. Sobre as lâminas foram aplicados 40 µl da mistura de hibridação desnaturada, e estas foram cobertas por lamínula e levadas ao termociclador (PTC-100, MJ). O conjunto foi desnaturado novamente a 92°C por 10 minutos e imediatamente colocados a 37°C por pelo menos 16 horas. Após a hibridização, as lâminas passaram pelas lavagens: em 2xSSC a 42°C, 0,5xSSC a 42°C, e 2xSSC a temperatura ambiente por 3 minutos. Após o bloqueio foi aplicado sobre as lâminas o primeiro grupo de anticorpos, constituídos de "mouse anti-biotin" (1:200) e "sheep anti-5MC (1:100) e o material foi incubado em câmara úmida a 37°C por 1 hora. A seguir foi aplicado o segundo grupo de anticorpos, contendo "rabbit anti-mouse - TRITC" (1:100) e "rabbit anti-sheep - FITC" (1:50), e o material foi incubado novamente em câmara úmida a 37°C por 1 hora. As lâminas foram contra-coradas e montadas em uma solução de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) a 0,2 µg/ml e Vectashield H-1000.

3.2.10 Microscopia e análise de imagens

As imagens de núcleos e cromossomos foram capturadas por uma câmera CCD acoplada ao fotomicroscópio Zeiss Axiophot 2. Os materiais corados pelo método de Feulgen e pelo bandamento Ag-NOR foram digitalizados no programa IKAROS, e as lâminas com preparações fluorescentes foram digitalizadas pelo programa ISIS, ambos da Metasystem. As montagens das pranchas para todas as metodologias foram realizadas no programa Adobe Photoshop versão CS3 e Image J.

4 RESULTADOS

O processo de sincronização do ciclo celular utilizado foi baseado na inibição da síntese de DNA por hidroxiuréia (HU). Esta substância inibe de forma reversível a enzima ribonucleotídeo redutase, bloqueando as células em G₁/S da intérfase. Após sua remoção, o ciclo prossegue normalmente, com um número elevado de células em sincronia (DOLEŽEL et al., 1999; KAEPPLER, H. F.; KAEPPLER, S. M., 1997; MENGES; MURRAY, 2002; NEUMANN; NOUZOVÁ; MACAS, 1998; PLANCHAIS et al., 2000; TORRES; DAVIDE; BEARZOTI, 2003). A sincronização celular em *C. juncea* teve maior eficiência no acúmulo de células em metáfase no tempo de 6h e 30min após 18 horas de exposição à droga, na concentração de 1,25mM; apresentando menor toxidez e melhor recuperação após lavagens em água.

Após a determinação do ciclo celular em *C. juncea* foi realizado o bandamento Ag-RON que detecta a atividade gênica ribossomal (MONDIN, 2003), em células meristemáticas sincronizadas para todos os intervalos de coleta, conforme tabela 1. Esta metodologia permitiu analisar a atividade das NORs de acordo com o número e a morfologia dos nucléolos, observando-se o comportamento da nucleologênese ao longo do ciclo celular (Figura 2; 3; Tabela 2). A análise da expressão nucleolar durante o ciclo celular mostrou que o *locus* de rDNA 45S inicia sua atividade na telófase (Figura 3). No total de 30817 células analisadas, observou-se a predominância de 29841 (96,83%) de células com nucléolo grande e único. Além de núcleos com 2 nucléolos homomórficos (1,31%) e heteromórficos (0,22%), e também com 3 e 4 nucléolos de tamanhos distintos (Figura 2; Tabela 2), corroborando com Mondin (2003); Mondin; Santos-Serejo; Aguiar-Perecin (2007) de que há atividade do sítio adicional do cromossomo 4 em tempo específico do ciclo celular.



Figura 2 - Morfologia e número de nucleoli encontrados nas células meristemáticas sincronizadas em C. juncea. a) Nucléolo único, grande e resultado da fusão das regiões organizadoras do nucléolo ativas. b) Núcleo com um nucléolo maior resultado da maior atividade da NOR de um dos cromossomos do par 1 e um menor resultado da atividade reduzida do seu homólogo. Neste caso ambos os cromossomos 4 estão silenciados c) Núcleo apresentando dois nucléolos de tamanhos idênticos resultado da atividade da RON do par de cromossomos 1, antes da fusão dos nucléolos. Neste caso ambos homólogos 4 estão silenciados. d) Dois nucléolos grandes resultados da atividade da RON dos cromossomos homólogos 1 e um pequeno nucléolo resultado da atividade de um dos homólogos do cromossomo 4, o outro cromossomo do par está inativo. e) Observa-se um nucléolo maior resultado da fusão de ambos os cromossomos do par 1 e dois nucléolos menores, resultados da atividade da NOR do par de cromossomos 4. f-g) Núcleos com 4 nucléolos antes da fusão, sendo dois maiores resultados da atividade da NOR do cromossomo 1 e dois menores resultado da atividade da NOR do cromossomo 4, note que em g a atividade da NOR do cromossomo 4 é menor do que em f, onde percebe-se claramente que os nucléolos são menores. Neste último caso a figura g pode representar um estágio anterior a f onde a atividade da NOR ainda é inicial. Nota: Barra=10µm

Cada NOR ativa deve formar um nucléolo no núcleo (CAPERTA et al., 2002). Característica esta encontrada em *C. juncea*, em que NORs ativas tanto do sítio principal, quanto do sítio adicional formam seus respectivos nucléolos, os quais se fundem em um nucléolo único e grande (Figura 2a; 3), como observado na maioria dos núcleos interfásicos. Observaram-se também células, através da Hibridação Molecular *in situ* Fluorescente (FISH), com um nucléolo, o qual era formado pela atividade dos dois cromossomos do par 1 (Figura 4a-c). Os rDNAs 45S distendidos dentro do nucléolo, não estão arranjados ao acaso, ambos rDNA 45S do par 1, quando expressos em um único nucléolo ocupam lados opostos, formando territórios (domínios) (Figura 4a).



Figura 3 – Nucleologênese e comportamento dos nucléolos no ciclo celular de *C. juncea*, quando os 4 sítios de rDNA 45S são transcricionalmente ativos

Tabela 2 - Análise quantitativa dos nucléolos de acordo com seu número e morfologia durante o ciclo celular, visualizados através de bandamento Ag-NOR

(Continua)

	Quantidade e tamanho do nucléolo								
Tempo	1	1> e 1 <	2 iguais	1> e 2 <	2> e 1<	2>e 2<	4 iguais	TOTAL	
0	953 (96,95%)	12 (1,22%)	18 (1,83%)	1 (0,001017%)	0	0	0	983	
15 min	908 (96,60%)	18 (1,91%)	13 (1,38%)	1 (0,001064%)	0	0	0	940	
30 min	926 (95,46%)	27 (2,78%)	11 (1,13%)	4 (0,004124%)	2 (0,00206%)	0	0	970	
45 min	900 (95,44%)	37 (3,92%)	5 (0,53%)	1 (0,00106%)	0	0	0	943	
1 hr	910 (92,39%)	45 (4,57%)	14 (1,42%)	12 (0,01218%)	0	0	5 (0,005076%)	985	
1 hr e 15 min	918 (93,77%)	31 (3,17%)	29 (2,96%)	1 (0,001021%)	0	0	0	979	
1 hr e 30 min	901 (95,44%)	23 (2,44%)	20 (2,12%)	0	0	0	0	944	
1 hr e 45 min	900 (95,74%)	25 (2,66%)	15 (1,60%)	0	0	0	0	940	
2 hr	900 (93,95%)	40 (4,18%)	16 (1,67%)	2 (0,002088%)	0	0	0	958	
2 hr e 15 min	900 (95,54%)	25 (2,65%)	17 (1,80%)	0	0	0	0	942	
2 hr e 30 min	900 (96,67%)	21 (2,26%)	11 (1,18%)	0	0	0	0	931	
2 hr e 45 min	900 (92,40%)	51 (5,24%)	16 (1,64%)	7(0,007187%)	0	0	0	974	
3 hr	904 (94,96%)	32 (3,36%)	16 (1,68%)	0	0	0	0	952	
3 hr e 15 min	900 (97,72%)	14 (1,52%)	4 (0,43%)	0	0	0	0	921	
3 hr e 30 min	900 (96,77%)	26 (2,80%)	4 (0,43%)	0	0	0	0	930	
3 hr e 45 min	900 (97,51%)	21 (2,28%)	2 (0,22%)	0	0	0	0	923	
4 hr	900 (97,83%)	12 (1,30%)	8 (0,87%)	0	0	0	0	920	
4 hr e 15 min	900 (97,72%)	18 (1,95%)	3 (0,33%)	0	0	0	0	921	
4 hr e 30 min	900 (97,40%)	20 (2,16%)	4 (0,43%)	0	0	0	0	924	
4 hr e 45 min	900 (98,47%)	12 (1,31%)	2 (0,22%)	0	0	0	0	914	

	Quantidade e tamanho do nucléolo							TOTAL
Tempo	1	1> e 1 <	2 iguais	1> e 2 <	2> e 1<	2> e 2<	4 iguais	-
5 hr	900 (98,36%)	13 (1,42%)	2 (0,22%)	0	0	0	0	915
5 hr e 15 min	900 (97,30%)	23 (2,49%)	1 (0,11%)	0	0	1 (0,00108%)	0	925
5 hr e 30 min	900 (97,19%)	25 (2,70%)	3 (0,33%)	0	0	0	1 (0,00108%)	926
5 hr e 45 min	900 (97,19%)	20 (2,16%)	5 (0,54%)	1 (0,00108%)	0	0	0	926
6 hr	900 (98,58%)	10 (1,10%)	3 (0,33%)	0	0	0	0	913
6 hr e 15 min	900 (95,34%)	37 (3,92%)	7 (0,74%)	0	0	0	0	944
6 hr e 30 min	900 (98,58%)	10 (1,10%)	3 (0,33%)	0	0	0	0	913
6 hr e 35 min	900 (98,04%)	18 (1,96%)	0	0	0	0	0	918
6 hr e 40 min	900 (98,68%)	12 (1,32%)	0	0	0	0	0	912
6 hr e 45 min	900 (99,45%)	5 (0,55%)	0	0	0	0	0	905
6 hr e 50 min	900 (99,01%)	9 (0,99%)	0	0	0	0	0	909
6 hr e 55 min	900 (99,23%)	7 (0,77%)	0	0	0	0	0	907
7 hr	900 (98,90%)	8 (0,88%)	1 (0,11%)	0	1 (0,00109%)	0	0	910
TOTAL	29841 (96,83%)	707 (2,29%)	250 (0,81%)	28 (0,00091%)	3	1	6 (0,000195%)	30817

Tabela 2 - Análise quantitativa dos nucléolos de acordo com seu número e morfologia durante o ciclo celular, visualizados através de bandamento Ag-NOR (Conclusão)

Em células marcadas por FISH confirmou-se o número e a localização dos sítios de rDNAs 45S nos cromossomos de *C. juncea.* A FISH mapeou sinais de hibridação no par cromossômico 1 e 4 (Figura 4; 5), confirmando o sítio adicional de rDNA 45S na espécie diplóide, além da presença de constrições secundárias no braço curto do par de cromossomos 1 e ausência no braço longo do par 4 (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007; MONDIN et al., 2007b).

A medida da intensidade do sinal de hibridação da sonda de rDNA 45S nas NORs de 5 metáfases mostrou quantitativamente o tamanho destes sítios incluindo suas constrições secundárias quando detectáveis, através da área (μm²) e do valor da escala de cinza (IGL) (Tabela 3). As análises citológicas revelaram a diferença no tamanho do sinal da NOR entre o par 1 e 4 (Figura 4g; Tabela 3). As análises dos cromossomos do par 1, principal formador nucleolar, mostraram ocorrência de expressão diferencial decorrente da diferença no tamanho dos sítios (Figura 2; Tabela 3), que reflete diferença na extensão da constrição secundária (Figura 4g; 5), corroborando com a presença de nucléolos heteromórficos (Figura 2; Tabela 2).

No sítio adicional localizado no par 4, o padrão da FISH mostrou também uma diferença no tamanho do arranjo do rDNA 45S, e conseqüentemente uma diferença na expressão entre os cromossomos, pois a maquinaria de transcrição tem preferência pelo arranjo maior, o que pode ser claramente evidenciado pela maior frequência de células com 3 nucléolos (Tabela 2).

Cromossomo	Área (µm²)	Perímetro (µm)	IGL*	ID**				
1>	0,375	3,635	94,070	30951,2				
1<	0,277	2,656	109,294	28811,8				
4>	0,093	1,323	75,463	7188,6				
4<	0,066	0,9424	63,320	4169				

Tabela 3 - Medida da intensidade de sinal do sítio de rDNA 45S

*Densidade integrada

**Valor médio de cinza

Medida baseada em 32 pixels/µm

Em geral, NORs homólogas possuem comportamento idêntico em termos de expressão, fazendo com que as constrições secundárias homólogas sejam de tamanhos semelhantes (CAPERTA et al., 2002). No entanto, nossas análises citológicas revelaram constrições secundárias de tamanhos distintos, indicando níveis

de expressão dos genes de rRNA desiguais entre *loci* homólogos. Houve diferença de área das constrições secundárias entre os cromossomos do par 1, com razão da área (maior/menor) de 1,35 (Figura 4g; Tabela 3). E o *locus* 4, a razão da área (maior/menor) do sítio foi 1,41 (Figura 4g; Tabela 3). Os dados quantitativos de acordo com a intensidade de sinal pela FISH mostram um padrão de expressão diferencial das NORs. Essas características sugerem uma hierarquia de dominância nucleolar, em que os sítios competem pelos fatores transcricionais disponíveis (PIKAARD, 1999, 2000a), de acordo com a demanda metabólica da célula (PIKAARD, 2000a; RAŠKA et al., 2004), onde os arranjos maiores são privilegiados.

Nas células vegetais o padrão de organização habitual de uma NOR ativa na intérfase, visualizado por FISH, é uma marcação difusa pouco menos condensada e distendida (genes ativos), a partir do sítio adjacente heterocromatinizado (genes silenciados) (CAPERTA et al., 2002). Padrão observado nos núcleos interfásicos de C. juncea, onde visualizou-se os sítios ribossomais difusos e ativos dentro do nucléolo, com sua heterocromatina pericentromérica e peri-nucleolar fortemente marcadas e condensadas. A fibra de rDNA 45S ativa dentro do nucléolo apresentou regiões com sinal forte (possivelmente regiões mais condensadas) relacionadas com prováveis genes inativos, bem como regiões sem sinais de marcação por FISH (Figura 5g, 5i seta branca). Quando imunodetectada com 5-MC, essas fibras mostram-se metilação colocalizadas com as regiões marcadas com FISH, comprovando que há genes ribossomais inativos interdispersos na fibra ativa (Figura 5e-g; Tabela 4). O padrão de metilação do DNA está presente em todo núcleo, com marcas densamente fortes localizando prováveis regiões heterocromáticas (Figura 5b, 5d). O sítio adicional sítios ribossomais nas seguintes configurações: apresentou seus ambos heterocromatinizados (Figura 5a), ou um com heterocromatina e o outro com uma pequena região distendida, mostrando sua atividade ribossomal (Figura 4a, c, d, f). Na imunodetecção de citosinas metiladas, os sítios inativos do locus adicional estavam marcados com metilação (Figura 5a, 5d seta verde).

A análise das fibras estendidas revelam que o rDNA 45S é composto por regiões altamente metiladas, detectadas pelo anticorpo anti 5-MC, com regiões com baixo nível de metilação do DNA possivelmente relacionadas com os cístrons ativos

dentro do nucléolo. É observável regiões que não possuem nem marcação de rDNA 45S e nem da 5-MC, enquanto outras apresentam somente a 5-MC, mas não a hibridação da sonda de rDNA 45S (Figura 5j). Isto se deve ao fato da sonda utilizada ter alta homologia aos genes ribossomais, mas pouca homologia em relação ao espaçador não transcrito. Assim, pode-se concluir que na verdade estas regiões são exatamente os espaçadores não transcritos (IGS). Nota-se também que há uma pequena quantidade de sítios onde a marcação da sonda não se sobrepõe a marcação com a 5-MC. Estas regiões certamente indicam os genes que são ativos dentro do nucléolo. Estes genes ativos são flanqueados por longas regiões de genes ribossomais metilados, corroborando com a hipótese de que regiões ativas e silenciadas estão interdispersas na cromatina do interior do nucléolo. Podendo, assim concluir, que a quantidade de genes ativos é pequena mesmo dentro do nucléolo. A presença de citosinas metiladas no rDNA 45S mostra que os sítios ribossomais são controlados pela metilação do DNA. Há uma boa correlação entre os padrões de marcação da 5-MC com aquele padrão observado para as diferentes modificações de histonas, sendo possível uma inferência da sua correlação, ainda que indireta. As modificações de histonas associadas a atividade de genes e a cromatina mais relaxada, são as acetilações. Foram utilizadas anticorpos contra aceitações H4K8 (H4K8ac) e H3K14 (H3K14ac). A H4K8ac, apresentou forte marcação associada a cromatina nuclear, principalmente em regiões menos condensada. Entretanto, sua marcação dentro do núcleo é muito discreta e associada com fibras cromatínicas bastante finas (Figura 6 a-c). A marcação da modificação H3K14ac mostrou uma marcação menos intensa na cromatina nuclear, sendo fortemente detectada dentro do nucléolo. A modificação H3K14ac, mostrou-se bastante dinâmica no ciclo celular, sendo que diferente padrões de marcas foram encontradas de acordo com o estágio de desenvolvimento da célula. Em células que estão em fase final da interface, provavelmente entre o final do período S e início do G2, as marcação da H3K14ac apareceu fortemente associada a uma fibra mais densa dentro do nucléolo (Figura 6 d-f), enquanto em fases mais inicias do ciclo celular, final da telófase e início da fase S, esta modificação foi encontrada dispersa pelo nucléolo e associada a fibras mais finas da cromatina, indicando uma provável atuação no início da atividade nuclear. Em ambos os casos as acetilações não foram identificadas associadas com regiões de heterocromatina (Tabela 4).

As modificações de histonas associadas a inativação de genes e à cromatina mais compactada, são as metilações. Entretanto, nem todas as metilações estão associadas com inativação e compactação da cromatina, pois já foi demonstrada a relação destas modificações com a atividade de genes. Foram utilizadas duas modificações normalmente associadas à regiões heterocromáticas, normalmente encontradas em mamíferos, leveduras, camundongo e plantas, ambas modificando a lisina 9 da histona H3 com uma monometilação (H3K9Met1) e uma dimetilação (H3K9Met2). Um resumo das suas associações com as estruturas nucleares estão descritas na tabela 4. A H3K9Met1 mostrou marcação normalmente associada a cromatina nuclear, com padrão bastante disperso, não sendo visualizada marcas em regiões pouco condensadas, entretanto, não foi possível uma total correlação entre as regiões heterocromáticas e esta modificação, uma vez que muitas regiões condensadas não apresentaram marcas (Figura 7 a-c). A modificação H3K9Met1 não aparece associada ao interior do nucléolo, evidentemente, isto não excluiu a sua participação na cromatina nuclear. Em profáses mitóticas, nota-se que a H3K9Met1 delineia muito sutilmente o nucléolo e por isso sua presença não pode ser refutada. Além disso, nos cromossomos não é possível observar se esta alteração aparece relacionada com regiões de heterocromatina (Figura 7 d-f), e análises mais detalhadas serão necessárias. A marcação para identificação da modificação H3K9Met2 revelou um padrão totalmente distinto do esperado. Esta marca é fortemente associada com regiões de heterocromatina em plantas. No caso de C. juncea esta modificação aparece bastante homogênea ao longo do núcleo, com regiões conspícuas possivelmente associadas com regiões heterocromáticas. Entretanto, nota-se um acúmulo bastante grande desta marcação associada ao nucléolo. Este padrão foi observado tanto em células mononucleoladas, como nas multinucleoladas (Figura 7 g-m) com pouca variação no padrão de marcação ao longo do ciclo celular. A sua presença dentro do nucléolo poderia estar associada com as fibras que não estão se expressando, mas a marcação extremamente densa não permite uma clara correlação. Não se pode descartar também sua presença na cromatina ativa, uma vez que diferentes combinações de modificações produzem resultados distintos, o chamado código de histonas. Por se tratar de um padrão bastante novo, mais experimentos serão necessários para verificar a reprodutibilidade destas marcas associadas ao nucléolo.

Tabela 4 - Resumo do padrão de modificação de histona e distribuição da metilação de DNA

	rDNA 45S						
	Núcleo	Nucléolo	Par 1	Par 4	Heterocromatina		
5-metilcitosina	++	+	+	+	++		
H3K9Met	++	-	-	-	-		
H3K9Met2	+	++	+	+	*		
H3K14Ac	+	++	++	*	*		
H4K8Ac	++	-	-	-	*		

* Característica não observada



Figura 4 – FISH com sonda de rDNA 45S. a-c) célula interfásica onde observa-se claramente a formação de um território cromossômico do *locus* do par 1 dentro do nucléolo (setas). No *locus* do par 4, as duas heterocromatinas definem a posição de um nucléolo menor, não sendo possível a visualização da fibra em seu interior (cabeça de seta) decorrente de seu sítio pequeno, e seu homólogo localizado no pólo da célula aparece condensado e possivelmente inativo; d-f) célula interfásica com dois nucléolos e seus respectivos domínios cromossômicos. Um sítio adicional aparece ativo formando um nucléolo menor, definido pela presença de heterocromatinas adjacentes (cabeça de seta), com seu homólogo condensado e inativo (seta verde); g-i) metáfase mitótica mapeando as posições dos rDNAs 45S, observando-se claramente a distinção de tamanhos entre as constrições secundárias do par de cromossomos 1, e no cromossomo 4 nota-se que um dos cromossomos do par possui um sinal de hibridação maior. Nota: Barra=10µm



Figura 5 - Metilação de DNA nos sítios de rDNA 45S localizados via FISH. a-h) as células interfásicas mostram um padrão da metilação (seta), com heterocromatinas marcadas (cabeça de seta) no nucléolo e no locus adicional (seta e círculo); i) metilação das citosinas do DNA em cromossomos metafásicos, mostrando as heterocromatinas metiladas (cabeça de seta), e a visualização clara dos diferentes tamanhos dos sítios ribossomais pelo FISH 45S; j) metilação em fibra de DNA estendida mostrou genes ribossomais metilados (seta branca) e genes não marcados (seta azul). Nota-se também que regiões que não há metilação e sinal de FISH (seta vermelha). Nota: Barra=10μm



H3K14Ac

DAPI





Figura 6 - Imunodetecção de modificações nas caudas N-terminais das histonas. a-c) acetilação da lisina 8 da H4 (H4K8Ac) em célula interfásica mostra atividade gênica não associada ao nucléolo; d-i) acetilação da lisina 14 da H3 (H3K14Ac) na célula interfásica com um nucléolo; nota-se correlação com atividade transcricional dos genes ribossomais vista pela fibra hiperacetilada. O mesmo acontece com a célula com dois nucléolos, onde a modificação está associada com a atividade de ambos. Nota: Barra=10µm



Figura 7 – Imunodetecção de modificações nas caudas N-terminais das histonas. a-f) monometilação da lisina 9 da H3 (H3K9Met) em células interfásica e prófase mostram que a modificação não está associada com o nucléolo; g-m) dimetilação da lisina 9 da H3 (H3K9Met2) em células interfásicas com 3 e 1 nucléolos mostram que a modificação está associada ao nucléolo e a heterocromatinas dispersas pelo núcleo. Nota: Barra=10µm

5 DISCUSSÃO

5.1 Nucleologênese e o comportamento do nucléolo no ciclo celular

Estudos que envolvem estrutura e metabolismo de uma célula em uma fase específica ou não do ciclo celular são muitas vezes difíceis, pois o ciclo celular em tecidos somáticos é assíncrono. Diferentes tecidos têm sido utilizados para obtenção de células vegetais sincronizada artificialmente, dentre eles os meristemas radiculares, devido a sua alta taxa mitótica. O meristema fornece matéria-prima para uma variedade de estudos que vão desde a análise dos cromossomos a regulação no ciclo celular (DOLEŽEL et al., 1999).

Em C. juncea o meristema radicular foi sincronizado com a finalidade de se estudar a nucleologênese e o comportamento dos nucléolos no ciclo celular. Muitos trabalhos mostraram metodologias e soluções diferentes em diversas espécies de plantas. O índice mitótico bem como o tempo para obtenção do número máximo de células sincronizadas depende da espécie e da concentração de hidroxiuréia (HU). Em V. faba, raízes tratadas com hidroxiuréia a 2,5 mM acumulou células com índice mitótico entre 50-70% no tempo de recuperação de 8 horas, após 18 horas de exposição a droga, contrário aos resultados com concentração 1,25mM, em que ocorreu escape após 2 horas de recuperação (DOLEZEL et al., 1999). Já para S. cereale, raízes tratadas com hidroxiuréia a 2,5 mM acumulou células com índice mitótico entre 50-60% no tempo de recuperação de 6 horas, após 18 horas de exposição à droga (DOLEŽEL et al., 1999). Porém Kaeppler, H.F.; Kaeppler, S.M. (1997) sincronizaram meristemas radiculares de S. cereale com HU a 1,25mM durante 14 horas, e após 6 horas de recuperação, o índice mitótico foi maior que 60%. A diferença no índice mitótico entre as duas metodologias ocorreu, pois na concentração de HU a 2,5mM durante 18 horas, as células escaparam sincronicamente 2 horas antes da remoção do agente. O mesmo ocorreu com C. juncea, em que o melhor índice mitótico foi obtido com a concentração de HU a 1,25mM, 18 horas de incubação e 6 horas e 30 minutos de recuperação, ao contrário da concentração de 2,5mM.

Em espécies que possuem múltiplas NORs, os sítios adicionais são ativados devidos a maior demanda de ribossomos pela célula, de acordo com o estado fisiológico celular ou dos fatores externos (PIKAARD, 2000a; RAŠKA et al., 2004). Desse modo, o tamanho e forma do nucléolo dependem do estado funcional da célula. Isto sugere que os diferentes tipos de nucléolos refletem os diferentes níveis de atividade funcional (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). A presença de *locus* adicional de rDNA 45S ocorre em outras espécies do gênero, como *C. ochroleuca* (MORALES, 2008; MORALES; AGUIAR-PERECIN; MONDIN, 2011), *C. paulina, C. stipularia* e *C. incana* (MONDIN, 2003; MONDIN; AGUIAR-PERECIN, 2011), portanto o estudo sobre rDNA 45S visto em *C. juncea,* contribui para o entendimento do papel destes loci adicionais para a evolução da diversidade do gênero *Crotalaria* e de outras espécies de plantas e animais.

A coloração com nitrato de prata nas células sincronizadas mostrou a atividade dos sítios ribossomais e o comportamento dos nucléolos. A nucleologênese em *C. juncea* tem seu início no final da telófase, em que os 4 sítios de genes ribossomais podem ter atividade e formar até 4 nucléolos, os quais tendem a se fundir durante a interfase (DUNDR; MISTELI; OLSON, 2000; JASENČÁKOVÁ et al., 2000; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007). A expressão de genes de rRNA do *locus* adicional pode ocorrer sem que haja, necessariamente, a formação de uma constrição secundária. Isto decorre do fato da expressão ocorrer em um pequeno número de arranjos do rDNA, ou da sua atividade em uma fase específica do início do ciclo celular permitindo com que a condensação do pequeno sítio ocorra normalmente até a mitose (MONDIN, 2003; MONDIN; SANTOS-SEREJO; AGUIAR-PERECIN, 2007).

A Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) permitiu o detalhamento da arquitetura da cromatina, com a visualização dos territórios cromossômicos, mostrando que a cromatina não está organizada de forma aleatória dentro do núcleo (RABL, 1885), e consequentemente o rDNA 45S dentro do nucléolo. Pela mesma razão, explica-se a localização periférica do nucléolo, bem como a organização da cromatina quando dois *loci* são transcritos dentro de um único nucléolo (KURZ et.al., 1996), conjuntamente com o fato dos ribossomos terem que ser exportados para o citosol, onde são funcionais. A localização mais periférica do nucléolo permite que isso ocorra com o

menor gasto de energia possível. A organização em territórios cromossômicos é decorrente das mudanças na estrutura da cromatina através das modificações epigenéticas. Portanto, os mecanismos epigenéticos, além de controlarem a expressão gênica, organizam espacialmente a cromatina dentro do núcleo (KURZ et.al., 1996).

5.2 Controle epigenético da transcrição de genes de rRNA 45S

As modificações epigenéticas são mudanças herdáveis nos genomas, independentes de mudanças na sequência do DNA. A metilação e as modificações de histonas são mecanismos que regulam os processos nucleolares, como a transcrição, replicação (BARTOVÁ et al., 2010; JASENČÁKOVÁ, 2003; McSTAY; GRUMMT, 2008), e a organização da cromatina (KURZ et.al., 1996). Genes ribossomais são transcritos pela Pol I, sendo sua expressão regulada pelos fatores que modelam a cromatina e mecanismos epigenéticos específicos (McSTAY; GRUMMT, 2008). Desse modo, a transcrição do rDNA é resultado da interação entre a metilação das citosinas no DNA, modificações de histonas e os fatores de remodelamento da cromatina (BARTOVÁ et al., 2010; McSTAY; GRUMMT, 2008). A interação entre a metilação do DNA e a modificação de histonas (metilação de histonas) é bem estabelecida em plantas (LIPPMAN; MARTIENSSEN, 2004).

A metilação do DNA é parte do mecanismo de silenciamento na maioria das plantas, principalmente de genes e elementos móveis (MARQUES et al., 2011). Em *C. juncea* há um padrão de metilação do DNA no núcleo interfásico e nos nucléolos, bem como na sua heterocromatina pericentromérica e da NOR. Mesmo na fibra de rDNA 45S que está visível dentro do nucléolo, portanto ativa, há metilação de citosinas intercaladas, com espaços sem esse padrão onde, provavelmente, estão localizadas as alças de transcrição.

A metilação do DNA está associada à outra marca epigenética, a H3K9Met2 (LAWRENCE; PIKAARD, 2004; TARIQ; SAZE; PROBST, 2003). A metilação da H3K9 promove o recrutamento da HP1, uma proteína envolvida na formação da heterocromatina e no silenciamento gênico (JASENČÁKOVÁ, 2003; RICHARDS, 2006). A correlação encontrada entre a metilação do DNA e a H3K9Met2 está associada com o controle dos *loci* de rDNA 45S (PIKAARD, 2000; LAWRENCE et al., 2004; LAWRENCE; PIKAARD, 2004; TARIQ; SAZE; PROBST, 2003), como observado em *C. juncea*.

A acetilação de histonas é uma marca epigenética e, normalmente, está associada a expressão gênica, enquanto a desacetilação resulta em silenciamento e heterocromatinização (JASENČÁKOVÁ, 2003; JASENČÁKOVÁ et al., 2000; LEWIN, 2004; LODISH et al., 2003; TURNER, 2001). Acetilação ou desacetilação de lisinas das histonas, especialmente as histonas H3 e H4, controlam a atividade dos genes, alterando a acessibilidade dos sítios aos fatores de transcrição na superfície dos nucleossomos (JASENČÁKOVÁ, 2003).

A NoRC, um complexo composto pela ATPase SNF2h e 205-kDa (McStay and Grummt 2008), é responsável pela acetilação e metilação da H3K9, e pode reprimir a transcrição dos genes de rRNA pela desacetilação das histonas, e consequentemente a metilação do DNA e o silenciamento gênico (BÁRTOVÁ et al., 2010). Li et al. (2005) demonstrou que a NoRC também está associada com a replicação tardia de genes de rRNA, uma vez que o rDNA ativo é replicado primeiramente, enquanto os inativos são replicados no final da fase S.

A mono e dimetilação da lisina 9 da histona H3 marcam heterocromatina em angiospermas (FUCHS; JOVTCHEV; SCHUBERT, 2008). Nas células de *C. juncea,* a H3K9Met1 apresentou marcas fracas no nucléolo, enquanto no restante da cromatina nuclear sua marcação foi intensa. Já a H3K9Met2 apresentou marcação fortemente associada ao nucléolo, com alguns pequenos pontos heterocromáticos no núcleo. Pela observação entende-se que ambas metilações controlam heterocromatinas diferentes, ou seja, a H3K9Met2 controla principalmente heterocromatinas associados aos genes ribossomais, e a H3K9Met1 controla heterocromatinas não associadas ao rDNA. Entretanto, o alto nível de H3K9Met2 sugere que esta modificação pode ter algum tipo de papel na atividade nucleolar. No momento esta hipótese não pode ser comprovada, sendo necessários ensaios em outros estudos.

A heterocromatina em *Arabidopsis* é caracterizada por altos níveis de metilação da H3K9 nas regiões com DNA repetitivo *in tandem* e disperso. A eucromatina e o nucléolo não contem marcas de H3K9Met e metilação do DNA, enquanto a H4K8Ac marca rDNA heterocromático localizado fora do nucléolo (SOPPE et al., 2002). Já em *V*.

faba o nucléolo/NOR é intensamente marcado pela H3K14Ac, e a H4K8Ac apresenta marcação no nucléolo, eucromatina e heterocromatina, dependendo do estágio celular (JASENCAKOVA, 2003). Em *C. juncea* a H3K14Ac apresentou rDNA hiperacetilado dentro do nucléolo, com acetilações fracas no núcleo, como em *V. faba*. Já a H4K8Ac, o nucléolo não apresentou marcação dessa modificação ao contrário do núcleo, que apresentou hiperacetilação nas células interfásicas. A interação entre diferentes modificações fornece um "Código de Histonas", uma vez que as suas combinações determinam funções específicas (JASENČÁKOVÁ, 2003). Entretanto, acredita-se que o conjunto não seja homogêneo e estas possam variar entre as espécies (McKEOWN; SHAW, 2009).

5.3 Atividade ribossomal e a dominância nucleolar

Com o grande conteúdo de genes de rRNA nos genomas eucarióticos, um mecanismo de compensação de dosagem regula o número de genes ativos. Ou seja, o controle transcricional do rDNA 45S é realizado através do ajuste no número de genes a serem transcritos via remodelamento da cromatina, ou pelo ajuste na taxa de transcrição de cada gene ativo (JASENČÁKOVÁ, 2003; PIKAARD, 2000a, 2002; RAŠKA et al., 2004). A dominância nucleolar é um fenômeno de controle de dosagem através de mecanismos epigenéticos, que regula o número de genes ribossomais ativos de acordo com a demanda para a produção de ribossomos e síntese protéica (LAWRENCE et al., 2004; passim; PIKAARD, 2000a, 2002; RAŠKA et al., 2004; passim; PIKAARD, 2000a, 2002; RAŠKA et al., 2004; TUCKER; VITINS; PIKAARD, 2010).

A dominância nucleolar pode ser consequência de um processo regulatório que controla a dosagem de genes ribossomais em espécies puras (não híbridos) (PIKAARD, 1999, 2000b, 2002). Estudos sobre estes mecanismos epigenéticos em híbridos mostraram que a NOR dominante são superexpressas por aza-dC ou TSA, com a reativação da NOR reprimida, sugerindo que ambas estão sujeitas aos mesmos mecanismos de regulação (PIKAARD, 1999). Com base nestas observações, parece plausível que os mecanismos epigenéticos que controlam o número de genes de rRNA ativos em espécies puras são os mesmos mecanismos responsáveis pela dominância nucleolar em híbridos.

Diferença no número de arranjos de genes de rRNA pode gerar uma expressão diferencial entre os sítios do mesmo do *locus* (PIKAARD, 2002), e até mesmo entre *loci*, na qual a NOR dominante possui mais genes de rRNA. Isso ocorre, pois sítio/*locus* com mais genes ribossomais competem pelos fatores de transcrição que estão em quantidade limitada (PIKAARD, 2002). Como visto nas análises via FISH, todos os sítios de rDNA 45S possuem diferenças de tamanho. Assim sendo, a hierarquia de dominância está de acordo com o tamanho de cada sítio, e estes são ativados conforme necessidade metabólica da célula.

A fibra de DNA estendida é uma ferramenta importante no estudo do mapeamento, que pode determinar o tamanho físico das sequências hibridadas. Por exemplo, Lavania et al. (2005) estimaram que o tamanho físico dos 3 locus de rDNA 45S mapeados na espécie Chlorophytum comosum possuíam ~90kb, 180kb e 300kb, a partir de uma escala anteriormente determinada que indicava que a cada micrômetro de fibra estendida há ~ 3,27 kb (Fransz et al., 1996). Entretanto, de acordo com o modelo de Watson-Crick esta relação é de 2,9 kb para cada micrômetro (Kuhn, comunicação pessoal). No presente estudo não foi possível estimar o tamanho dos loci de rDNA 45S a partir das fibras estendidas. Entretanto, os sinais de hibridação em metáfases mitóticas mostram claramente que há diferenças nos tamanhos destas regiões entre os pares cromossômicos e entre os homólogos de um mesmo par. Estas diferenças de tamanho podem estar diretamente envolvidas com a sua capacidade de expressão. Por exemplo, no par de cromossomos 1 ambos os homólogos expressão seus genes ribossomais, mas claramente um dos homólogos, no caso o que tem maior sítios de rDNA 45S, sempre forma um núcleo maior e consequentemente uma constrição secundária maior. O mesmo é observado no par de cromossomos 4. Entretanto, no caso deste par de cromossomos, ambos apresentam sítios de rDNA 45S muito menores do que aqueles presentes no par de cromossomos 1, e portanto devido ao seu reduzido tamanho, a expressão ocorre somente quando há uma maior demanda por ribossomos. Nota-se claramente, também, que há uma hierarquia entre os homólogos do cromossomo 4, onde aquele com maior sítio de rDNA 45S sempre se expressa primeiro. Assim pode-se concluir que em C. juncea há uma hierarquia de expressão dos genes de rRNA a partir do cromossomo 1 com maior sítio de rDNA 45S indo até o

cromossomo 4 com menos sítio de rDNA 45S. Embora haja uma hierarquia de expressão não se pode afirmar de maneira definitiva que se trata de um fenômeno de dominância nucleolar, uma vez que todos os sítios de alguma maneira se expressão. Estes resultados suportam a hipótese apresentada por Pikaard (1999, 2000b, 2002) de que sítios maiores de rDNA 45S são preferencialmente ativos pela sua capacidade de recrutarem com maior eficiência os fatores de transcrição disponíveis em quantidade limitada. Entretanto, o autor não descarta que outros mecanismos estejam envolvidos no controle da expressão dos genes ribossomais. Sabe-se que a metilação do DNA e as modificações das histonas possuem papel central no mecanismo de controle da expressão destes genes (JASENČÁKOVÁ, 2000, 2003; LAWRENCE et al., 2004; McKEOWN; SHAW, 2009; PIKAARD, 1999, 2000a, 2000b; PREUSS; PIKAARD, 2007; RICHARDS, 2006). No caso de Crotalaria juncea, não é possível visualizar claramente diferenças nos níveis de metilação entre os homólogos do par 1, apenas que as heterocromatinas associadas a NOR são fortemente metiladas. No cromossomo 4, entretanto, nota-se algumas diferenças nos níveis de metilação, principalmente quando um dos pares está se expressando e o outro não. Neste caso visualiza-se claramente a cromatina do sítio silenciado na forma de um pequeno cromocentro, ou densamente compacto no sinal de hibridação e co-localizado com a metilação do DNA, indicando que há remodelamento da sua arquitetura. Enquanto o outro sítio, que está ativo, apresenta as característica arquiteturais de uma cromatina nuclear ativa, com a formação de heterocromatinas adjacentes e no centro as fibras de rDNA descondensadas e disponíveis à maquinaria de transcrição.

Até recentemente, acreditava-se que o rDNA dentro do nucléolo fosse hipometilado, incluindo modelos recentemente propostos para a arquitetura das NOR, considerando esta condição (MARQUES et al., 2011). Entretanto, os resultados em *C. juncea* mostram claramente há presença de citosina metilada nas fibras de rDNA 45S que estão dentro do nucléolo, além da presença de metilação de histonas, como a H3K9Met2. Embora seja possível a visualização da metilação da citosina do DNA diretamente dentro do nucléolo, os sinais são menos intensos do que os observados para a cromatina nuclear. Isto certamente pelo fato de haver menor quantidade de DNA dentro do nucléolo do que em outras regiões do núcleo e por estar em menor densidade. Para comprovar estas observações as fibras estendidas mostraram-se bastante úteis e confiáveis. Não é possível observar nas fibras de DNA longas regiões de rDNA 45S não metilados, por outro lado nota-se que regiões hipometiladas aparecem aninhadas em meio a grandes regiões metiladas, corroborando com as observações de núcleos intactos. Este dados sugerem fortemente que a quantidade de genes de rRNA funcionais dentro do nucléolo é ainda menor do que se esperava e que o restante da fibra de rDNA 45S dentro do nucléolo deve estar organizada de uma forma que garanta que os genes funcionais ocupem posições específicas dentro do nucléolo. Sabe-se há muitos anos que o nucléolo é sub-compartimentalizado e que certamente os genes funcionais deveriam estar organizados dentro do centro fibrilar (SCHWARZACHER; WACHTLER, 1983). Os dados aqui apresentados corroboram com esta organização e permite inferir sobre a arquitetura da cromatina dentro do nucléolo, onde apenas os arranjos dentro do centro fibrilar formarão as alças de expressão, enquanto, os arranjos que os levam até este centro são metiladas e, portanto, não se expressão. Este modelo de arquitetura da cromatina, conjuntamente com as hipóteses para a expressão e controle dos genes ribossomais propostas por Pikaard (1999, 2002), corroboram com o pressuposto de McKeown; Shaw (2009) que sugere três níveis de compactação da cromatina nucleolar. No primeiro nível estariam as heterocromatinas adjacentes, totalmente inativas e com marcadores epigenéticos fortes, associados à formação de heterocromatinas; no segundo nível estariam os genes expressos, que estariam acetilados e desmetilados e disponíveis aos fatores de transcrição; o terceiro nível seria intermediário aos dois primeiros e representaria um estado latente da cromatina. Este estado latente seria um estado que manteria os genes ribossomais inativos, mas facilmente disponibilizáveis à célula em caso de uma demanda repentina por produção de ribossomos (McKEOWN; SHAW, 2009). Entretanto. autores não conseguiram demonstrar OS estas estruturas experimentalmente. Os resultados aqui apresentados demonstram praticamente a existência desta cromatina latente, restando experimentá-la para se comprovar sua capacidade de expressão.

Os resultados aqui apresentados, também sugerem, que o modelo de aumento na capacidade de expressão de genes que já estão sendo transcritos como sugerido por Pikaard (1999, 2000) pode ser limitado. O aumento na capacidade de transcrição de um gene seria fortemente limitado a demanda da célula. Assim os níveis de expressão de um gene podem ser aumentados até seu limite transcricional, sendo que este limite serviria como um sinal para que novos genes fossem ativados. Portanto, ambos os níveis de regulação estariam presentes no nucléolo.

A quantidade de genes que serão colocados em funcionamento, após se atingir a capacidade máxima transcricional, também é limitado. A quantidade de genes que serão expressos não pode exceder ao número mínimo necessário de arranjos de rDNA que garante a arquitetura do nucléolo; ou seja, se o número de genes colocados em funcionamento for muito grande, certamente, a estrutura do nucléolo e seu funcionamento será comprometido. Ao invés disto, a célula desencadeia um sinal que coloca em funcionamento os sítios adicionais, seguindo-se sempre a hierarquia de dominância, o limite transcricional e da quantidade de genes que podem ser expressos.

6 CONCLUSÃO

Os *loci* de rDNA 45S presentes em *C. juncea* apresentam atividade transcricional controlada por mecanismos epigenéticos, sendo os sítios adicionais presentes no cromossomo 4 ativos somente em estágios iniciais do ciclo celular (telófase - início da fase S), e de acordo com a demanda celular por ribossomos. Os genes ribossomais são expressos de forma hierárquica, que se inicia com o sítio maior de um dos homólogos do cromossomo 1 até o menor sítio de um dos homólogos do cromossomo 1 até o cada NOR é controlado por um sistema de capacidades limites, onde o primeiro nível é a capacidade transcricional individual máxima de cada gene e o segundo a quantidade máxima de genes que podem ser expressos sem que a arquitetura nuclear seja comprometida. Desta forma, identifica-se três níveis de organização da cromatina determinados pela combinação de diferentes modificações de histonas e da metilação do DNA. Desta forma a quantidade de genes ativos é muito pequena e estes aparecem interdispersos por longas regiões com genes metilados, mas que garante a organização funcional do nucléolo como sub-compartimento nuclear.

REFERÊNCIAS

AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T.A.; MOSSA, J. S. Crotalic and emarginellic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, Londres, v. 67, p. 956-964, 2006.

ALMADA, R.D.; DAVIÑA, J.R.; SEIJO, J.G. Karyotype analysis and chromosome evolution in southernmost South American species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 150, p. 329-341, 2006.

AMABILE, R.F.; FANCELLI, A.L.; CARVALHO, A.M. Comportamento de espécies de adubos verdes em diferentes épocas de semeadura e espaçamentos na região dos Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.1, p.47-54, 2000.

ANDRADE, L.M.; FERNANDES, R.; MONDIN, M. Immunodetection of methylcytosine in maize chromatin by a denaturating protocol. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 83, p. 39-40, 2009.

ATCHINSON, E. Studies in the Leguminosae. V. Cytological observations on Crotalaria. **Journal of the Elisha Mitchell Science Society**, Carolina do Norte, v. 66, p. 70-75, 1950.

BANNISTER, A.J.; KOUZARIDES, T. Reversing histone methylation. **Nature**, London, v. 436, n. 7054, p. 1103-6, 2005.

BÁRTOVÁ, E.; HORÁKOVÁ, A.H.; UHLÍROVÁ, R.; RAŠKA, I.; GALIOVÁ, G.; ORLOVA, D.; KOZUBEK, S. Structure and Epigenetics of Nucleoli in Comparison With Nonnucleolar Compartments. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 58, n. 5, p. 391-403, 2010.

BELYAYEV, A.; KALENDAR, R.; BRODSKY, L.; NEVO, E.; SCHULMAN, A.H.; RASKINA, O. Transposable elements in a marginal plant population : temporal fluctuations provide new insights into genome evolution of wild diploid wheat. **Mobile DNA**, London, v. 1, n. 6, p. 1-16, 2010.

BRASZEWSKA-ZALEWSKA, A.; BERNAS, T.; MALUSZYNSKA, J. Epigenetic chromatin modifications in *Brassica* genomes. **Genome**, Ottawa, v. 210, p. 203-210, 2010.

BISBY, F.A.; POLHILL, R.M. The role of taximetrics in angiosperm taxonomy. I. Empirical comparisons of methods using *Crotalaria* L. **New Phytologist**, London, v. 72, p. 727-742, 1973.

BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; POLHILL, R.M. Observations on the cytology and seed-proteins of various African species of Crotalaria L. (Leguminosae). **New Phytologist**, London, v. 69, p. 117-131, 1970.
BOWLER, C.; BENVENUTO, G., LAFLAMME, P.; MOLINO, D.; PROBST, A.V.; TARIQ, M.; PASZKOWSKI, J. Chromatin techniques for plant cells. **The Plant Journal**, Oxford, v.39, p. 776–789, 2004.

CACERES, N.T. Adubação Verde com Leguminosas em Rotação com Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp*). **Revista STAB**, Piracicaba, v. 13, n. 5, p. 16-20, 1995.

CAPERTA, A.D.; NEVES, N.; MORAIS-CECÍLIO, L.; MALHO, R.; VIEGAS, W. Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA *loci*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 115, p. 2839-2846, 2002.

CAPERTA, A.D.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C.S.; PREUSS, S. Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizerin *Secale cereale*. **Protoplasma**, Wien, v. 232, p. 55-59, 2007.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Comparative karyotype analysis of three Passiflora L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, Florence, v. 58, p. 220-228, 2005.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 17, p. 363-370, 2003.

DOLEZEL, J.; CIHALÍKOVÁ, J.; WEISEROVÁ, J.; LUCRETTI, S. Cell cycle synchronization in plant root meristems. **Methods in Cell Science**, Berlin, v. 107, p. 95-107, 1999.

DOURADO, M.C., SILVA, T.R.B.; BOLONHEZI, A.C. Matéria seca e produção de grãos de *Crotalaria juncea* L. submetida à poda e adubação fosfatada. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 287-293, 2001.

DUBCOVSKY, J.; DVOŘÁK, J. Ribosomal RNA Multigene *Loci*: Nomads of the *Triticeae* Genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 140, p. 1367-1377, 1995.

DUNDR, M.; MISTELI, T.; OLSON, M. O. The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. **The Journal of Cell Biology**, New York,v. 150, n. 3, p. 433-46, 2000.

FLAVELL, R.B. Variation in structure and expression of ribosomal DNA loci in wheat. **Plant Molecular Genetics**, Ottawa, v. 31, p. 963-968, 1989.

FLORES, A.S. **Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de** *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilolionoideae) no Brasil. 2004. 196p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de C*rotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 19, p. 245-249, 2005.

FLORES, A.S.; CORRÊA, A.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; TOZZI, A.M.G.A. Chromosome numbers in Brazilian species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilioideae) and their taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 151, p. 271-277, 2006.

FRANSZ, P.F.; ALONSO-BLANCO, C.; LIHARSKA, T.B.; PEETERS, A.J.M.; ZABEL, P.; JONG, J.H.. High resolution physical mapping in Arabidopsis thaliana and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 421–430, 1996.

FUCHS, J.; JOVTCHEV, G.; SCHUBERT, I. The chromosomal distribution of histone methylation marks in gymnosperms differs from that of angiosperms. **Chromosome Research**, Berlin, v. 16, p. 891–898, 2008.

FUCHS, J.; DEMIDOV, D.; HOUBEN, A.; SCHUBERT, I. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. **TRENDS in Plants Science**, London, v. 11, p. 199-208, 2006.

GRAFI, G.; ZEMACH, A.; PITTO, L. Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1769, p. 287-294, 2007.

GUPTA, P.K. Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of Crotalaria (Angiospermae, Leguminosae). **Chromosoma**, New York, v. 54, p. 155-164, 1976.

GUPTA, R.; GUPTA, P.K. Karyotype studies in the genus *Crotalaria* Linn. **Cytologia**, Tóquio, v. 43, p. 357-369, 1978a.

GUPTA, R.; GUPTA, P.K. Pachytene karyotype in the genus *Crotalaria* L (Leguminosae). **Cytologia**, Tóquio, v. 43, p. 655-663, 1978b.

HASTEROK, R.; MALUSZYNSKA, J. Different rRNA gene expression in primary and adventitious roots of *Allium cepa* L. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Bialystok, v. 38, n. 4, p. 181-4, 2000.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. **Histochemistry and Cell Biology**, New York, v. 126, p. 135–148, 2006.

HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative genome organization in plants: From sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 617-635, 2000a.

HESLOP-HARRISON, J.S. RNA, genes and chromosome: repetitive DNA sequences in plants. **Chromosome Today**, Switzeland, v.13, p. 45-56, 2000b.

HOWELL, W.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. **Experientia**, Basel, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

JASENČÁKOVÁ, Z. **Dynamics and functional aspects of histone modifications in plants.** 2003. 87 p. Kumulative Dissertation (Doctor Rerum Naturalium) - Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle- Wittenberg, 2003.

JASENČÁKOVÁ, Z.; MEISTER, A.E; SCHUBERT, I. Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. **Chromosoma**, Berlin, v. 110, p. 83-92, 2001.

JASENČÁKOVÁ, Z.; MEISTER, A.; WATER, J.; TURNER, B.M.; SCHUBERT, I. Histone H4 Acetylation of Euchromatin and Heterochromatin Is Cell Cycle Dependent and Correlated with Replication Rather Than with Transcription. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 2087-2100, 2000.

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

KAEPPLER, H.F.; KAEPPLER, S.M. Synchronization of Cell Division in Root Tips of Seven Major Cereal Species for High Yields of Metaphase Chromosomes for Flow-Cytometric Analysis and Sorting. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 15, n. 2, p. 141-147, 1997.

KAKUTANI, T., MUNAKATA, K., RICHARDS, E.J.E., HIROCHIKA, H. Meiotically and Mitotically Stable Inheritance of DNA Hypomethylation Induced by ddm1 Mutation of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Baltimore, v. 151, p. 831–838, 1999.

KOPP, K.; GASIOROWSKI, J.Z.; CHEN, D.; GILMORE, R.; NORTON, J.T.; WANG, C.; LEARY, D.J.; CHAN, E.K.L.; DEAN, D.A.; HUANG, S. Pol I Transcription and Pre-rRNA Processing Are Coordinated in a Transcription-dependent Manner in Mammalian Cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 18, p. 394 – 403, 2007.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, Maryland Heights, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KUHN, G.C.S.; SENE, F.M.; MOREIRA-FILHO, O.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J.S. Sequence analysis, chromosomal distribution and long-range organization Show that rapid turnover of new and old pBuM satellite DNA repeats leads to different patterns of variation in seven species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Chromosome Research**, London, v.16, p. 307-324, 2008.

KURZ, A.; LAMPEL, S.; NICKOLENKO, J.E.; BRADL, J.; BENNER, A.; ZIRBEL, R.M.; CREMER, T.; LICHTER, P. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. **Journal of Cell Biology,** New York, v. 135, p. 1195–1205, 1996.

LAM, E.; KATO, N.; WATANABE, K. Visualizing Chromosome Structure/Organization. **Annual Reviews Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 537–54, 2004.

LAVANIA, U. C.; BASU, S.; SRIVASTAVA, S.; MUKAI, Y.; LAVANIA, S. *In situ* chromosomal localization of rDNA sites in "Safed Musli" Chlorophytum ker-gawl and their physical measurement by fiber FISH. **The Journal of heredity**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 155-60, 2005.

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A. Concerted DNA Methylation/Histone Methylation Switch Regulates rRNA Gene Dosage Control and Nucleolar Dominance. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 13, p. 599-609, 2004.

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

LEWIS, M.S.; CHEVERUD, J.M.; PIKAARD, C.S. Evidence for nucleolus organizer regions as the units of regulation in nucleolar dominance in Arabidopsis thaliana interecotype hybrids. **Genetics**, Baltimore, v. 167, p. 931-939, June 2004.

LI, Y.; BUTENKO, Y.; GRAFI, G. Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, p. 346-352, Feb. 2005.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 364-70, 2004.

LODISH, H.F.; BERK, A.; MATSUDARIA, P.T.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P. **Molecular Cell Biology**. 5th ed. New York: W. Freeman and Company, 2003. 1054 p.

LUGER, K.; MÄDER, A.W.; RICHMOND, R.K.; SARGENT, D.F., RIVHMOND, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at Å resolution. **Nature**, London, v. 389, p. 251–260, 1997.

LYON, C.E.; LAMOND, A.I. The nucleolus. **The Journal Of Cell Biology**, New York , p. 323-323, 2000.

MAESHIMA, K.; HIHARA, S.; ELTSOV, M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist *in vivo*? **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 22, p. 291-297, 2010.

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

MARQUES, A.; FUCHS, J.; MA, L.; HECKMANN, S.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. Characterization of Eu- and Heterochromatin of Citrus with a Focus on the Condensation Behavior of 45S rDNA Chromatin. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 134, p. 72-82, 2011.

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

McKEOWN, P.C.; SHAW, P.J. Chromatin: linking structure and function in the *nucleolus*. **Chromosoma**, Berlin, v. 118, p. 11–23, 2009.

McSTAY, B. Nucleolar dominance: a model for rRNA gene silencing. **Genes & Development**, Woodbury, v. 20, n. 10, p. 1207-14, 2006.

MENGES, M.; MURRAY, J.A.H. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 203-212, 2002.

MONDIN, M. Estudo da evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* fluorescente (FISH). 2003. 115p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Heterochromatin patterns and ribosomal DNA loci distribution in diploid and polyploid *Crotalaria* species (Leguminosae-Papilionoideae), and inferences on karyotype evolution. **Genome**, Ottawa, v. 54, n. 9, 2011. No prelo.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L.) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 1, p. 65-72, 2007.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; FUCHS, M.C.P.; ANDRADE, L.M. Chromosomal evolution of the genus Crotalaria (Leguminosae-Papilionoideae) and its taxonomy relationships. **Chromosome Research**, London, v. 15, supl. 2, p. 37, res. P.079, 2007a. Apresentado no INTERNATIONAL CHROMOSOME CONFERENCE, 16., 2007, Amsterdam. MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MORALES, A.G.; ANDRADE, L.M; MENUZZO-MOLINA, S.C. Citogenética do gênero Crotalaria (Leguminosae-Papilionoideae): da clássica a molecular. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE CITOGENÉTICA Y EVOLUCIÓN, 2., 2007, Palmira. **Memórias**...Palmira: Universidad Nacional de Colombia, 2007b. p. 189-195.

MONTIJN, M.B.; HOOPEN, R.T.; FRANSZ, P.F.; OUD, J.L.; NANNINGA, N. Characterization of the nucleolar organizing regions during the cell cycle in two varieties of *Petunia hybrida* as visualized by fluorescence *in situ* hybridization and silver staining. **Chromosoma**, New York, v. 107, n. 2, p. 80-86, 1998.

MORALES, A.G. Evolução cromossômica de espécies de *Crotalaria* L. da seção Hedriocarpae subseção Macrostachyae (Leguminosae-Papilionoideae). 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MORALES, A.G.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MONDIN, M. Karyotype characterization revelas an up and down of 45S and 5S rDNA sites in *Crotalaria* (Leguminosae-Papilionoideae) species of the section Hedriocarpae subsection Macrostachyae. **Genetic Resources and Crop Evolution,** Secaucus, v. 58, n. 4, 2011. No prelo.

NAVASHIN, M. Changes in number and form of chromosomes as a result of hybridization. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, Viena, v. 6, p. 195–223, 1927.

NEUMANN, P.; NOUZOVÁ, M.; MACAS, J. Isolation of chromosomes from *Pisum* sativum L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. **Plant Science**, London, v. 137, p. 205–215, 1998.

OLIVEIRA, A.L.P.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* L. **Cytologia**, Tóquio, v. 64, p. 164-174, 1999.

PALOMINO, G.; VÁZQUEZ, R. Cytogenetic Studies in Mexican Populations of Species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionideae). **Cytologia**, Tóquio, v. 56, p. 343-351, 1991.

PAPA, C.M.; SPRINGER, N.M.; MUSZYNSKI, M.G.; MEELEY, R.; KAEPPLER, S.M. Maize chromomethylase *Zea* methyltransferase2 is required for CpNpG methylation. **The Plant Cell,** Rockville, v. 13, p. 1919-1928, 2001.

PARDUE, M. L.; GALL, J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 64, n. 2, p. 600-604, 1969.

PERIN, A.; SANTOS, R.H.S.; URQUIAGA, S.; GUERRA, J.G.M.; CECON, P.R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 35-40, 2004.

PIKAARD, C.S. The epigenetic of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, London, v. 16, p. 495-500, 2000b.

PIKAARD, C.S. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 163-177, 2000a.

PIKAARD, C. S. Nucleolar dominance and silencing of transcription. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, p. 478-483, 1999.

PIKAARD, C.S. Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. **The** *Arabidopsis* **Book**, Rockville, 2002, 1-24p.

PINTO-MAGLIO, C.A.F. Mapeamento cromossômico em espécies de café através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). **O Agronômico**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 66-67, 2007.

PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 476, p. 78-83, 2000.

POLHILL, R.M. **Crotalaria in Africa and Madagascar**. Rotterdam: Royal Botanic Gardens, Kew, 1982. 389p.

PREUSS, S.; PIKAARD, C.S. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: Insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1769, p. 383–392, 2007.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; PIRES, F.R.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A.; FERREIRA, L.R. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de solos contaminados com o herbicida *Trifloxysulfuron Sodium*. **Planta Daninha**, Londrina, v. 22, p. 315-322, 2004.

RABL, C. Über die Zelltheilung. **Morphologisches Jahrbuch,** Wilhelm Engelmann, v. 10, p. 214–330, 1885.

RAINA, S.N.; VERMA, R.C. Cytogenetics of *Crotalaria*. I. Mitotic complements in twenty species of *Crotalaria* L. **Cytologia**, Tóquio, v. 44, p. 365-375, 1979.

RAINA, S.N.; MUKAI, Y.; KAWAGUCHI, K.; GOEL, S.; JAIN, A. Physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S ribosomal RNA gene families in three important vetches (*Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complexes. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 839-845, 2001.

RAŠKA, I.; SHAW, P.J.; CMARKO, D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 18, p. 325–334, 2006.

RAŠKA, I.; KOBERNA, K.; MALÍNSKÝ, J.; FIDLEROVÁ, H.; MAŠATA, M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biology of the Cell**, Paris, v. 96, p. 579-594, Oct. 2004.

RAŠKA, I.; DUNDR, M.; KOBERNA, K.; MELCAK, I.; RISUENO, M.C.; TOROK, I. Does the Synthesis of Ribosomal RNA Take Place within Nucleolar Fibrillar Centers or Dense Fibrillar Components? A Critical Appraisal. **Journal of Structural Biology**, Maryland Heights, v. 114, p. 1-22, 1995.

RASKINA, O.; BELYAYEV, A.; NEVO, E. Activity of the En/Spm-like transposons in meiosis as a base for chromosome repatterning in a small, isolated, peripheral population of *Aegilops speltoides* Tausch. **Chromosome Research**, London, v. 12, p. 153–161, 2004.

RASKINA, O.; BARBER, J.C.; NEVO, E.; BELYAYEV, A. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. **Cytogenetic** and **Genome Research**, Basel, v. 120, n. 3-4, p. 351-7, 2008.

RATTNER, J.B.; LIN, C.C. Radial Loops and Helical Coils Coexist in Metaphase Chromosomes. **Cell**, Maryland Heights, v. 42, p. 291-296, 1985.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. **Nature Reviews**, London, v. 7, p. 395-402, 2006.

ROBINSON, P.J.J.; RHODES, D. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 16, p. 336–343, 2006.

SALEH, A.; ALVAREZ-VENEGAS, R.; AVRAMOVA, Z. An efficient chromatin immunoprecipitation (ChIP) protocol for studying histone modifications in *Arabidopsis* plants. **Nature Protocols**, London, v. 3, p. 1018-1025, 2008.

SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus Organizer Regions and Nucleoli. **Human Genetics**, New York, v. 63, p. 89-99, 1983.

SEGAL, E.; FONDUFE-MITTENDORF, Y.; CHEN, L.; THÅSTRÖM, A.; FIELD, Y.; MOORE, I.K.; WANG, J.P.Z.; WIDOM, J.A. Genomic Code for Nucleosome Positioning. **Nature**, London, v. 442, p. 772-778, 2006.

SHISHIDO, R.; SANO, Y.; FUKUI, K. Ribosomal DNAs: na exception to the conservation of gene order in rice genomes. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 263, p. 586-591, 2000.

SOPPE, W.J.J.; JASENCAKOVA, Z.; HOUBEN, A.; KAKUTANI, T.; MEISTER, A.; HUANG, M.S.; JACOBSEN, S.E.; SCHUBERT, I.; FRANSZ, P.F. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. **The EMBO Journal**, New York, v. 21, n. 23, p. 6549-6559, 2002.

SUMNER, A. T. **Chromosomes:** Organization and Function. Oxford: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2003. p. 133-141.

SCHUBERT, I. Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in Allium (Liliaceae s. lat.)? – Inferences from specificity of silver staining. **Plant Systematic and Evolution**, Wien, v. 144, p. 291-305. 1984.

SCHUBERT, I.; WOBUS, U. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. **Chromosoma**, New York, v. 92, p. 143-148, 1985.

TARIQ, M.; SAZE, H.; PROBST, A.V.; LICHOTA, J.; HABU, Y.; PASZKOWSKI, J. Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 15, p. 8823-8827, 2003.

TORRES, G.A.; DAVIDE, L.C.; BEARZOTI, E. Sincronização do ciclo celular em meristema radicular de baru (Dipteryx alata Vog.). **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 398-405, 2003.

TURNER, B.M. **Chromatin and Gene Regulation Mechanisms in Epigenetics**. Oxford: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2001. 284p.

VAUGHN, M.W.; TANURDŽIĆ, M.; LIPPMAN, Z.; JIANG, H.; CARRASQUILLO, R.; RABINOWICZ, P.D.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W.R.; AGIER, N.; BULSKI, A.; COLOT, V.; DOERGE, R.W.; MARTIENSSEN, R.A. Epigenetic Natural Variation in *Arabidopsis thaliana.* **PLoS Biology**, Cambridge, v. 5, n. 7, p. 1617-1629, 2007.

VERMA, R.C.; RAINA, S.N. Cytogenetics of *Crotalaria* V. Supernumerary *nucleoli* in *C. agatiflora* (Leguminosae). **Genetica**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 75-80, 1981.

VERMA, R.C.; KESAVACHARYULU, K.; RAINA, S.N. Cytogenetics of *Crotalaria*. IX. Mitotic complements in 19 species. **Cytologia**, Tóquio, v. 49, p. 157-169, 1984.

WANG, KOON-HUI; SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P. Suppression of *Rotylenchulus reninformis* by *Crotalaria juncea, Brassica napus* and *Tagetes erecta*. **Nematropica**, New York, v. 31, p. 235-249, 2001.

WU, C.; BASSETT, A.; TRAVERS, A. A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. **EMBO reports**, New York, v. 8, p. 1129-1134, 2007.