

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais

Natália de Sousa Teixeira e Silva

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

**Piracicaba
2014**

Natália de Sousa Teixeira e Silva
Bacharel em Ciências Biológicas

Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais

Orientador:
Prof. Dr. **MATEUS MONDIN**

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

Piracicaba
2014

**Ao meu pai, Ismael,
pelo apoio e incentivo incondicionais**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, e ao Departamento de Genética, pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

Ao professor Dr. Mateus Mondin pelas oportunidades, orientações e discussões, pela confiança em mim depositada, pela paciência e amizade durante todo o período do mestrado.

À técnica Silvia Cristina Menuzzo-Molina por toda ajuda e amizade em todo este período.

À professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira por ceder cordialmente o microscópio de epifluorescência para a conclusão das análises.

Ao Dr. André Arnosti e à Leica Microsystems Brasil, pela disponibilidade e atenção durante o treinamento em microscopia de fluorescência com ferramenta de deconvolução.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos colegas do CYNGELA e do Departamento de Genética, em especial aos mestrandos Amanda Avelar de Oliveira e Lucas Souza Lopes e a doutoranda Camelice Boff de Almeida, pelo apoio, amizade e momentos de descontração.

Ao meu pai, Ismael, e minha mãe do coração, Ana Lúcia, agradeço pelo apoio, amor incondicional e confiança em mim depositada durante todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Lenira pelo amor e apoio mesmo à distância.

Aos meus irmãos, Gabriel, Mariana, Thomaz e Luan, pelo companheirismo.

Ao meu namorado Rafael, pelo carinho nos momentos de aflição e pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas.

Aos meus amigos e familiares, em especial à minha madrinha Lílian e primas Sabrina e Letícia, pela torcida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional durante esta conquista,

Muito obrigada!

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Estrutura do nucléolo.....	17
2.2 Genes de rRNA.....	21
2.3 Nucleologênese.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Material.....	29
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Germinação.....	29
3.2.2 Pré-tratamento das raízes com inibidores do fuso mitótico.....	29
3.2.3 Preparação das lâminas.....	30
3.2.4 Hibridação Molecular in situ Fluorescente (FISH).....	30
3.2.5 Imunodeteção.....	32
3.2.6 Obtenção das fibras estendidas.....	32
3.2.7 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais.....	33
3.2.8 Microscopias e análise de imagens.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Imunodeteção da fibrilarina durante o ciclo celular.....	35
4.2 Dinâmica das constrições secundárias durante o ciclo celular.....	40
4.3 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais.....	42
4.4 Indexação epigenética da cromatina nucleolar.....	42
4.5 Mapeamento das metilações em fibras estendidas de DNA.....	47
4.6 Organização dos genes ribossomais de 18S e 26S em fibras estendidas.....	50
5 DISCUSSÃO.....	53
5.1 Comportamento do nucléolo durante o ciclo celular.....	53
5.2 A cromatina ribossomal segrega em um estado semi-condensado.....	54
5.3 Atividade dos sítios adicionais de rDNA 45S.....	54
5.4 Caracterização morfométrica dos sítios ribossomais.....	56
5.5 Padrão de metilação do rDNA 45S.....	58
5.6 Organização dos genes ribossomais em <i>Crotalaria juncea</i> L.....	60

5.7 Uma proposta de modelo de herança dos genes ribossomais ativos.....	60
6 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65

RESUMO

Dinâmica nucleolar e a herança epigenética dos genes ribossomais

O nucléolo é uma organela subnuclear formada pela atividade transcricional dos genes ribossomais 18S-5.8S-26S (rDNA 45S) e consequente biogênese dos ribossomos. A atividade destes genes resulta na região organizadora do nucléolo (NOR), na forma de uma constrição secundária em cromossomos metafásicos. As constrições secundárias se condensam progressivamente durante a mitose e se descondensam ao final da telófase quando a reestruturação do nucléolo se inicia. Genomas que apresentam mais de um *locus* de rDNA 45S deve apresentar, obrigatoriamente, pelo menos um par de NORs, enquanto os demais *loci* poderão ou não serem expressos. O controle da expressão dos genes ribossomais e a formação da cromatina nucleolar são modulados por eventos epigenéticos. Embora alguns pontos sobre o funcionamento dos genes ribossomais e a formação do nucléolo estejam bem estabelecidos, questões como o padrão de condensação da cromatina nucleolar durante a mitose, o padrão de funcionamento de sítios adicionais de genes ribossomais, o papel das modificações epigenéticas na dinâmica da cromatina nucleolar e na expressão do rDNA 45S e o mecanismo de herança dos genes ativos, permanecem abertas. A espécie *Crotalaria juncea* (Leguminosae-Papilionoideae), com $2n=2x=16$ cromossomos, que possui um *locus* de rDNA 45S no braço curto do cromossomo 1, que sempre forma constrição secundária, e um sítio adicional com atividade facultativa no braço curto do cromossomo 4, é um excelente modelo para o estudo destas questões. No contexto apresentado, foram estudadas a dinâmica de condensação das NORs durante o ciclo celular e sua correlação com a atividade dos genes ribossomais, incluindo o *locus* adicional, e ainda o papel da metilação da citosina do DNA durante estes processos. Os resultados demonstram que a cromatina da região organizadora do nucléolo segrega em um estado descondensado durante a mitose, na forma de constrição secundária, ou seja, tal estrutura não se condensa durante a metáfase e não volta a se distender no início da telófase. Aparentemente, o que causa correlações equivocadas entre a atividade nucleolar e a observação morfológica da constrição secundária na metáfase é a contração forçada da cromatina da NOR causada por agentes antimitogênicos. Este modelo de segregação em um estado aberto pode ser explicado pela descrição de diversas proteínas que permanecem diretamente ligadas ou indiretamente associadas à região da NOR durante a mitose, funcionando como uma barreira física para a compactação. Ambos os sítios, principais e adicionais, do rDNA 45S presentes em *Crotalaria juncea* apresentam atividade transcricional, embora o *locus* do cromossomo 4 mostre atividade facultativa. Ao contrário do que foi anteriormente proposto, uma vez ativo, o *locus* adicional permanece descondensado durante todo o ciclo mitótico, seguindo o mesmo comportamento dos sítios principais. As constrições secundárias e a cromatina nucleolar são hipermetiladas em nível citológico, independentemente de sua atividade. A aparente hipometilação observada no rDNA 45S em cromossomos mitóticos e núcleos interfásicos se deve ao menor grau de compactação da região organizadora do nucléolo e, conseqüentemente, à baixa densidade de cromatina.

Palavras-chave: rDNA 45S; Nucléolo; Constrição secundária; NOR; Metilação de DNA; Fibrilarina; Epigenética

ABSTRACT

Nucleolar dynamics and the epigenetic inheritance of ribosomal genes

The nucleolus is a subnuclear organelle formed as a result of transcriptional activity of ribosomal RNA genes 18S-5.8S-26S (45S rDNA) and subsequent ribosome biogenesis. This activity forms the nucleolar organizing region (NOR) as a secondary constriction in metaphase chromosomes. The secondary constrictions progressively condense during mitosis and decondense at the end of telophase, when nucleoli start to reassemble. Genomes presenting more than one 45S rDNA *locus* must have at least one pair of NOR bearing chromosomes, while other *loci* may be expressed or not. Ribosomal gene expression and nucleolar chromatin assembly are modulated by specific epigenetic events. Although some topics related to rDNA gene activity and nucleolus formation are well understood, questions such as the behavior of nucleolar chromatin condensation during mitosis, standard functions associated with rDNA additional sites, role of epigenetic modifications in nucleolar chromatin and 45S rDNA expression processes, and inheritance mechanism of active genes, remain to be solved. *Crotalaria juncea* (Leguminosae – Papilionoideae) has $2n=2x=16$ chromosomes and carries a 45S rDNA *locus* at the short arm of chromosome 1, always presenting a secondary constriction, and an additional site with facultative activity at the short arm of chromosome 4, being an excellent model to resolve these questions. Thus, this study aimed to study NOR condensation dynamics during the cell cycle and its correlation with ribosomal gene activity, including the additional *locus*, while analyzing the role of rDNA cytosine methylation during this process. The results show that NOR chromatin segregate in a decondensed way throughout mitosis, as a secondary constriction. In other words, this structure does not condense during metaphase and the NOR is not reassembled at the beginning of telophase. Misinterpretations relating nucleolar activity with morphological observations of secondary constrictions, appear to be induced by the artificial contraction of NOR chromatin caused by antimetabolic drugs. This segregation model in an open state may be supported by strong diversity of proteins that are maintained attached to NORs during mitosis, serving as a physic barrier for condensation. Both principal and additional 45S rDNA sites of *C. juncea* are transcriptionally active, although the additional *locus* in chromosome 4 presented facultative activity depending upon ribosomal request. Unlike what was previously proposed, once the additional site is activated, it remains in an open configuration throughout the cell cycle, similarly to principal site behavior. Secondary constrictions and nucleolar chromatin are hypermethylated at cytological level, regardless of their activity. The seeming hipomethylated state of 45S rDNA in interphase nucleus and mitotic chromosomes is due to a lower compaction level of nucleolar organizing regions and subsequent low chromatin density.

Keywords: 45S rDNA; Nucleolus; Secondary constriction; NOR; DNA methylations; Fibrillarin; Epigenetics

1 INTRODUÇÃO

Células em atividade demandam uma constante produção de rRNA para assegurar o suprimento de ribossomos necessários à síntese protéica. Parte da biogênese ribossomal acontece no interior do nucléolo. Dentre seus componentes, um dos mais importantes são os *clusters* de genes de rRNA 45S (ou rDNA 45S) arranjados *in tandem*. O motivo do rDNA 45S compreende os genes de rRNA 18S, 5.8S e 26/28S intercalados por espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e flanqueados por espaçadores transcritos externos (ETS1 e ETS2). Este arranjo gênico, por sua vez, é separado por um espaçador intergênico (IGS) que carrega sequências regulatórias, como o promotor gênico e diversos *enhancers*. Apesar dos *loci* de rDNA 45S possuírem de centenas a milhares de cópias, dependendo do organismo, apenas uma fração muito pequena destes genes é realmente expressa.

Os genes ribossomais tem sua expressão máxima durante a interfase e prófase. Ao final da prófase, a síntese de rRNA começa a declinar até que seja cessada, quando o nucléolo é desfeito. Deste modo, acredita-se que à medida que a síntese de rRNA decai, o nucléolo se desestrutura e a região da NOR, antes distendida, se condensa progressivamente ao longo do restante do ciclo. Conseqüentemente, durante a metáfase final, anáfase e telófase inicial o *locus* de rDNA 45S permaneceria condensado e, portanto, inativo. Somente ao final da telófase estes *loci* começariam a se distender novamente e os genes voltariam a entrar em atividade para formar novos nucléolos. Esta dinâmica de condensação e descondensação das constrições secundárias durante o ciclo celular é bem aceita entre os citologistas, embora não tenham sido feitos estudos específicos acerca deste comportamento.

Atualmente, acredita-se que o controle da expressão gênica é mediado por alterações na conformação da cromatina, mediante mecanismos epigenéticos, dentre os quais estão as modificações pós-translacionais nas caudas N-terminais das histonas e modificações covalentes nos nucleotídeos, como a metilação de citosinas do DNA. Algumas modificações são marcas específicas para certos tipos de controle, como por exemplo, a metilação da H3K9 e a hipermetilação de citosinas do DNA são relacionadas ao silenciamento gênico, enquanto a metilação da H3K4 e a hipometilação de citosinas do DNA são conhecidas como marcadores para eucromatina.

A metilação de citosinas do DNA tem sido o principal objeto de estudo acerca do controle epigenético da expressão dos genes ribossomais. A partir de dados citológicos é descrito na literatura que, a região da heterocromatina perinucleolar se apresenta hipermetilada, enquanto a eucromatina do rDNA 45S se encontra hipometilada, pelo fato das constrições secundárias de cromossomos metafásicos não apresentarem marcação quando imunodetectadas contra a 5'-metilcitosina. Apesar destas constatações, dados moleculares demonstraram que apenas uma pequena fração do total de genes possui apenas um curto trecho da região promotora hipometilada, sendo esta região responsável pela atividade ou não do gene *downstream*. A ambiguidade destas informações não permite conhecer, de fato, qual o padrão de metilação dos arranjos de rDNA 45S, talvez por não terem sido feitas análises minuciosas, utilizando-se de técnicas com resolução suficientemente capaz de detalhar tal padrão. Considerando que a metilação de citosinas do DNA é relacionada à compactação da cromatina, a condensação das constrições secundárias durante a mitose teria que resultar no aumento dos níveis desta modificação. Consequentemente, tais regiões se mostrariam tão brilhantes quanto as heterocromatins perinucleolares durante toda a mitose, quando imunolocalizadas contra a 5'-metilcitosina. Porém, não se sabe ao certo qual o comportamento da metilação de citosinas do DNA e se existem flutuações desta indexação durante o ciclo celular.

No sentido de comprovar tais hipóteses e ampliar os conhecimentos citológicos acerca da nucleologênese e do comportamento e indexação epigenética do rDNA 45S, o presente trabalho objetiva caracterizar:

- I. a dinâmica da estruturação e desestruturação do nucléolo no ciclo mitótico;
- II. a atividade do organizador nucleolar adicional presente no cromossomo 4;
- III. o comportamento das constrições secundárias durante o ciclo celular;
- IV. o padrão de metilação das citosinas do DNA dos genes ribossomais;
- V. a organização dos genes ribossomais 18S e 26S no genoma,

a partir das metodologias de Híbridação Molecular *in situ* Fluorescente (FISH) utilizando como sonda o arranjo dos genes de rRNA 45S, ou os genes de 18S e 26S individualmente, da imunolocalização da fibrilarina, uma importante proteína nucleolar, e da imunodeteção da 5'-metilcitosina, principal modificação epigenética relacionada ao controle da expressão gênica.

6 CONCLUSÃO

A partir das observações aqui expostas e discutidas, é possível concluir que sítios ribossomais são altamente metilados, independente de sua atividade, e que a metilação do DNA não contribui diretamente para a condensação desta região durante a mitose. Sítios de rDNA 45S ativos sempre formam constrições secundárias e segregam na mitose sem que ocorra total condensação da cromatina. No caso de sítios adicionais ativos este mesmo padrão é mantido ao longo de todo o ciclo celular. Tanto sítios principais quanto sítios adicionais, apresentam padrão de indexação da cromatina idêntico.

7 REFERÊNCIAS

- ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. The nucleolar cycle in man. **Journal of cell science**, London, v. 25, p. 103–110, Oct. 1977.
- ANDERSEN, J.S.; LAM, Y.W.; LEUNG, A.K.L.; ONG, S.-E.; LYON, C.E.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Nucleolar proteome dynamics. **Nature**, London, v. 433, p. 77–83, Jan. 2005.
- ANDRADE, L.M. **Arquitetura da cromatina da região organizadora do nucléolo e o seu papel no controle da expressão dos genes ribossomais**. 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BIANCHI, M.W.; VIOTTI, A. DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 203–214, Apr. 1988.
- BOISVERT, F.-M.; KONINGSBRUGGEN, S. VAN; NAVASCUÉS, J.; LAMOND, A.I. The multifunctional nucleolus. **Nature reviews**, London, v. 8, n. 7, p. 574–585, July 2007.
- BUSCH, H.; SMETANA, K. **The nucleolus**. New York: Academic Press, 1970. 626 p.
- CABURET, S.; CONTI, C.; SCHURRA, C.; LEBOFISKY, R.; EDELSTEIN, S. J.; BENSIMON, A. Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. **Genome research**, New York, v. 15, n. 8, p. 1079–85, July 2005.
- CAJAL, S.R. Un sencillo método de coloración del retículo protoplasmico y sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados é invertebrados. **Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid**, Madrid, v. 2, p. 129-221, 1903.
- CAPOA, A. de; FERRARO, M.; MENENDEZ, F.; MOSTACCI, C.; PELLICCIA, F.; ROCCHI, A. Ag staining of the nucleolus organizer (NO) and its relationship to satellite association. **Human genetics**, New York, v. 44, n. 1, p. 71–77, Feb. 1978.
- CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell**, Cambridge, v. 53, p. 3–4, Apr. 1988.
- CERDIDO, A.; MEDINA, F.J. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. **Chromosoma**, Berlin, v. 103, n. 9, p. 625–634, Jan. 1995.
- CMARKO, D.; VERSCHURE, P.J.; ROTHBLUM, L.I.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; AMALRIC, F.; Van DRIEL, R.; FAKAN, S. Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 113, n. 3, p. 181–187, Dec. 2000.

COEN, E.S.; DOVER, G.A. Multiple Pol I initiation sequences in rDNA spacers of *Drosophila melanogaster*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 10, n. 21, p. 7017–7026, Sept. 1982.

COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. **Nuclear isolation buffer (NIB 2X)**. 2008. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/12/pdb.rec11574.short>>. Acesso em: 02 abr. 2014.

CUCO, S.M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). **Acta Botanica Brasílica**, Belo Horizonte, v. 17, n. 3, p. 363–370, dez. 2003.

DELTOUR, R.; BARSY, T. de. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. **Journal of Cell Science**, London, v. 76, p. 67–83, Jan. 1985.

DÍEZ, J.L.; VILARIÑO, V.R.; MEDINA, F.J.; MORCILLO, G. Nucleolar localization of a reverse transcriptase related to telomere maintenance in *Chironomus* (Diptera). **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 126, n. 4, p. 445–452, Apr. 2006.

DIMARIO, P.J. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. **International Review of Cytology**, New York, v. 239, p. 99–178, Oct. 2004.

DOUSSET, T.; WANG, C.; VERHEGGEN, C.; CHEN, D.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUANG, S. Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 11, n. 8, p. 2705–2717, Aug. 2000.

EDEN, S.; HASHIMSHONY, T.; KESHET, I.; CEDAR, H.; THORNE, A.W. DNA methylation models histone acetylation. **Nature**, London, v. 394, n. 6696, p. 842, Aug. 1998.

FLAVELL, R.B.; O'DELL, M.; THOMPSON, W.F. Regulation of cytosine methylation in ribosomal DNA and nucleolus organizer expression in wheat. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 204, n. 3, p. 523–534, June 1988.

FLAVELL, R.; O'DELL, M.; SHARP, P.; NEVO, E.; BEILES, A. Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 3, n. 6, p. 547–558, June 1986a.

FLAVELL, R.; O'DELL, M.; THOMPSON, W.F.; VINCENTZ, M.; SARDANA, R.; BARKER, R.F. The differential expression of ribosomal RNA genes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 314, n. 1166, p. 385–397, Nov. 1986b.

FONTANA, F. **Traité sur le venin de la vipere, avec des observations sur la structure primitive du corps animale**. [s.l.: s.n.], 1781. 363 p.

GAUTIER, T.; ROBERT-NICOUD, M.; GUILLY, M.N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis: a study by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Cell Science**, London, v. 102, pt. 4, p. 729–737, Apr. 1992.

GÉBRANE-YOUNÈS, J.; FOMPROIX, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. **Journal of Cell Science**, London, v. 110, pt. 1, p. 2429–2440, July 1997.

GILBERT, N.; LUCAS, L.; KLEIN, C.; MENAGER, M.; BONNET, N.; PLOTON, D. Three-dimensional co-location of RNA polymerase I and DNA during interphase and mitosis by confocal microscopy. **Journal of Cell Science**, London, v. 108, pt. 1, p. 115–125, Sept. 1995.

GONG, Z.; XUE, C.; ZHANG, M.; GUO, R.; ZHOU, Y.; SHI, G. Physical localization and DNA methylation of 45S rRNA gene loci in *Jatropha curcas* L. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e84284, Dec. 2013.

GRUMMT, I. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. **Genes & Development**, New York, v. 17, n. 14, p. 1691–1702, 2003.

GUPTA, P.K. Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of *Crotalaria* (Angiospermae, Leguminosae). **Chromosoma**, Berlin, v. 54, n. 2, p. 155–164, Nov. 1976.

HELIOT, L.; KAPLAN, H.; LUCAS, L.; KLEIN, C.; BEORCHIA, A.; DOCO-FENZY, M.; MENAGER, M.; THIRY, M.; O'DONOHUE, M.-F.; PLOTON, D. Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 8, n. 11, p. 2199–2216, Nov. 1997.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. **Nucleus**, Austin, v. 2, n. 3, p. 189–194, June 2011.

HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 5, p. 617–636, May 2000.

HOWELL, W.M. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, Berlin, v. 62, n. 4, p. 361–367, Mar. 1977.

HUANG, M.; LI, H.; ZHANG, L.; GAO, F.; WANG, P.; HU, Y.; YAN, S.; ZHAO, L.; ZHANG, Q.; TAN, J.; LIU, X.; HE, S.; LI, L. Plant 45S rDNA clusters are fragile sites and their instability is associated with epigenetic alterations. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e35139, Apr. 2012.

JIANG, J.; GILL, B.S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. **Genome**, Ottawa, v. 1068, p. 1057–1068, Sept. 2006.

KERMEKCHIEV, M.; WORKMAN, J.L.; PIKAARD, C.S. Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. **Molecular and Cellular Biology**, London, v. 17, n. 10, p. 5833–5842, Oct. 1997.

KLOSE, R.J.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 89–97, Feb. 2006.

KOO, D.-H.; JIANG, J. Extraordinary tertiary constrictions of *Tripsacum dactyloides* chromosomes: implications for karyotype evolution of polyploids driven by segmental chromosome losses. **Genetics**, Austin, v. 179, n. 2, p. 1119–1123, Apr. 2008.

KOO, D.-H.; HAN, F.; BIRCHLER, J.; JIANG, J. Distinct DNA methylation patterns associated with active and inactive centromeres of the maize B chromosome. **Genome Research**, New York, v. 21, p. 908–914, Feb. 2011.

LAWRENCE, R.J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z.J.; 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, n. 4, p. 599–609, Feb. 2004.

LEYDIG, F. Anatomische Notizen über *Synapta digitata*. **Archiv für Anatomie und Physiologie**, Leipzig, p. 507-519, 1852.

LIU, H.; PAN, G.; LUO, B.; LI, T.; YANG, Q.; VOSSBRINCK, C. R.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A.; ZHOU, Z. Intraspecific polymorphism of rDNA among five *Nosema bombycis* isolates from different geographic regions in China. **Journal of invertebrate pathology**, San Diego, v. 113, n. 1, p. 63–69, Feb. 2013.

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, Feb. 2011.

MATHIEU, O.; JASENCAKOVA, Z.; VAILLANT, I.; GENDREL, A.-V.; COLOT, V.; SCHUBERT, I.; TOURMENTE, S. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2929–2939, Nov. 2003.

McCLINTOCK, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of nucleolo in *Zea mays*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Berlin, v. 21, p. 294–328, Mar. 1934.

McSTAY, B.; GRUMMT, I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 131–157, July 2008.

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. 115 p. 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. 726, p. 718–726, May 2011.

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, June 2007.

MONTGOMERY, T.H. Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus. **Journal of Morphology**, New York, v. 15, p. 265–583, 1899.

MORALES, A.G.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MONDIN, M. Karyotype characterization reveals 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. 59, n. 2, p. 277–288, Mar. 2011.

MURO, E.; GÉBRANE-YOUNÍS, J.; JOBART-MALFAIT, A.; LOUVET, E.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The traffic of proteins between nucleolar organizer regions and prenucleolar bodies governs the assembly of the nucleolus at exit of mitosis. **Nucleus**, Austin, v. 1, n. 2, p. 202–211, Apr. 2010.

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

NICOL, S.M.; CAUSEVIC, M.; PRESCOTT, A.R.; FULLER-PACE, F.V. The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase. **Experimental Cell Research**, New York, v. 257, n. 2, p. 272–280, Mar. 2000.

OLSON, M.O.J.; DUNDR, M. The moving parts of the nucleolus. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 123, n. 3, p. 203–216, Mar. 2005.

OLSON, M.O.J.; HINGORANI, K.; SZEBENI, A. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. **International Review of Cytology**, New York, v. 219, p. 199–266, Mar. 2002.

O'SULLIVAN, A.C.; SULLIVAN, G.J.; MCSTAY, B. UBF binding *in vivo* is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. **Molecular and Cellular Biology**, London, v. 22, n. 2, p. 657–668, Jan. 2002.

PAPAIOANNOU, I.A.; DIMOPOULOU, C.D.; TYPAS, M.A. Structural and phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer region of *Verticillium dahliae*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 347, n. 1, p. 23–32, July 2013.

PEDERSON, T. The plurifunctional nucleolus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 26, n. 17, p. 3871–3876, June 1998.

PIKAARD, C.S. Nucleolar dominance and silencing of transcription. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 4, n. 12, p. 478–483, Dec. 1999.

_____. Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, n. 2/3, p. 163–177, Mar. 2000a.

_____. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 495–500, Nov. 2000b.

POLITZ, J.C.R.; POLENA, I.; TRASK, I.; BAZETT-JONES, D.P.; PEDERSON, T. A nonribosomal landscape in the nucleolus revealed by the stem cell protein nucleostemin. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 16, p. 3401–3410, Apr. 2005.

PONTVIANNE, F.; BLEVINS, T.; CHANDRASEKHARA, C.; MOZGOVÁ, I.; HASSEL, C.; PONTES, O.M.F.; TUCKER, S.; MOKROŠ, P.; MUCHOVÁ, V.; FAJKUS, J.; PIKAARD, C.S. Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. **Genes & Development**, New York, v. 27, n. 14, p. 1545–1550, June 2013.

PRIETO, J.-L.; MCSTAY, B. Pseudo-NORs: a novel model for studying nucleoli. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1783, n. 11, p. 2116–2123, July 2008.

QUATREFAGE, A. Etudes embryogéniques. Mémoire sur l'embryogénie des tarets. **Annales des Sciences Naturelles**, Paris, p. 3-11, 1849.

RAŠKA, I.; KOBERNA, K.; MALÍNSKÝ, J.; FIDLEROVÁ, H.; MAŠATA, M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. **Biology of the Cell**, Paris, v. 96, n. 8, p. 579–594, May 2004.

REEDER, R.H. Enhancers and ribosomal gene spacers. **Cell**, Cambridge, v. 38, n. 2, p. 349–351, Sept. 1984.

ROUSSEL, P.; ANDRÉ, C.; MASSON, C.; GÉRAUD, G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. **Journal of Cell Science**, London, v. 104, pt. 2, p. 327–337, Nov. 1993.

ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification of AgNOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. **Experimental Cell Research**, New York, v. 214, p. 465–472, May 1994.

RUZICKA, V. Zur Geschichte und Kenntnis der feineren Structur der Nucleolen centraler Nervenzellen. **Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger**, Jena, v. 16, p. 557-563, 1899.

SÁEZ-VÁSQUEZ, J.; MEDINA, F. The plant nucleolus. **Advances in Botanical Research**, London, v. 47, p. 1–46, May 2008.

SANIJ, E.; HANNAN, R.D. The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. **Epigenetics**, Barcelona, v. 4, n. 6, p. 374–382, Aug. 2009.

SANIJ, E.; POORTINGA, G.; SHARKEY, K.; HUNG, S.; HOLLOWAY, T. P.; QUIN, J.; ROBB, E.; WONG, L.H.; THOMAS, W.G.; STEFANOVSKY, V.; MOSS, T.; ROTHBLUM, L.; HANNAN, K.M.; McARTHUR, G.A.; PEARSON, R.B.; HANNAN, R.D. UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 183, n. 7, p. 1259–1274, Dec. 2008.

SARDANA, R.; O'DELL, M.; FLAVELL, R. Correlation between the size of the intergenic regulatory region, the status of cytosine methylation of rRNA genes and nucleolar expression in wheat. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 236, n. 2/3, p. 155–162, Mar. 1993.

SAVINO, T.M.; GÉBRANE-YOUNÈS, J.; MEY, J. de; SIBARITA, J.B.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 153, n. 5, p. 1097–1110, May 2001.

SCHUBERT, I. Chromosome evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 109–115, Feb. 2007.

SCHWARZACHER, H.G.; WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Human Genetics**, London, v. 63, p. 89–99, Nov. 1983.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. **Practical *in situ* hybridization**. Oxford: Bios Scientific, 2000. 203 p.

SILVA, F.P. da; VECHIATO, M.H.; HARAKAVA, R. EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* polyphyletic origin of strains. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 64–73, Jan. 2014.

SOLTIS, D.E.; ALBERT, V.A; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; de PAMPHILIS, C.W.; WALL, P.K.; SOLTIS, P.S. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 96, n. 1, p. 336–348, Jan. 2009.

STEFANOVSKY, V.Y.; PELLETIER, G.; BAZETT-JONES, D.P.; CRANE-ROBINSON, C.; MOSS, T. DNA looping in the RNA polymerase I enhancer is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 15, p. 3241–3247, June 2001.

SULLIVAN, G.J.; BRIDGER, J.M.; CUTHBERT, A.P.; NEWBOLD, R.F.; BICKMORE, W.A.; McSTAY, B. Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2867–2874, Apr. 2001.

SYLVESTER, J.E.; GONZALES, I.L.; MOUGEY, E.B. Structure and organisation of vertebrate ribosomal DNA. In: OLSON, M.O. **The nucleolus**. New York: Kluwer Academic; Plenum, 2004. p. 58–72.

TOLLERVEY, D.; LEHTONEN, H.; JANSEN, R.; KERN, H.; HURT, E. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 443–457, May 1993.

TYC, K.; STEITZ, J.A. U3, U8 and U 13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 8, n. 10, p. 3113–3119, July 1989.

WALLACE, H.; LANGRIDGE, W. Differential amphiplasty and the control of ribosomal RNA synthesis. **Heredity**, London, v. 27, p. 1–13, Aug. 1971.

WARNER, J.R. Distribution of newly formed ribosomal proteins in HeLa cell fractions. **The Journal of Cell Biology**, London, v. 80, p. 767–772, Mar. 1979.