

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

Mariana Alejandra Báez

**Correlação entre sítios de DNAr 45S e regiões organizadoras
nucleolares em espécies do gênero *Nothoscordum* Kunth
(Amaryllidaceae)**

RECIFE

2014

Mariana Alejandra Báez

Correlação entre sítios de DNAr 45S e regiões organizadoras nucleolares em espécies do gênero *Nothoscordum* Kunth (Amaryllidaceae)

Dissertação de mestrado apresentada por Mariana Alejandra Báez ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, área de concentração em Florística e Sistemática

Orientador: Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho (Departamento de Botânica)

RECIFE-PE

2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Báez, Mariana Alejandra

Correlação entre sítios de DNAr 45S e regiões organizadoras nucleolares em espécies do gênero *Nothoscordum* Kunth (Amaryllidaceae) / Mariana Alejandra Baéz. – Recife, 2014.

63 f. : il.

Orientador: Marcelo dos Santos Guerra Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação Biologia Vegetal, Recife, 2014.

Inclui referências

1. Genética vegetal 2. Botânica I. Guerra Filho, Marcelo dos Santos (orient.) II. Título.

MARIANA ALEJANDRA BÁEZ

**“CORRELAÇÃO ENTRE SÍTIOS DE DN_{Ar} 45S E
REDIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (RONs)
EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Nothoscordum*”**

APROVADO EM 28/02/2014

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Marcelo, dos Santos Guerra Filho (orientador) – UFPE

Dra. Ana Emilia Barros e Silva – UFPB

Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza - UFPE

Recife-PE
2014

Dedicada a minha filha Iara

Agradecimientos

A mi familia, mis papas Carlitos y Ely, mis hermanos Pamela, Gerardo y Karla, por apoyarme incondicionalmente, creer y confiar en mí siempre, por darme fuerzas en todo momento. Los amo miles.

A mi hija, Iara, por ser la luz en mi camino, las fuerzas para seguir adelante, por aguantar y entender tantas cosas desde tan chiquita, horas de estudio, horas de clases, horas de ausencia y mucho mas, Te amo hasta el infinito y mas allá.

A Dario, "Pique", mi novio, amigo, compañero en momento felices, mis fuerzas en momentos difíciles, por aguantar lo peor de mi y seguir al lado mío, Te amo más que muchísimo.

A Marcelo, por darme la oportunidad de trabajar y aprender a su lado, confiar en mí, tenerme una paciencia incansable, hablarme y aconsejarme siempre.

A mi familia del laboratorio, Andrea, Ana, Tiago R., Artur, Tiago E., André, Gustavo, Lucas, Brena, Duda, Thalita, Silvo y muy especialmente a Magda, Lili y Sandra por acompañarme dentro y fuera del laboratorio, por ser amigas, hermanas y consejeras. A todos muchas gracias por hacer de Recife lugar lindo.

Al Programa de Pos-graduación en Biología Vegetal y a CAPES, por el apoyo financiero.

Resumo

Os genes ribossomais são os genes mais estudados e melhor conhecidos nos eucariotas e sua exata localização nos cromossomos é conhecida em milhares de espécies. Os genes ribossomais 18S-5,8S-25S se localizam em um ou vários locos no genoma, chamados de sítios de DNAr 45S. A transcrição destes genes forma nos cromossomos metafásicos, regiões menos condensadas conhecidas como constrições secundárias ou regiões organizadoras de nucléolos (RONS). Em geral, ocorre apenas um par de sítios por cariótipo, mas em alguns genomas são detectados vários locos de DNAr 45S, sendo que nem sempre todos são ativos transcricionalmente, sugerindo que alguns sítios podem ser inativos temporária ou permanentemente. A expressão desses sítios pode ser avaliada pela coloração com nitrato de prata, que cora as proteínas nucleolares detectando os nucléolos e as RONS que apresentaram atividade transcricional na intérfase anterior. Contudo, a sensibilidade dessa técnica tem sido questionada principalmente porque alguns sítios nunca aparecem corados. Além disso, não se sabe se todos os sítios são funcionais ou se o tamanho ou a posição deles no cromossomo influencia na sua ativação. O gênero *Nothoscordum* apresenta espécies com cromossomos grandes, pouco numerosos e com alta variabilidade em número e posição dos sítios de DNAr, sendo um material ideal para avaliar a expressão dos sítios múltiplos. Sete espécies (10 citótipos diferentes), cujos sítios de DNAr já têm distribuição conhecida, foram analisadas utilizando duas técnicas diferentes de coloração com nitrato de prata, sendo uma delas mais eficiente na marcação das RONS enquanto a outra mais eficiente na coloração dos nucléolos em interfase. Os resultados sugerem que a ativação dos locos de DNAr não é ao acaso, mas é influenciada por sua distribuição no cromossomo. Assim, nas espécies com mais de um sítio de DNAr em um único cromossomo, raramente foi encontrada mais de uma RON. Em duas espécies que apresentaram sítios em cromossomos acrocêntricos e metacêntricos, observou-se que sítios nos acrocêntricos eram preferencialmente expressos. Em conjunto, esses dados indicam que apesar da variação no número de sítios de DNAr em *Nothoscordum*, os números modais de nucléolos e RONS se alteram muito pouco, levando à ativação preferencial de determinados sítios. Essa preferência provavelmente se deve a um conjunto de fatores, como número de cópias em cada sítio, posição no cromossomo e o ambiente genético de cada espécie.

Palavras-chaves: Ag-RONS. Nucléolo. Ativação preferencial. *Nothoscordum*

Abstract

The ribosomal genes are the most studied and best known genes in eukaryotes and its exact location on the chromosomes is known for thousands of species. The ribosomal genes 18S-5.8S-25S are located at one or more loci in the genome, named 45S rDNA sites. The transcription of these genes form regions less condensed in the metaphasic chromosomes, known as secondary contractions or nucleolar organizer regions (NORs). In general, there is only a couple of sites per karyotype, but in some genomes multiple 45S rDNA loci are detected, whereas not all of them are transcriptionally active, suggesting that some sites may be temporarily or permanently inactive. The expression of these sites can be assessed by silver staining, which strongly stain nucleolar proteins allowing the detection of nucleoli and NORs that were transcriptionally activated in the preceding interphase. Moreover, it is unclear whether all sites are functional or if the size or position on the chromosome, influences its activation. The *Nothoscordum* genus presents species with few and large chromosomes with high variability in number and position of rDNA sites, being therefore an ideal material to evaluate the expression of multiple sites. Seven species (10 different cytotypes) whose 45S rDNA sites distribution is already known, were analyzed using two different silver staining techniques, one of which was more efficient staining NOR while the other was more efficient staining of nucleoli in interphase. The results suggest that activation of rDNA loci is not random, but is influenced by its distribution within the chromosome. Thus, in species with more than one rDNA site on a single chromosome, more than one RON was rarely found. In two species with sites in metacentric and acrocentric chromosomes, sites were preferentially expressed in acrocentric chromosomes. Together, this data indicate that despite of the variation in the number of rDNA sites in *Nothoscordum*, nucleoli and NORs modal number nearly do not change, leading to preferential activation of certain sites. This preference is probably due to a combination of factors, such as number of copies at each site, position within the chromosome and genetic environment of each specie.

Key words: Ag-NORs. Nucleolus. Preferential activation. *Nothoscordum*

Sumário

1	Revisão bibliográfica	10
1.1	<i>Genes ribossomais.....</i>	10
1.1.1	Estrutura dos genes ribossomais 5S e 45S.....	10
1.1.2	Caracterização dos sítios de DNA ribossomais 5S e 45S.....	12
1.1.3	Controle dos genes ribossomais 45S	12
1.2	<i>Nucléolo</i>	14
1.2.1	Ultra-estrutura do nucléolo	16
1.2.2	Função do nucléolo.....	17
1.2.3	Nucléolo e RONS.....	18
1.3	<i>Coloração com nitrato de prata</i>	18
1.3.1	Ag-RONS e nucléolos	18
1.3.2	Ag-RONS e genes ribossomais 45S.....	19
1.3.3	Outras estruturas evidenciadas com a coloração com prata	20
1.4	<i>O gênero Nothoscordum.....</i>	20
1.4.1	Sítios ribossomais 45S no gênero <i>Nothoscordum</i>	21
2	Manuscrito a ser submetido na revista MICRON.....	24
2.1	<i>Introdução</i>	28
2.2	<i>Materiais e Métodos</i>	30
2.2.1	Materiais	30
2.2.2	Métodos	31
2.2.2.1	Coloração com prata.....	31
2.2.2.2	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	32
2.3	<i>Resultados.....</i>	32
2.3.1	Análises dos sítios de DNAr.....	32
2.3.2	Análise comparativa das técnicas de coloração com nitrato de prata.....	33
2.3.3	Variação no número de nucléolos por núcleo.....	33
2.3.4	Variação de números de RONS.....	34
2.3.5	Espécies com sítios de DNAr unicamente em cromossomos acrocêntricos.....	34
2.3.6	Espécies com sítios de DNAr unicamente em cromossomos metacêntricos.....	35
2.3.7	Espécies com sítios de DNAr em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos	35
2.4	<i>Discussão.....</i>	36

2.4.1	Efeito das diferentes técnicas de coloração com prata na detecção das RONS .	36
2.4.2	Eliminação de sítios de DNAr em espécies de <i>Nothoscordum</i>	36
2.4.3	Espécies com sítios múltiplos apresentam sítios inativos.....	38
2.4.4	Relação entre a posição dos sítios de DNAr e sua ativação	39
2.5	<i>Referências Bibliográficas</i>	40
3	Referências	46
	Anexo I	50
	Anexo II	60

1 Revisão bibliográfica

1.1 Genes ribossomais

Os genes ribossomais formam famílias multigênicas com centenas a milhares de unidades repetidas em tandem, em um ou mais locos no genoma, denominados sítios de DNAr (Tucker et al., 2010). Estas famílias têm função essencial em todas as células, uma vez que contêm a informação genética para os RNA ribossomais, ácido nucléico estrutural e catalítico que forma parte dos ribossomos. A transcrição destes genes é responsável por mais de 50% da transcrição do núcleo nas células em diferentes organismos (Hamperl et al., 2013). Existem quatro tipos de genes ribossomais, a transcrição de três deles, DNAr 18S, 5.8S e 25S, está associada à formação do nucléolo enquanto que a transcrição do quarto tipo, o DNAr 5S, não está associada à formação do nucléolo (Shaw, 2013), mas alguns *clusters* do tipo de DNAr 5S e seus transcritos estão associados à periferia da estrutura do nucléolo (Highett et al., 1993).

1.1.1 Estrutura dos genes ribossomais 5S e 45S

Em todos os eucariotas os genes ribossomais 18S, 5,8S e 25S se localizam juntos e estão constituídos por unidades repetidas em tandem de centenas a milhares de vezes, em um ou vários locos no genoma, denominados sítios de DNAr 45S. Cada unidade de repetição possui uma região codificadora altamente conservada entre os eucariotas (18S, 5,8S e 25S) que formam um *cluster* e são transcritos como uma unidade pela RNA polimerase I. Dentro desta região codificadora os genes estão separados por espaçadores internos (*Internal Transcribed Spacer*, ITS1 e ITS2), os quais são altamente variáveis em relação ao tipo de sequência e ao número de cópias de cada um. As regiões codificadoras estão separadas por um espaçador intergênico não codificante (*Intergenic Spacer*, IGS) que contém vários tipos de sequências, como sequências iniciadoras e finalizadoras da transcrição (TIS e TTS, respectivamente), sequências do promotor e sequências espaçadoras dos promotores, assim como também sequências de um espaçador não transcrito (NTS). O IGS está flanqueado por um espaçador externo transcrito (*External Transcribed Spacer*, ETS) (Volkov et al., 2007; Carvalho et al., 2010; Hamperl et al., 2013) (Fig. 1). A outra família gênica ribossomal são os DNAr 5S, os quais estão localizados no genoma de forma independente dos sítios de DNAr

45S, e são transcritos pela RNA polimerase III. Os genes 5S formam um *cluster* com unidades de repetição de aproximadamente 120 pb, altamente conservadas, que estão separadas por sequências espaçadoras, altamente variáveis (Highett et al., 1993) (Fig. 2).

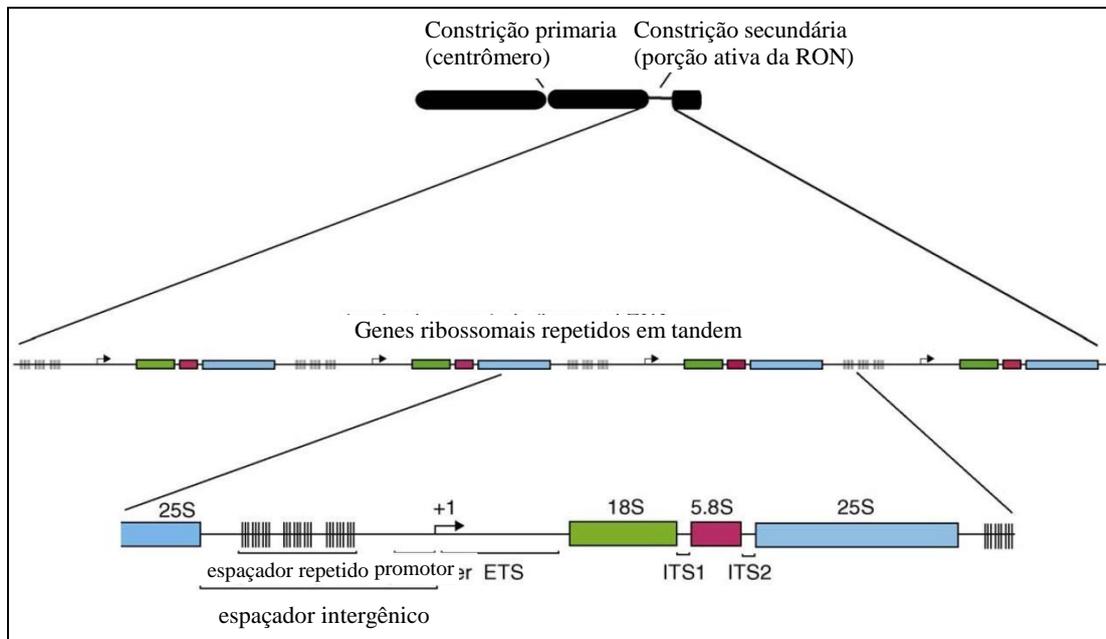


Fig. 1. Estrutura do DNAr 45S. Associados às constrições secundárias se encontram os genes ribossomais 18S, 5.8S e 25S, repetidos em tandem centenas a milhares de vezes. Em cada unidade de repetição, o gene 5.8S está flanqueado pelos espaçadores internos, ITS1 e ITS2. Cada grupo de três genes está separado por espaçadores intergênicos (IGS) que contêm diferentes sequências repetidas, como espaçadores, promotores e está flanqueada por espaçadores externos (ETS). Figura modificada de Tucker et al., 2010.



Fig. 2. Estrutura do DNAr 5S. As regiões codificadoras de ~120 pb estão separadas por sequências espaçadoras não transcritas (NTS), variáveis. Figura modificada de He et al., 2012.

1.1.2 Caracterização dos sítios de DNA ribossomais 5S e 45S

Os sítios de DNA ribossomais 45S ativos podem ser identificados citologicamente com técnicas de coloração convencional, por sua condensação diferencial nos cromossomos mitóticos, o que resulta na formação de constrições secundárias, sendo o centrômero a constrição primária (Preuss & Pikaard, 2007). A coloração clássica com nitrato de prata, também permite a identificação de sítios de DNAr 45S ativos (Item 2.3).

Os sítios de DNA ribossomais 5S e 45S existentes no genoma são detectados independentemente da sua atividade por meio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas contendo sequências de DNAr 5S ou DNAr 45S ou parte delas (Pedrosa et al., 2002). Esta técnica vem sendo utilizada para a caracterização e distribuição destes genes em diferentes espécies e para auxiliar na compreensão da evolução dos cariótipos em determinados táxons (ver por exemplo, Ksiazczyk et al., 2011 e Souza, 2012). Também podem ajudar na localização dos DNAr 45S, indiretamente, pela coloração com determinados fluorocromos, como a cromomicina A₃ (CMA) que apresenta uma afinidade preferencial por regiões do DNA ricas nos nucleotídeos GC, presente nos sítios de DNAr e portanto também se observam nas constrições secundárias (Moscone, 1999; Guerra, 2000). Em algumas espécies as bandas CMA⁺ se correlacionam também ao DNAr 5S (Cabral et al., 2006) ou outras sequências satélites (Barros e Silva et al., 2011). Por tanto, embora a coloração com CMA ajude na localização dos sítios de DNAr, elas também podem indicar outros tipos de sequências.

1.1.3 Controle dos genes ribossomais 45S

Durante a nucleogênese nem todos os sítios de DNAr 45S estão necessariamente ativos e participam da formação do nucléolo, especialmente nos casos em que muitos sítios estão presentes. Assim, unicamente um subconjunto do total terá seus genes transcritos e alguns serão totalmente inativos (McKeown & Shaw, 2009). Em plantas, a ativação dos genes ribossomais, os quais se assume que são idênticos em

sequência, é controlada por uma combinação de metilação de DNA, modificações de histonas e remodelamento da cromatina, o que os pode tornar ativos ou inativos (Lawrence et al., 2004; Grumt & Pikaard, 2003). Assim existem pelo menos três estados de cromatina diferente. 1) Os DNAr ativos que estão em uma cromatina “aberta”, em um "arranjo acessível"; 2) DNAr inativos que estão em uma cromatina “fechada”, em um "arranjo condensado", e 3) DNAr potencialmente ativos, com um arranjo de nucleosomos na cromatina, mais dinâmico que em genes inativos (Mckeown & Shaw, 2009). A manutenção de certa fração de genes ribossomais em um estado de cromatina “fechada” aparentemente é importante para a estabilidade genômica (Hamperl et al., 2013). O estado de cromatina “aberta” dos DNAr ativos está associado a modificações de histonas permissivas e à presença da RNA pol I. Por outro lado o estado de cromatina “fechada” dos DNAr inativos está associado à metilação de ilhas CpG, inibindo a atividade da RNA pol I, e também a marcas repressivas ou também permissivas de modificações de histonas. No entanto, alguns DNAr estariam localizados em outro tipo de cromatina, associada à pouca ou nenhuma metilação e à marcas permissivas de modificações de histonas, tornando-se mais dinâmica e podendo transitar de um estado de cromatina "fechada" a um estado de cromatina "aberta" e vice-versa (Mckeown & Shaw, 2009; Hamperl et al., 2013).

Os DNAr ativos estão agrupados em locos cromossômicos conhecidos como regiões organizadoras de nucléolos (RONS). Estes locos de DNAr são ativados preferencialmente dependendo do metabolismo do indivíduo e das necessidades fisiológicas da célula (Preuss & Pikaard, 2007; Tucker et al., 2010). Eles podem ser regulados por controle de dosagem, onde os sítios com maior número de cópias seriam ativados com maior frequência que sítios com menor número de cópias. Isto se deveria ao fato de que os promotores de sítios maiores seriam os primeiros a se unir com os fatores de transcrição e depois mais fatores de transcrição se uniriam aos promotores adjacentes cooperativamente (Zurita et al., 1999). Promotores de DNAr ativos são hipometilados e estão associados com modificações de histona típicas de eucromatina, como H3K4met3 e com RNA pol I. Por outro lado, promotores de DNAr silenciados são altamente metilados e associados com a modificação de histona típicas de heterocromatina, como H3K9met2 (Lawrence et al., 2004). Espaçadores intergênicos grandes com um alto número de sequências repetitivas adjacentes a promotores dos DNAr atuam como intensificadores da transcrição pela RNA pol I. Assim, diferenças na sequências ou no número de elementos reguladores do espaçador intergênico criam

condições favoráveis para sequestrar fatores de transcrição quando existem concentrações limitadas (Reeder & Roan, 1984, Rogers & Benedich, 1987).

Os DNAr ativos ocupam territórios particulares no núcleo, localizando-se dentro de nucléolos organizados, enquanto que DNAr silenciados são excluídos deste. Esta localização dentro e fora do nucléolo não é uma propriedade absoluta de um tipo de genes ribossomal, mas reflete o estado transcricional e epigenético, que pode mudar de acordo com as necessidades da célula. Assim, o excesso de DNAr coalesce em uma estrutura heterocromática densa externa ao nucléolo, mas poderia ser recrutada para dentro do nucléolo quando mais DNAr fossem requeridos metabolicamente (Pontvianne et al., 2013).

Nos híbridos interespecíficos, tanto em plantas como em animais, é observado um fenômeno epigenético reversível conhecido como dominância nucleolar ou anfiplastia. Nestes híbridos, o conjunto de DNAr herdado de um dos parentais é transcrito enquanto que o herdado do outro parental é silenciado (Pikaard, 1999; Ksjazcsyk et al., 2011). Isto foi inicialmente detectado de forma citológica como diferenças no grupo cromossômico que apresentava constrições secundárias nos indivíduos híbridos em relação aos seus respectivos genomas dos parentais (Viegas et al., 2002). Os mecanismos que atuam no silenciamento seletivo dos DNAr em híbridos ainda não são totalmente compreendidos, mas seriam os mesmos que atuam em espécies não híbridas, como controle por dosagem dos DNAr por meio de uma combinação entre mudanças na metilação do DNA, modificações nas histonas, inibição por siRNA via metilação do DNA dirigida por RNA, entre os mais estudados recentemente (Preuss & Pikaard, 2007; Tucker et al., 2010; Ksjazcsyk et al., 2011). Combinações interdependentes destes mecanismos foram amplamente estudadas em híbridos entre espécies do gênero *Arabidopsis* (Lawrence et al., 2004), do gênero *Brassica* (Chen & Pikaard, 1997) e em Triticales, híbridos formados a partir de trigo e centeio (Neves et al., 1995).

1.2 Nucléolo

O nucléolo é uma estrutura que se auto-organiza como resultado da transcrição do DNAr, sendo um domínio nuclear fundamental em todas as células, a maioria das quais contém um ou mais nucléolos dentro do núcleo, os quais podem ainda variar em tamanho (Jordan et al., 1982). Frequentemente os nucléolos apresentam uma cavidade ou vacúolo interno e central, chamado de vacúolo nucleolar (Shaw, 2010). Dentro deste

domínio nuclear existe uma associação de DNA, histonas, moléculas de RNA e proteínas mantidas juntas por interações entre seus componentes sendo considerado como um grande e extenso complexo multimolecular (Mckeown & Shaw, 2009; Shaw & Brown, 2012).

O nucléolo foi descrito pela primeira vez por F. Fontana em 1781, mas o nome foi dado por Gabriel Gustav Valentin em 1839 para denominar o “núcleo dentro do núcleo” (*apud.* Shaw, 2010). Devido à sua composição bioquímica, diferente do resto do núcleo, o nucléolo possui um índice de refração e propriedades de coloração diferentes do resto do núcleo, tornando-o visível aos microscópios ótico, eletrônico, de contraste de fase, etc. (Guerra, 1988; Thiry et al., 1991). Quando o núcleo é corado com diferentes corantes, como os corantes fluorescentes que se unem especificamente ao DNA, a cromatina nuclear aparece intensamente corada, enquanto o nucléolo geralmente aparece não corado. Esta situação se deve à presença de uma cromatina rica em genes ativos e altamente descondensada e espalhada no espaço nucleolar (Shaw, 2010).

Durante o ciclo celular a estrutura do nucléolo possui uma dinâmica de desintegração e remontagem (Sirri et al., 2008). Durante a interfase o nucléolo é uma estrutura estável, enquanto no início da mitose, na prófase tardia, a transcrição do DNAr é reprimida e o nucléolo se desintegra, não sendo mais observado ao longo das fases seguintes da mitose (Leung & Lamond, 2003). No final da mitose, o nucléolo se refaz pela fusão de pequenos corpos redondos, os corpos pré-nucleolares, contendo proteínas e pre-RNAr (Shaw, 2013). Este processo de remontagem, requer a restauração da transcrição dos DNAr e reativação da maquinaria necessária para o processamento dos pre-RNAs (Sirri et al., 2008). Proteínas envolvidas na maquinaria de transcrição dos DNAr permanecem associadas a estes nos cromossomos mitóticos, entretanto as proteínas envolvidas na maquinaria de processamento dos pré-RNAs não permanecem próximas aos DNAr mas se distribuem ao longo da superfície dos cromossomos (Guatier et al., 1992; Rossell et al., 1996).

O nucléolo mostra uma grande complexidade protéica, com quase 700 proteínas diferentes em animais e 200 em plantas, as quais estão envolvidas na transcrição dos DNAr e em outras funções (Andersen et al., 2002; 2005). Esta composição protéica não é estática, podendo ser alterada significativamente em resposta ao estado metabólico da célula, pois as proteínas podem migrar para dentro e fora do nucléolo, em fluxo constante com o núcleo e o citoplasma (Borer et al., 1989; Andersen et al., 2002).

Particularmente as proteínas ribossômicas são acumuladas mais rapidamente e por mais tempo dentro do nucléolo que outras proteínas e componentes nucleolares (Lam et al., 2007). Entretanto, acredita-se que não exista um complexo proteico nucleolar único e completo, mas sim existiria uma sobreposição de *sets* de complexos proteicos, que seriam relevantes em diferentes estados e condições celulares (Andersen et al., 2005).

1.2.1 Ultra-estrutura do nucléolo

O nucléolo está subdividido em uma região menor de fraca coloração, conhecida como centros fibrilares (CF), rodeada por uma região densamente corada, denominada componente fibrilar denso (CFD), e por regiões granuladas densamente empacotadas conhecidas como componente granular (CG) (Shaw & Brown, 2012). Existe uma variação considerável entre as estruturas do nucléolo de animais e plantas. Em nucléolos de animais, aparecem vários CF rodeados de CFD ambos imersos no CG (Scheer & Hock, 1999). Em plantas, o nucléolo tem CF pequenos ou às vezes não perceptíveis e o CFD mais extenso que em animais, o qual não se cora tão intensamente quanto o CG (Fig. 3) (Mckeown & Shaw, 2009).

Existem extensos estudos em relação à função de cada ultraestrutura dentro do nucléolo. Em animais, por meio de diversas técnicas, como impregnação com partículas de ouro ou nitrato de prata, indicaram que os centros fibrilares ou a região entre os centros fibrilares e os centros fibrilares densos são os lugares onde os DNAr, os núcleos de histonas e as enzimas localizam-se, onde ocorre a transcrição dos DNAr, e a partir da qual os transcritos migrariam para os centros fibrilares densos e para o componente granular para as seguintes etapas de maturação e montagem das subunidades ribossomais (Thiry et al., 1991; Scheer & Hock, 1999). Em plantas, os sítios onde ocorre a transcrição encontram-se dentro dos centros fibrilares densos, a partir dos quais os novos transcritos são formados e migram para dentro dos componentes granulares onde serão processados (Shaw & Brown, 2012).

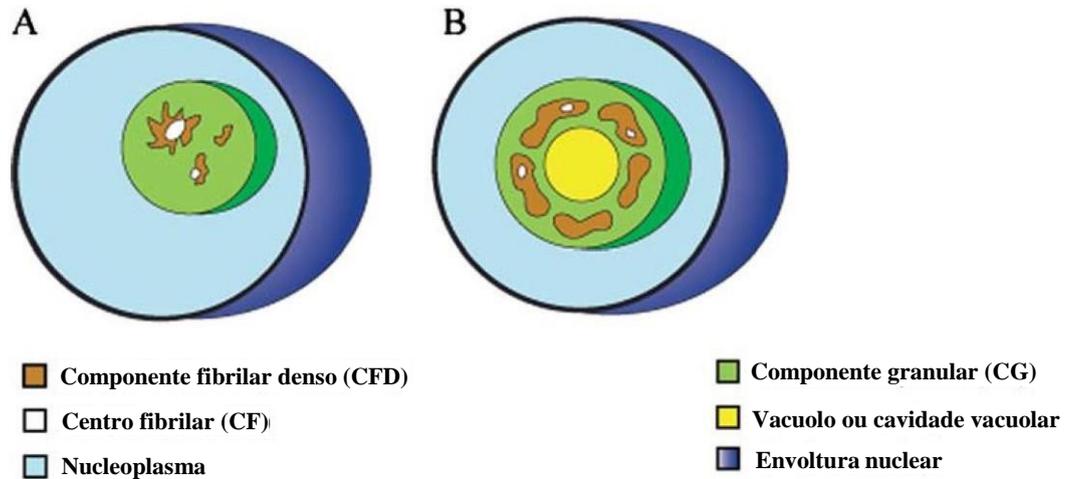


Fig. 3. Ultraestrutura do nucléolo. A) nucléolo em animais; B) nucléolos em plantas.

Figura modificada de Mckeown & Shaw, 2009.

1.2.2 Função do nucléolo

A função principal do nucléolo é a transcrição dos DNAr pela RNA polimerase I, maturação dos RNAr e montagem das subunidades ribossomais que posteriormente são enviadas para o citoplasma (Mckeown & Shaw, 2009). O nucléolo contém uma extensa complexidade proteica, dos quais aproximadamente 30% estão relacionados a biogêneses dos ribossomos. A regulação desta atividade nucleolar é necessária para manter uma quantidade suficiente de subunidades ribossomais para suportar os níveis de síntese proteica durante o crescimento e divisão celular (Boisvert et al., 2007). Entretanto, dentro do complexo proteico no nucléolo, existem diversas proteínas envolvidas em numerosas funções além da biogênese de ribossomos. Muitas são funções relacionadas ao RNA, como processamento dos RNA, montagem de riboproteínas, participação na biogênese de mRNA, entre outros (Visintin & Amon, 2000). O nucléolo também está envolvido em funções celulares, por meio do sequestro de proteínas específicas e liberando-as para a regulação desses processos (Boisvert et al., 2007). Proteínas fosfatase e ubiquitinases envolvidas na regulação da mitoses e progressão do ciclo celular, acumulam-se em grande quantidades no nucléolo, mostrando assim a importância deste domínio para a regulação desses processos (Azzam et al., 2004; Gong & Yeh, 2006). A estabilização de muitas proteínas também ocorre dentro do nucléolo, como por exemplo a proteína p53, envolvida numa cascata

de eventos de regulação do ciclo celular e apoptose, atuando assim como sensores de estresse celular (Olson, 2004). Esta multifunção do nucléolo se reflete na dinâmica de alterações da composição proteica em resposta a condições celulares (Boisvert et al., 2007; Shaw & Brown, 2012).

1.2.3 Nucléolo e RONS

Muitas das proteínas e fatores de transcrição envolvidos na transcrição do DNAr, como a RNA pol I, permanecem unidas a estes durante a desintegração do nucléolo em mitose constituindo as regiões organizadoras de nucléolos (RONS) nos cromossomos metafásicos (Thiry et al., 1991). Pela presença destas proteína e fatores de transcrição, essa região permanece mais descondensada do que o resto do cromossomo, formando uma contração secundária, sendo o centrômero o contração primária (Preuss & Pikaard, 2007).

Geralmente existe uma correlação entre o número de RONS e número máximo dos nucléolos nos núcleos interfásicos. Mais frequentemente se observa um número menor de nucléolos em núcleos interfásicos que Ag-RONS presentes nas células metafásicas, provavelmente devido à fusão dos produtos de várias RONS ativas em poucos nucléolos (Guerra e Nogueira, 1990; Pedrosa et al., 1997, Moscone, 1999).

1.3 Coloração com nitrato de prata

A coloração com nitrato de prata pode ser usada para detectar as regiões organizadoras nucleolares (Ag-RONS) que apresentam atividade transcricional na interfase anterior do ciclo celular. Isto é possível devido à presença de proteínas ácidas argentofílicas, ou seja, que possuem alta afinidade pela prata. As duas maiores proteínas argentofílicas encontradas associadas ao nucléolo são C23 e B23 (Lischwe et al., 1979). Estas proteínas nucleolares estão associadas aos DNAr transcionalmente ativos e permanecem ligadas a eles durante a mitose, formando as RONS nos cromossomos, associadas às contrações secundárias (Zurita et al., 1999; Boisvert et al., 2007).

1.3.1 Ag-RONS e nucléolos

Em várias espécies, tanto de animais como de plantas, o número máximo de nucléolos corresponde ao número de Ag-RONs, como por exemplo, algumas espécies do gênero *Allium* e do gênero de roedores *Eliomys* (Garrido et al., 1994; Zurita et al., 1999). No entanto, na maioria das espécies se observa um número menor de nucléolos que Ag-RONs, como foram observados em *Citrus sinensis* e espécies do gênero *Capsicum* (Pedrosa et al., 1997; Moscone, 1999). Este fenômeno em alguns casos pode ser atribuído à fusão das RONS em um único ou em poucos nucléolos, ou também poderia dever-se à ativação de poucos sítios de DNAr nessas células (Jordan et al., 1982; Vasconcelos et al., 2010).

1.3.2 Ag-RONs e genes ribossomais 45S

Na maioria das espécies o número máximo de Ag-RONs corresponde ao número de sítios de DNAr 45S. No entanto, apesar desta correlação em várias espécies, tem sido observados que alguns sítios de DNAr 45S não são detectados com a coloração com prata, o que sugere que estes sítios são transcricionalmente inativos (Carpeta et al., 2007; Cabrero & Camacho, 2008). Em muitos casos pode se estabelecer uma hierarquia de ativação das Ag-RONs, como no roedor *Eliomys quericinus*, onde os quatro sítios de DNAr 45S ativam-se hierarquicamente desde o maior sítio até o menor (Zurita et al., 1999). Em plantas, também foi observada ativação hierárquica das RONS, como por exemplo, no gênero *Citrus*, onde um dos sítios proximais é sempre ativo, seguido pelo sítio terminal em um cromossomo não homólogo e finalmente por o outro sítio proximal no homólogo ao do primeiro cromossomo ativado. Esta dominância entre sítios de DNAr presentes em cromossomos não homólogos, pode ser chamada de ativação em *trans* (Pedrosa et al., 1997). Em *Allium schoenoprasum*, com quatro sítios de DNAr 45S, aqueles encontrados no par cromossômico 8 são preferencialmente ativados em relação aos do par cromossômico 7 (Garrido et al., 1994). A ativação pode se dar entre os sítios de um par de cromossomos homólogos, chamada de ativação em *cis*. Isto acontece em *Eleutherine bulbosa*, com RONS em um par cromossômico heteromórfico, com um cromossomo metacêntrico, com uma RON duplicada, e um acrocêntrico. A Ag-RON no cromossomo metacêntrico se mostra hiperativada enquanto que a Ag-RONs do cromossomo acrocêntrico hipoativada (Guerra, 1991). A ativação preferencial também pode ocorrer dentro de um mesmo cromossomo, sendo dependente da posição na qual os sítios se encontram, como foi observado em *Hordeum vulgare*, (Schubert & Kunzel,

1990). Em algumas linhagens sintéticas desta espécie, as RONS nos pares cromossômicos 6 e 7 foram unidas em um mesmo cromossomo por meio de uma translocação. Neste cromossomo translocado, foi observado que a RON proveniente do par 7 era suprimida pela RON do par 6 na maioria dos casos. Este mecanismo é conhecido como dominância nucleolar intracromossômica (Shubert & Kunzel, 1990). No entanto, não se encontraram registros deste fenômeno na natureza.

Por outro lado, em algumas espécies de animais, como em *Taterillus* e *Erinaceus*, regiões cromossômicas positivas com a coloração com prata não se correspondem com sítios de DNAr detectados por FISH (Sanchez et al., 1995; Dobigny et al., 2002). Também regiões que formavam nucléolos sem a aparente presença de sítios de DNAr foram encontradas em gafanhoto. Este fenômeno foi atribuído à existência de RONS crípticas, que formariam pequenos nucléolos, derivados da transposição de poucas cópias de DNAr para novas posições cromossômicas e que não seriam detectadas por FISH. Estes seriam sítios formados *de novo*, que com amplificação posterior, dariam lugar a novos sítios de DNAr detectáveis por FISH (Cabrero & Camacho, 2008). Isto também foi observado em cromossomos politênicos de *Phaseolus coccineus* (Schweizer & Ambros, 1979)

1.3.3 Outras estruturas evidenciadas com a coloração com prata

Mais raramente, a coloração com prata pode também evidenciar outras regiões do cromossomo. Em várias espécies de mamíferos a coloração com prata evidencia o complexo sinaptonêmico e vesículas sexuais em células meióticas, facilitando o estudo desta estrutura (Pathak & Hsu, 1979). Nestas espécies também foi observado que as regiões com heterocromatina pericentromérica impregnaram mais nitrato de prata que o resto do cromossomo, mais as RONS são facilmente identificadas pela intensa coloração (Pathak & Hsu, 1979). Também, plantas se observa que regiões pericentroméricas e teloméricas são evidenciadas com a coloração com prata, entretanto as Ag-RONS são facilmente identificadas (Carvalho et al., 2010).

1.4 O gênero *Nothoscordum*

O gênero *Nothoscordum* (Amaryllidaceae), com ampla distribuição no sul da América do Sul, principalmente no Brasil, Uruguai e Argentina, está composto por

plantas perenes, herbáceas e com caule subterrâneo do tipo bulbo tunicado simples (Guaglianone, 1972). Compreende aproximadamente 25 espécies nativas da América do Sul (Crosa, 1972), incluindo diploides com $2n = 8$ (8M) ou $2n = 10$ (6M+4A), tetraploides com $2n = 16, 18, 19$ e 20 , hexaploides com $2n = 24$ e 26 e um octaploide com $2n = 32$ (Crosa, 1972). Análises citológicas e filogenéticas sugerem que o número básico do gênero seja $x = 5$, enquanto espécies com $n = 4$ ou múltiplos de quatro teriam surgido independentemente por fusão de acrocêntricos em algumas linhagens do gênero. A evolução do gênero parece ter sido fortemente influenciada por eventos de translocações Robertsonianas, responsáveis pela mudança de $n = 5$ para $n = 4$, e mudanças de número cromossômico nos poliplóides (Souza, 2012).

O gênero se encontra dividido nas seções *Inodorum* e *Nothoscordum*, baseada em características morfológicas (Guaglianone, 1972) que foram confirmadas por análises filogenéticas (Souza, 2012). As espécies da seção *Inodorum* mostraram uma importante diversidade nos padrões de bandas de CMA⁺ em indivíduos de um complexo poliploide formado por *N. gracile*, *N. macrostemon* e *N. nudicaule* (Souza, 2012). Algumas espécies com $x = 5$ (*N. gracile*, *N. macrostemon*) apresentam bandas CMA localizadas na região proximal do braço longo nos cromossomos acrocêntricos facilitando sua identificação e a detecção de translocações entre acrocêntricos e metacêntricos. Por exemplo, um citótipo com translocação desse tipo foi detectado em *N. gracile* (Souza et al., 2012) e outros em uma espécie não identificadas com $2n = 18$ (14M+4A) (Báez et al., dados não publicados).

Dentro da seção *Nothoscordum* não se observou grande variação na heterocromatina mas sim na distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S, que mostraram uma grande diversidade no padrão de distribuição e no número de sítios de DNAr. O número de sítios de DNAr é muito variável entre espécies e até entre indivíduos de uma mesma espécie (Souza, 2012).

1.4.1 Sítios ribossomais 45S no gênero *Nothoscordum*

Dentro do gênero, as espécies com $x = 5$ (3M+2A) apresentam sítios de DNAr 45S restritos aos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, como por exemplo, *N. pulchellum* e *N. gracile* (Guerra e Felix, 2000; Souza et al., 2012), mas também podem apresentar sítios de DNAr 45S adicionais em posição terminal dos braços longos de

acrocêntricos e nos metacêntricos em posição terminal e proximal, como por exemplo, *N. felipponei* e *N. marchesii*. Nas espécies com $n = 4$ (4M), os sítios estão localizados principalmente na região terminal de um ou ambos braços cromossômicos, como por exemplo, *N. gaudichaudianum*, *N. izaguirrae* e *N. ostenii*. Nesta última espécie também foi observada a presença de cromossomos acessórios ou cromossomos Bs, nos quais também se observaram sítios de DNAr. Estas diferenças entre poucos número de sítios de DNAr, restritos aos cromossomos acrocêntricos, e múltiplos sítios, em cromossomos acrocêntricos e metacêntricos, está claramente separada entre as duas seções do gênero. A primeira situação é característica da seção *Inodorum*, enquanto que, a segunda é característica da seção *Nothoscordum*. Ambas seções estão separadas filogeneticamente, por isto poderia-se supor que estas diferenças na variação do número de sítios de DNAr estaria relacionada à separação das duas seções (Souza, 2012).

Estudos da atividade transcricional do DNAr em *Nothoscordum* estão restritos a *N. gracile*. Esta espécie é a mais amplamente distribuída do gênero, apresentando diversos citótipos, todos com sítios de DNAr 45S unicamente nos cromossomos acrocêntricos. As análises de um único citótipo, mostraram que todos os sítios de DNAr 45S presentes coram fortemente com nitrato de prata, indicando que são transcionalmente ativos. Nas interfases desse citótipo foi observada a formação de um ou dois nucléolos (Sato et al., 1981; 1988). Além destes estudos não foram realizados estudos em outras espécies nem do gênero, nem da tribo a qual pertencem, existindo dentro do gênero várias espécies com múltiplos sítios de DNAr 45S, tanto em cromossomos metacêntricos como acrocêntricos e em diferentes regiões dentro de um mesmo cromossomo. O estudo da alta variabilidade de sítios nas espécies do gênero ajudaria no entendimento da dinâmica de ativação dos sítios de DNAr 45S

**Correlação entre sítios de DNAr 45S e regiões organizadoras do
nucléolo (RONS) em espécies do gênero *Nothoscordum***

Mariana Báez¹ e Marcelo Guerra¹

¹Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, Departamento de Botânica,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Autor para correspondência:

Marcelo Guerra

E-mail: msfguerra@hotmail.com

Resumo

Os genes ribossomais são os genes mais estudados e melhor conhecidos nos eucariotas e sua exata localização nos cromossomos é conhecida em milhares de espécies. A transcrição dos genes ribossomais 18S, 5,8S e 25S na interfase, resulta na formação de constrições secundárias ou regiões organizadoras de nucléolos (RONS) nos cromossomos metafásicos. Em geral, ocorre apenas um par de sítios de DNAr por cariótipo, mas em algumas espécies são detectados múltiplos sítios de DNAr e não se sabe se todos esses sítios são funcionais ou se o tamanho ou posição deles influencia na sua ativação. O gênero *Nothoscordum* apresenta espécies com cromossomos grandes, pouco numerosos e com alta variabilidade no número e posição dos sítios de DNAr, sendo portanto um material ideal para avaliar a expressão dos sítios múltiplos. Sete espécies (10 citótipos diferentes), cujos sítios de DNAr já têm distribuição conhecida, foram analisadas utilizando duas técnicas diferentes de coloração com nitrato de prata, sendo que uma delas foi mais eficiente na marcação das RONS enquanto a outra foi mais eficiente na coloração dos nucléolos em interfase. Os resultados sugerem que a ativação dos locos de DNAr não é ao acaso, mas é influenciada por sua distribuição no cromossomo. Assim, nas espécies com mais de um sítio de DNAr em um único cromossomo, raramente foi encontrada mais de uma RON. Nas duas espécies que apresentaram sítios em cromossomos acrocêntricos e metacêntricos, observou-se que sítios nos acrocêntricos foram preferencialmente ativos. Em conjunto, esses dados indicam que apesar da variação no número de sítios de DNAr em *Nothoscordum*, os números modais de nucléolos e RONS se alteram muito pouco, levando à ativação preferencial de determinados sítios. Essa preferência provavelmente se deve a um conjunto de fatores, como número de cópias em cada sítio, posição no cromossomo e o ambiente genético de cada acesso.

Palavras-chaves: Ag-RONS. Nucléolo. Ativação preferencial. *Nothoscordum*

Abstrat

The ribosomal genes are the most studied and best known genes in eukaryotes and its exact location on the chromosomes is known for thousands of species. Transcription of ribosomal genes 18S, 5.8S and 25S at interphase, results in secondary constrictions or nucleolar organizer regions (NORs) in metaphasic chromosomes. Usually occurs only a couple of rDNA sites by karyotype, whereas in some species multiple rDNA sites are detected and do not know if all these sites are functional and if their position or size influences in their activation. The *Nothoscordum* genus presents species with few and large chromosomes, with high variability in the number and position of rDNA sites, being an ideal material to evaluate the expression of multiple sites. Seven species (10 different cytotypes), whose rDNA sites distribution is already known, were analyzed with two different techniques of silver staining, one of which was more efficient in staining NOR while the other was more efficient in staining nucleoli at interphase. The results suggest that activation of rDNA loci is not random, but is influenced by its distribution within the chromosome. Thus, in species with more than one rDNA site on a single chromosome, more than one RON was rarely found. In two species with sites in metacentric and acrocentric chromosomes, sites were preferentially expressed in acrocentric chromosomes. Together this data indicate that, despite of the variation in the number of rDNA sites in *Nothoscordum*, nucleoli and NORs modal number nearly do not change, leading to preferential activation of certain sites. This preference is probably due to a combination of factors, such as number of copies at each site, position within the chromosome and genetic environment of each access.

Key words: Ag-NORs. Nucleolus. Preferential activation. *Nothoscordum*

2.1 Introdução

Os genes ribossomais desempenham um papel essencial em todas as células, uma vez que contêm a informação genética para os RNA ribossomais, que forma parte dos ribossomos, as estruturas responsáveis pela transdução de todas as proteínas das células. Os genes ribossomais 18S, 5,8S e 25S formam uma família multigênica com centenas a milhares de unidades repetidas em tandem, localizadas em um ou vários locos cromossômicos chamados de sítios de DNAr 45S (Tucker et al., 2010).

Além dos genes RNAr 45S, uma segunda família de genes ribossomais, os genes RNAr 5S, também formam locos com centenas de unidades de repetição em tandem. Essas duas famílias contribuem equitativamente para a formação dos ribossomos (Tucker et al., 2010), mas os genes RNAr 5S são menos estudados porque não formam uma estrutura citológica detectável na interfase, não se encontra fisicamente associado ao nucléolo e não têm sua expressão facilmente mensurável, como ocorre com os genes RNAr 45S. O nucléolo é o domínio nuclear onde ocorre a transcrição dos DNAr 45S pela RNA polimerase I, a maturação dos RNA ribossomais e a montagem das subunidades ribossomais, as quais são posteriormente enviadas para o citoplasma (Mckeown & Shaw, 2009). Durante a nucleogênese, nem todos os sítios de DNAr 45S são necessariamente ativados e participam da formação do nucléolo, especialmente nos casos em que muitos sítios estão presentes. Em plantas, a ativação dos genes ribossomais é controlada por uma combinação de metilação de DNA, modificações de histonas e remodelamento da cromatina (Grummt & Pikaard, 2003; Lawrence et al., 2004).

Durante a condensação dos cromossomos na mitose, muitas das proteínas e fatores de transcrição envolvidos na transcrição dos DNAr 45S permanecem unidas a estes formando regiões menos condensadas que constituem as contrações secundárias ou regiões organizadoras de nucléolos (RONS). Algumas dessas proteínas são argentofílicas, ou seja, possuem alta afinidade pela prata, permitindo detectar os nucléolos e as RONS que apresentaram atividade transcricional na intérfase anterior do ciclo celular e que conservaram essas proteínas na constrição secundária (Ochs et al., 1983). Por essa razão, a coloração com nitrato de prata tem sido amplamente utilizada para reconhecer o número de RONS ativas e o número de nucléolos. Os nucléolos são formados durante a telofase inicial a partir de cada sítio ativo, mas logo tendem a coalescer em um único nucléolo central (Shaw, 2012). Entretanto, o número máximo de

nucléolos de capa espécie geralmente coincide com o número de RONS ativas (Vieira et al., 1990; Moscone et al., 1995).

Apesar da correlação entre RONS coradas com nitrato de prata (denominadas Ag-RONS ou simplesmente RONS) e os sítios de DNAr 45S (referidas aqui como sítios de DNAr), em várias espécies têm sido observado sítios nos cromossomos que não são detectados com prata, o que sugere que estes sítios seriam temporária ou permanentemente inativos (Carpeta et al., 2007; Cabrero & Camacho, 2008).

Mais raramente, tem sido observadas regiões cromossômicas positivas com a coloração com prata que não correspondem a sítios de DNAr detectados por FISH (Dobigny et al., 2002; Cabrero & Camacho, 2008). Este fenômeno foi atribuído à existência de RONS crípticas contendo poucas cópias de DNAr não detectáveis por FISH, mas capazes de formar pequenos nucléolos (Cabrero & Camacho, 2008).

Além disso, em algumas espécies, a coloração com nitrato de prata pode também marcar outras regiões do cromossomo, como o complexo sinaptonêmico e vesículas sexuais de células meióticas animais (Pathak & Hsu, 1979), o cinetócoro (Stack et al., 1991) e as regiões com heterocromatina pericentromérica (Pathak & Hsu, 1979; Hizume et al., 1992). A técnica de coloração com nitrato de prata tem sido utilizada de formas muito variáveis. Por exemplo, alguns autores usaram uma solução de prata a 2% (Vieira et al., 1990) e outros a 50% (Stack et al., 1991) ou 100% (Jimenez et al., 1988) diluída em água destilada (Stack et al., 1991) ou formicada (Rufas et al., 1987). Tudo isso, tem levado a dúvidas sobre a sensibilidade da coloração com nitrato de prata para detectar as RONS (Dobigny et al., 2002), embora essa técnica continua sendo a mais utilizada e geralmente efetiva na detecção das RONS.

Na maioria dos gêneros de plantas, o número e a posição dos sítios de DNAr varia pouco entre as espécies e mais frequentemente é restrito a um único par de sítios por cariótipo (Roa & Guerra, 2012). Entre os gêneros que apresentam sítios múltiplos de DNAr destaca-se o gênero *Nothoscordum*, que apresenta cromossomos grandes, variação no número cromossômico e variação intraespecífica e interespecífica no número de sítios de DNAr (Souza et al., 2010; Souza, 2012). Os cromossomos dessas espécies podem ser metacêntricos (M) ou acrocêntricos (A), combinados em diferentes fórmulas cariotípicas devido a eventos de Translocação Robertsoniana (Souza, 2012). As espécies com $2n = 10$ (6M+4A), ou múltiplos desse, apresentam sítios de DNAr restritos aos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, como em *N. pulchellum* e *N. gracile*, ou possuem sítios adicionais terminais e/ou proximais em ambos os tipos

cromossômicos, como em *N. felipponei* e *N. marchesii*. Nas espécies com $2n = 8$ (8M), ou múltiplos relacionados, os sítios estão localizados principalmente na região terminal de um ou ambos os braços cromossômicos, como em *N. gaudichaudianum* e *N. ostenii*. Nesta última espécie, foi observada a presença de cromossomos acessórios ou cromossomos Bs, também portadores de sítios de DNAr (Souza, 2012). Análises da atividade desses sítios é restrita *N. gracile* $2n = 19$ (13M+6A), que apresenta seis sítios de DNAr (Souza et al., 2012), seis RONS e um ou dois nucléolos nas interfases corados com nitrato de prata (Sato et al., 1981, 1988). Em *N. pulchellum* $2n = 10$ (6M+4A) com apenas um par de sítios de DNAr, localizado nos braços curtos de um dos pares de cromossomos acrocêntricos, parecia associado a um único nucléolo (Guerra & Felix, 2000). No acesso tetraploide de *N. pulchellum*, os sítios de DNAr não foram previamente analisados mas a coloração com CMA/DAPI e com nitrato de prata revelou apenas quatro acrocêntricos com bandas CMA⁺, que geralmente correspondem a sítios de DNAr, e quatro RONS (Roa & Guerra, 2006).

Neste trabalho, foi analisada a variação do número de nucléolos por núcleo e de RONS em cromossomos metafásicos, em sete espécies do gênero *Nothoscordum* (10 citótipos diferentes). Foi realizada uma análise comparada do número e posição das RONS com os sítios de DNAr conhecidos para essas espécies. As espécies selecionadas visaram primeiramente verificar a ocorrência de sítios crípticos ou inativos, o que poderia explicar a extensa variação no número de sítios no gênero.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Materiais

Foram analisadas sete espécies, 10 acessos, do gênero *Nothoscordum*: *N. pulchellum* ($2n = 10$ e $2n = 20$) uma das poucas espécies do gênero que apresenta cromossomos acrocêntricos sem sítios de DNAr no braço curto; *N. gracile* ($2n = 19$ e $2n = 18$) que sugere fusões de acrocêntricos, mas não foi revelado por FISH nenhum DNAr existentes nos metacêntricos; *N. gaudichaudianum* ($2n = 8$ e $2n = 16$) e *N. izaguirrae* ($2n = 24$) com vários sítios terminais pequenos em cromossomos metacêntricos; *N. ostenii* ($2n = 16$), com sítios terminais e alguns proximais em cromossomo metacêntricos; *N. felipponei* ($2n = 10$) e *N. marchesii* ($2n = 10$) com sítios terminais e alguns proximais em cromossomo metacêntricos. A distribuição dos sítios de DNAr nos

acessos previamente investigados se apresentam em forma de idiogramas na Figura 1 (Souza, 2012). Bulbos de todas as espécies, exceto *N. pulchellum* (coletado originalmente na Serras das Russas, Pernambuco), foram gentilmente cedidos pelo Prof. Orfeo Crosa, da Universidad de la República de Uruguay e cultivados no Jardim Experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco. A Tabela 1 mostra a procedência de todas as espécies analisadas com seus respectivos números de acessos.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Coloração com prata

Nucléolos e RONS foram analisados comparativamente utilizando duas técnicas de coloração com prata. Em uma delas, a impregnação com prata foi feita diretamente na lâmina (coloração direta) com base no protocolo de Hizume et al. (1980) e na outra (coloração indireta) as raízes foram primeiro coradas com prata e depois esmagadas na lâmina com base no protocolo de Vieira et al. (1990). Diversos testes para as duas técnicas foram realizados primeiramente em *N. pulchellum* ($2n = 10$) e em *N. gracile* ($2n = 19$, $2n = 18$). Em ambas as técnicas as pontas de raízes foram primeiramente pré-tratadas com colchicina 0,2% por 24hs a 10°C.

Para a coloração direta na lâmina, as raízes foram fixadas em etanol:ácido acético glacial (3:1 v/v) de 2 a 24 hs à temperatura ambiente e estocadas a -20°C. Para o esmagamento, as raízes foram lavadas em água destilada três vezes e digeridas em solução de celulase (Onozuka) 2%- pectinase (Sigma) 20% a 37 °C por 90 min. O meristema foi macerado em ácido acético 45% e a lamínula removida em nitrogênio líquido. Os melhores resultados foram obtidos com pequenas modificações do protocolo de Hizume et al. (1980), utilizando uma solução fresca de 50% de nitrato de prata em água formicada em lâminas cobertas com lamínula de vidro, incubação a 60°C no banho Maria por 40-50 min, após a incubação a lamínula foi retirada com um jato de água e as lâminas secadas ao ar e montadas em glicerol sem contracorante.

Para a técnica de coloração indireta, as raízes foram fixadas em FAA (50% etanol:37% formaldeído:ácido acético glacial) na proporção 18:1:1, v/v/v, por 4 hs à temperatura ambiente e estocadas a -20°C. As raízes foram lavadas em água destilada três vezes e imersas em uma solução de 20% de nitrato de prata diluída em água destilada. Em seguida as raízes foram lavadas três vezes em água destilada e a prata foi

revelada em uma solução de hidroquinona diluída em formaldeído. Os melhores resultados foram obtidos com pequenas modificações do protocolo de Vieira et al. (1990), utilizando tempo de incubação na solução de prata a 60°C de 24hs, revelação em hidroquinona 1% diluída em formaldeído a 10% (1:1 w/v) por 10 a 15 min e a montagem das lâminas em glicerol sem contracorante.

As células foram analisadas no microscópio de fluorescência Leica CTR5500 e a captura de imagens foi feita com uma câmera de vídeo DFC 345 FX e *software* Leica LAS AF. As imagens foram editadas no Adobe Photoshop CS3.

2.2.2.2 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A localização dos sítios de DNAr nos acessos de *Nothoscordum* analisados, foi feita previamente por Guerra & Felix (2000) e Souza (2012), exceto para os acessos de *N. gaudichaudianum* $2n = 16$, *N. ostenii* $2n = 16$ e *N. pulchellum* $2n = 20$. A localização dos sítios de DNAr 45S em *N. pulchellum* $2n = 10$ e $2n = 20$, foi realizada com o propósito de verificar especificamente possíveis sítios extra, foi utilizando para isso uma sonda um clone com um fragmento de 6,5 kb (R2) do DNAr 45S (18S-5,8S-25S) de *Arabidopsis thaliana* (Wanzenböck et al., 1997). A marcação da sonda com Cy3 e com FITC e sua detecção, foram feitas seguindo os protocolos utilizados previamente para outras espécies de *Nothoscordum* (ver Souza et al., 2010; 2012). A análise por FISH do acesso utilizado aqui de *N. gaudichaudianum* $2n = 16$ e *N. ostenii* $2n = 16$ não foi possível por escassez de material. Por esta razão o número e posição dos sítios para essas espécies se referem ao acesso 1320 e 1455, respectivamente, investigados por Souza (2012).

2.3 Resultados

2.3.1 Análises dos sítios de DNAr

O número e posição dos sítios de DNAr de *N. pulchellum* $2n = 10$, utilizando marcação direta da sonda de DNAr e super-exposição na captura das imagens no microscópio, não revelou nenhum sítio adicional além dos descritos previamente para um dos pares de cromossomos acrocêntricos (Fig. 2 A-C) No citótipo com $2n = 20$,

apenas dois pares de acrocêntricos apresentaram sítios de DNAr (Fig. 2 D-F). Para todas as espécies, exceto *N. pulchellum* $2n = 20$, o número e posição dos sítios de DNAr correspondem aos dados de Souza (2012).

2.3.2 Análise comparativa das técnicas de coloração com nitrato de prata

Utilizando a técnica de coloração direta na lâmina, as células metafásicas mostraram RONS bem definidas e contrastadas em relação ao resto do cromossomo. No geral, as regiões teloméricas se mostraram um pouco mais coradas que o resto do cromossomo (Fig. 3 A, B e Fig. 4 B, D, E, F), sugerindo um artefato produzido pela técnica. A maior limitação dessa técnica é o fato de que ocorre com frequência precipitação da prata e os núcleos em intérfase se mostraram frequentemente mal conservados. Na coloração indireta, entretanto, os nucléolos foram sempre bem marcados e a cromatina nuclear e cromossômica foi melhor preservadas. Também foram observadas pequenas estruturas globosas, mais intensamente coradas, associadas à superfície dos nucléolos (Fig. 3 C, E). As RONS se mostraram bem definidas e contrastadas em relação ao resto do cromossomo. O único problema foi que a maioria das metáfases mostrou uma forte coloração na região proximal dos cromossomos em todas as espécies (Fig. 3 F, G e Fig. 4 A, C, G-I). Nas espécies com sítios de DNAr proximais foi difícil diferenciar marcações inespecíficas proximais das RONS verdadeiras (Fig. 4 G, J). Portanto, a análise de número de nucléolos por núcleo foi feita exclusivamente em lâminas com coloração indireta, enquanto que para o número de RONS por célula foram utilizadas ambas as técnicas, mas a maioria das células consideradas na análises de cada espécie foram das lâminas com coloração direta. Contudo, em *N. felipponei* por escassez de material, foi utilizada apenas a técnica de coloração indireta.

2.3.3 Variação no número de nucléolos por núcleo

Em todos os acessos, o número modal de nucléolos por núcleo variou de um, em *N. pulchellum* ($2n = 10$) e *N. gracile* ($2n = 19$ e $2n = 18$), dois, em *N. pulchellum* ($2n = 20$) e *N. gaudichaudianum* ($2n = 8$ e $2n = 16$), a dois ou três nas demais espécies. O número máximo de nucléolos por núcleo variou de dois a sete por núcleo, sendo que nas espécies com poucos sítios de DNAr (2 a 6) o número máximo de nucléolo

correspondeu ao número de sítios enquanto que em espécies com muitos sítios (10 a 24) o número máximo de nucléolos foi sempre menor que o número de sítios (Tabelas 2 e 3).

2.3.4 Variação de números de RONS

O número de RONS variou de um a onze por célula, entretanto o número modal para todas as espécies se manteve em torno de três por célula. O número modal de RONS foi sempre maior que número modal de nucléolos, provavelmente devido à uma tendência de fusão dos nucléolos. De forma geral, considerando o número máximo de RONS, cerca de 70 % dos sítios de DNAr pareceram potencialmente ativos, enquanto o número modal de RONS sugere que na maioria das células com mais de dois pares de sítios, apenas 40% dos sítios de DNAr foi ativado. Em geral, na medida que o número de sítios de DNAr por célula aumenta, a porcentagem de sítios ativos diminui. Nas espécies com poucos sítios (dois a seis), o número máximo de RONS coincide com o número de sítios de DNAr, ou seja, 100% dos sítios são potencialmente ativos, exceto para *N. gaudichaudianum* $2n = 8$, com seis sítios e no máximo cinco RONS, enquanto nas espécies com maior número de sítios (10 a 24), o número máximo de RONS foi sempre menor que o número de sítios de DNAr (Fig. 5) (Tabela 2).

2.3.5 Espécies com sítios de DNAr unicamente em cromossomos acrocêntricos

Apenas os acessos de *N. pulchellum* $2n = 10$ e $2n = 20$ e *N. gracile* $2n = 19$ e $2n = 18$ apresentaram sítios de DNAr exclusivamente nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos. *Nothoscordum pulchellum* $2n = 10$ e $2n = 20$ foram os únicos acessos que apresentaram número de sítios menor que o número de cromossomos acrocêntricos (Fig. 2 A, C). Em *N. pulchellum* diploide ($2n = 10$, 6M+4A) foram observadas duas RONS, em todas as células, localizadas no par acrocêntrico maior (Fig. 3 A). Este par foi sempre heteromórfico, com uma das RONS maior que a outra. Em *N. pulchellum* tetraploide ($2n = 20$, 12M+8A), foram observadas quatro RONS em todas as células (Fig. 3 B).

Em *N. gracile* $2n = 19$ (13M+6A) e $2n = 18$ (14M+4A), com sítios de DNAr nos braços curtos de todos os acrocêntricos, foram observados de uma a seis RONS para o primeiro, e de duas a quatro no último (Fig. 3 F, G). Portanto, o número modal de

RONS nos quatro acessos correspondeu ao número máximo de RONS e ao número de sítios de DNAr (Tabela 2 e 4).

2.3.6 Espécies com sítios de DNAr unicamente em cromossomos metacêntricos

No diploide *N. gaudichaudianum* $2n = 8$, com seis sítios de DNAr, nos tetraploides *N. gaudichaudianum* $2n = 16$ e *N. ostenii* $2n = 16$ e no hexaploide *N. izaguirrae* $2n = 24$, todos com número similar de sítios de DNAr, o número modal e o número máximo de RONS foram menores que o número de sítios de DNAr (Fig. 4 A-G, I). Das 49 células analisadas de *N. ostenii*, duas apresentaram um cromossomo B, sem marcação de RONS, enquanto a análise anterior com FISH revelou sítios de DNAr bem pequenos em ambos os braços dos dois Bs presentes (Fig. 4 E, G). Nestas espécies, a quase totalidade das células apresentou duas a quatro RONS. Além disso, o único acesso diploide, *N. gaudichaudianum* $2n = 8$, apresentou predomínio de duas RONS em um mesmo cromossomo enquanto que no acesso poliploide dessa espécie, bem como nas outras duas espécies, as RONS foram restritas a um sítio por cromossomo (Tabela 5).

2.3.7 Espécies com sítios de DNAr em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos

Dos 12 sítios de DNAr em *N. felipponei*, quatro estão nos braços curtos dos acrocêntricos e quatro terminais nos braços longos dos mesmos acrocêntricos, além de quatro sítios terminais nos metacêntricos. Foram observados de dois a cinco RONS por célula, sendo três RONS o número modal (Fig. 4 H). No total, os sítios terminais dos acrocêntricos foram ativados com maior frequência que os quatro sítios proximais dos acrocêntricos e os quatro sítios dos metacêntricos (Tabela 6). Em *N. marchesii*, a ativação dos sítios nos acrocêntricos foi bem diferente, dos 24 sítios de DNAr quatro são proximais nos braços curtos e quatro terminais dos braços longos nos acrocêntricos e nos metacêntricos seis são proximais e dez terminais, foram observados de duas a onze RONS por célula, sendo três o número modal (Fig. 4 J). No total, os sítios proximais dos acrocêntricos foram mais frequentemente ativados (Tabela 7). Contudo, tanto em *N. felipponei* como *N. marchesii*, não foi observada uma hierarquia de ativação, onde os terminais só são ativados depois de que os sítios proximais nos acrocêntricos terem sido ativados ou vice versa.

2.4 Discussão

2.4.1 Efeito das diferentes técnicas de coloração com prata na detecção das RONS

As duas técnicas de coloração com nitrato de prata utilizadas neste trabalho marcam efetivamente as RONS, mas também marcam regularmente as regiões cromossômicas proximais (coloração indireta) e de forma variável as regiões terminais (coloração direta). As diferenças encontradas nas marcações podem ser devidas ao tipo de fixação utilizada em cada uma das técnicas. Estudos comparativos da coloração com nitrato de prata em plantas, mostram que o formaldeído utilizado na fixação de raízes estabiliza a cromatina nuclear e preserva melhor a estrutura e ultraestrutura nucleolar (Daskal et al., 1980; Stack et al., 1991). Isto também explicaria a presença de nucléolos bem definidos e cromatina nuclear e cromossômica melhor preservadas em raízes fixadas com formaldeído:álcool etílico:ácido acético glacial (FAA). A coloração de regiões proximais e terminais com nitrato de prata tem sido observada em outras espécies, como em trigo (Carvalho et al., 2010), cebola e outras espécies (Stack et al., 1991). Em *Pisum* e *Cycas*, a impregnação intensa de prata na região proximal foi atribuída à presença de heterocromatina centromérica (Lamm, 1981; Hizume et al., 1992). Entretanto, em nenhuma das espécies de *Nothoscordum* há indícios de heterocromatina centromérica (Guerra & Felix, 2000; Souza, 2012) e a detecção de regiões proximais coradas com nitrato de prata estaria aparentemente relacionada à fixação com FAA. No entanto, vale salientar que em *N. gracile* os cromossomos acrocêntricos possuem blocos de heterocromatina na região intersticial-proximal dos braços longos (Sato et al., 1988; Souza et al., 2012), que não são reconhecíveis com nenhuma das técnicas de coloração com prata. Provavelmente, a marcação das regiões proximais está relacionada a que algumas proteínas argentofílicas da região pericentromérica são conservadas pelo formaldeído enquanto que nas células fixadas com etanol:ácido acético elas são desnaturadas ou eliminadas. A coloração das regiões cromossômicas terminais após fixação com etanol:ácido acético, pode ser devida a uma maior impregnação das bordas cromossômicas, especialmente dos telômeros e tem sido observada em várias outras espécies (ver por exemplo, Moscone et al., 1995; Carvalho et al., 2010).

2.4.2 Eliminação de sítios de DNAr em espécies de *Nothoscordum*

Os acessos de *N. pulchellum* e *N. gracile* analisados não revelaram nenhum indicio de sítios crípticos, como esperados com base nas características desses cariótipos. O acesso

diploide de *N. pulchellum* com $2n = 10$ (3M+2A) possui dois pares de acrocêntricos, um deles apresenta sítios de DNAr, cora intensamente com banda C, bandas CMA⁺/DAPI, apresenta nucléolo associado na meiose, forma pequena constrição secundária e satélite (Guerra & Felix, 2000), e mostrou um par de RONS marcadas com prata. O outro par de acrocêntricos, no entanto, não apresenta nenhuma dessas características, mesmo quando foi feita uma super-exposição durante na captura das imagens das metáfases com hibridização *in situ* fluorescente utilizando uma sonda de DNAr 45S marcada diretamente com Cy3. O mesmo ocorre com o acesso tetraploide dessa espécie, que também mostrou RONS unicamente em dois dos quatro pares de cromossomo acrocêntricos (Roa & Guerra, 2006; presente trabalho). O número máximo de nucléolos por núcleo, em ambos os acessos, também indicou a existência de dois organizadores nucleolares no diploide e quatro no tetraploide.

A expectativa de que todos os braços curtos dos acrocêntricos tivessem sítios de DNAr se deve ao fato de que em todas as demais espécies, das duas seções de *Nothoscordum* que apresentam cromossomos acrocêntricos, ocorrem sítios de DNAr nos braços curtos (Souza et al., 2010; Souza, 2012). Isso sugere que o cariótipo ancestral de *N. pulchellum* teria sítios em ambos os cromossomo acrocêntricos e que estes foram eliminados especificamente nessa espécie. *Nothoscordum pulchellum* ocorre exclusivamente no nordeste do Brasil, de forma disjunta do restante do gênero e possui um dos maiores complementos cromossômicos diploide conhecidos na Subtribo Ipheiae (Guerra & Felix, 2000; Souza, 2012), sugerindo que durante sua evolução tenha perdido algumas características cariotípicas básicas do grupo. Existem espécies de outros vários gêneros de plantas que também contem várias espécies que possuem cromossomos acrocêntricos apresentando alguns deles com sítios de DNAr 45S nos braços curtos e outros sem sítios (ver por exemplo, Baeza et al., 2007; Shan et al., 2003), mas raramente de forma tão particularizada.

Nos acessos de *N. gracile* $2n = 19$ (13M+6A) e $2n = 18$ (14M+4A), as fórmulas cariotípicas sugere que tenha havido fusão de cromossomos acrocêntricos, uma vez que o número esperado para os tetraploides, com base nos diploides relacionados, seria $2n = 20$ (12M+8M). A análise desses acessos com sondas de DNA telomérico não revelou sítios proximais dessas sequências (Souza, 2012), sugerindo que a fusão de acrocêntricos não tenha sido por translocação Robertsoniana entre telômeros. Assim, como os acrocêntricos dos diploides relacionados têm sítios de DNAr nos braços curtos (Souza, 2012), a translocação Robertsoniana poderia ter ocorrido entre *repeats* de DNAr, gerando um

metacêntrico estruturalmente dicêntrico. Quando um cromossomo dicêntrico tem dois centrômeros próximos um deles geralmente é inativado, passando à condição monocêntrica (Han et al., 2006). Portanto, em *N. gracile* seria esperado encontrar um ou dois cromossomo metacêntricos com um sítio de DNAr na região proximal para os citótipos com $2n = 19$ e $2n = 18$ respectivamente, mas a análise de RONS nem a de nucléolos trouxeram qualquer indicio de sítios crípticos, sugerindo que teria havido eliminação desses sítios nos metacêntricos.

2.4.3 Espécies com sítios múltiplos apresentam sítios inativos

Nas espécies de *Nothoscordum* com 10 ou mais sítios de DNAr, o número máximo de RONS e de nucléolos foi sempre menor que o número de sítios e de forma geral apenas 40% deles foram ativos na maioria das células analisadas, sugerindo que os demais sítios são temporária ou permanentemente inativos. Os sítios não transcritos podem estar temporariamente bloqueados, o que tem sido mais frequentemente demonstrado, ou também pode ser definitivamente inativados (Chen & Pikaard, 1997; Preuss e Pikaard, 2007). Os sítios de DNAr temporariamente bloqueados frequentemente se encontram fortemente metilados, impedindo sua transcrição (Lawrence et al., 2004). Isso pode ser demonstrado por imunodeteccção com 5-metil-citosina e diferentes modificações de histonas (Tucker et al., 2010; Ksiazczyk et al., 2011) ou por desmetilação induzida, que leva a ativação desses sítios (Lawrence et al., 2004). Sítios de DNAr permanentemente inativados tendem provavelmente a serem rapidamente eliminados, ao não serem controlados pela seleção e por isso são mais difíceis de serem encontrados na natureza (Hamperl et al., 2013).

A inativação temporária ou permanentemente desses sítios também pode estar relacionada às funções metabólicas das células em determinados tecidos, para as quais não seria necessário um alto número de sítios de DNAr ativos (Andersen et al., 2005; Preuss e Pikaard, 2007). De fato, na maioria das espécies de plantas foram encontrados apenas dois ou quatro sítios de DNAr (Roa & Guerra, 2012), sugerindo que os sítios adicionais podem não ser necessários. É possível que o número total de genes para RNAr e não apenas o número de sítios, também seja determinantes para indicar se há de fato excesso de sítios ou não. Em geral, o tamanho do sítio é proporcional ao número de cópias de DNAr e tem sido observado que sítios com maior número de cópias são preferencialmente ativados (Zurita et al., 1999) e nas espécies de *Nothoscordum* com múltiplos sítios, alguns deles foram bem pequenos (Souza et al., 2010; Souza, 2012), mas não foi possível avaliar se esses sítios

foram menos frequentemente ativos. Além disso, convém destacar que algumas espécies de plantas com sítios múltiplos podem apresentar todos os sítios ativos e, frequentemente, simultaneamente impregnados com prata (ver por exemplo, Brasileiro-Vidal et al., 2003; Vasconcelos et al., 2010).

2.4.4 Relação entre a posição dos sítios de DNAr e sua ativação

Nas espécies de *Nothoscordum* com sítios restritos aos braços curtos dos acrocêntricos todos foram ativos, enquanto que naquelas com sítios nos braços longos e curtos dos acrocêntricos e/ou proximais e terminais em um ou ambos os braços nos metacêntricos, o número de RONS foi menor que o número de sítios de DNAr.

Em *N. ostenii*, com sítios proximais e terminais em um mesmo cromossomo metacêntrico, unicamente sítios terminais se mostraram ativos, sugerindo a ocorrência de sítios inativos na região proximal ou de dominância intracromossômica. Este tipo de dominância foi observado em *Hordeum vulgare*, onde após a fusão por translocação dos cromossomos 6 e 7, ambos com sítios de DNAr, houve dominância da RON 6 sobre a 7, mas não entre RONS idênticas dos isocromossomos (Schubert & Kunzel, 1990). Em *N. izaguirrae*, com sítios terminais em ambos os braços de dois pares cromossômicos e um terceiro par com apenas um sítio, 60% das células apresentaram um cromossomo com ambos os sítios marcados, sugerindo não haver restrição à ativação das duas RONS em um cromossomo. A ocorrência de mais de um sítio de DNAr em um mesmo cromossomo é conhecida em várias espécies de plantas (Roa & Guerra, 2012), entretanto, a expressão desses sítios é pouco conhecida e nenhum caso de dominância intracromossômica em populações naturais foi encontrado na literatura. Portanto, é mais provável que a falta de RONS proximais em *N. ostenii* seja devida à inativação desses sítios que a dominância intracromossômica. Por outro lado, no caso de *N. gaudichaudianum* $2n = 8$ e $2n = 16$, o número máximo de RONS foi igual para os dois acessos, indicando que, nesse caso, a poliploidia não foi acompanhada por aumento no número de RONS, como ocorre no tetraploide de *N. pulchellum*. Em geral, poliploides recém surgidos conservam o número de sítios de DNAr esperados a partir dos diploides parentais, enquanto que aqueles mais antigos tendem a reduzir esse número (Kovarik et al., 2008; Roa & Guerra, 2012). O citótipo tetraploide de *N. pulchellum* surgiu espontaneamente cerca de seis anos atrás dentro de uma população diploide no jardim de nosso departamento, enquanto o tetraploide de *N. gaudichaudianum* é de origem desconhecida e tem alterações no número e posição dos sítios

de DNAr esperado em relação ao citótipo diploide, sugerindo ser um aloploiploide ou um autopoliploide cariotipicamente reformado.

Nas angiospermas em geral, os sítios de DNAr localizam-se preferencialmente nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos (Roa & Guerra, 2012), desta forma também pode ser esperado que sítios nestes cromossomos sejam mais frequentemente ativados que sítios nos metacêntricos. Em ambas as espécies que apresentaram vários sítios de DNAr em cromossomos metacêntricos e acrocêntricos, os sítios nos cromossomos acrocêntricos foram preferencialmente ativos, mas raramente foi observado mais de uma RON por cromossomo tanto para acrocêntricos como para metacêntricos. No caso de *N. marchesii*, os sítios nos braços curtos dos acrocêntricos foram preferencialmente ativados em relação a sítios terminais no mesmo cromossomo e a sítios nos metacêntricos, entretanto, em *N. felipponei* foram os sítios terminais os preferencialmente ativados. Em ambos os casos a dominância intracromossômica entre sítios nos acrocêntricos poderia estar atuando, como observado entre as RONS dos cromossomos 6 e 7 em *Hordeum vulgare*, quando estes se fusionam em um mesmo cromossomo (Schubert & Kunzel, 1990). Assim, a ativação preferencial em cromossomos acrocêntricos não está restrita aos braços curtos, mas sim a quaisquer sítios nestes cromossomos. No entanto, a preferência por sítios terminais em *N. felipponei* pode ser uma exceção, uma vez que os sítios no braços curtos dos acrocêntricos desta espécie são bem pequenos, quase ao limite da percepção (Souza et al., 2010), portanto teriam poucos *repeats* de DNAr em relação aos sítios nos terminais dos braços longos nesses cromossomos, levando à ativação destes últimos.

2.5 Referências Bibliográficas

- Andersen, J.S, Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., Man, M., 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77-83.
- Baeza, C., Schrader, O., Budahn, H., 2007. Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstroemeria* L. species (Chile) using FISH of tandemly repeated DNA sequences and RAPD analysis. *Pl Syst Evol* 269, 1–14.
- Brasileiro-Vidal, A.C., Cuadrado, A., Brammer, S.P., Zanatta, A.C.A., Prestes, A.M., Moraes-Fernandes, M.I.B., Guerra, M. 2003. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using in situ hybridization with different DNA sequences. *Genet Molec Biol* 26, 505-510.
- Cabrero, J., Camacho, J.P.M., 2008. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chrom Res* 16, 595-607.
- Caperta, A.D., Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C.S., Preuss, S. 2007. Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizer in *Secale cereale*. *Protoplasma*, DOI 10.1007/s00709-007-0277-4.
- Carvalho, A., Polanco, C., Lima-Brito, J., Guedes-Pintos, H., 2010. Differential rRNA8, genes expression in hexaploid wheat related to NOR methylation. *Plant Mol Biol Rep* 28, 403-412.
- Chen, Z.J., Pikaard, C.S., 1997. Transcriptional analysis of nucleolar dominance in polyploid plants: Biased expression/silencing of progenitor rRNA genes is developmentally regulated in *Brassica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3442-3447.
- Crosa, O., 1972. Estudios de cariólogía en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín Fac Agron Uruguay* 122, 3-8.
- Daskal, Y., Smetana, K., Bisch, H., 1980. Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver staining proteins C23 and B23 are in the fibrillar component. *Exp Cell Res* 127, 287-291.
- Dobigny, G., Ozouf-Costaz, C., Bonillo, C., Volobouev, V., 2002. “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogen Genom Res* 98, 75-77.
- Garrido, M.A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejon, C., Ruz Rejon, M., Parker, J.S., 1994. rDNA site number polymorphism and NOR inactivation in natural populations of *Allium schoenoprasum*. *Genetica* 94, 67-71.
- Guerra, M., Nogueira, M.T.M., 1990. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (Asteraceae: *Senecioneae*) occurring in Brazil. *Plant Syst Evol* 170, 229-236.
- Guerra, M., 1991. Cis-acting regulation of NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Genetica* 83, 235-241.

- Guerra, M., 2000. Patterns of heterochromatin distribution in plants chromosomes. *Genet Molec Biol* 23, 1029-1041.
- Guerra, M., Felix, L.P., 2000. O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfases na heterocromatina e nos sítios de DNAr. *Bol Soc Argent Bot* 35, 283-289.
- Grummt, I., Pikaard, C.S., 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Molec Cell Biol* 4, 641-649.
- Hamperl, S., Wittner, M., Babl, V., Perez-Fernandez, J., Tshochner, H., Griesenbeck, J., 2013. Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Bioch et Bioph Acta* 1829, 405-417.
- Han, F., Lamb, J.C., Birchler, J. A., 2006. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize. *PNAS* 103, 3238–3243.
- Hizume, M., Ishida, F., Kondo, K., 1992. Differential staining and in situ hybridization of nucleolar organizers and centromeres in *Cycas revoluta* chromosomes. *Jap Jour Genet* 67, 1-6.
- Hizume, M., Sato, S., Tanaka, A., 1980. A highly reproducible method for nucleolus organizer regions staining in plants. *Stain Tech* 55, 87-90.
- Jiménez, R., Burgos, M., Diaz de la Guardia, R., 1988. A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 60, 125–127.
- Jordan, E.G., Martini, G., Bennett, M.D., Flavell, R.B., 1982. Nucleolar fusion in wheat. *J. Cell Sci* 56, 485-495.
- Kovarik, A., Dadejova, M., Lim, Y.K., Chase, M.W., Clarkson, J. J., Knapp S., Leitch A.R., 2008. Evolution of rDNA in *Nicotiana* Allopolyploids: A Potential Link between rDNA Homogenization and Epigenetics. *Ann Bot* 101, 815-823.
- Ksiazczyk, T., Kovarik, A., Eber, F., Huteau, V., Khaitova, L., Tesarikova, Z., Coriton, O., Chèvre, 2011. Immediate unidirectional epigenetic reprogramming of NORs occurs independently of rDNA rearrangements in synthetic and natural forms of a polyploidy species *Brassica napus*. *Chromosoma* 120, 557-571.
- Lamm, R., 1981. Giemsa C-banding and silver staining in cytological studies in *Pisum*. *Hereditas* 94, 45-52.
- Lawrence, R., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, J., Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C.S., 2004 A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Molec Cell* 13, 599-609.
- Lischwe, M.A., Smetana, K., Olson, M.O.J., Busch, H., 1979, Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Lif Scien* 25, 701-708.
- McKeown, P.C., Shaw, P.J., 2009 Chromatin: linking structure and function in the

- nucleolus. *Chromosoma* 118, 11-23.
- Moscone, E.A., Loidl, J., Eherendorfer, F., Hunziker, A.T., 1995. Analysis of active nucleolus organizer regions in *Caspicum* (Solanaceae) by silver staining. *Amer Jour Bot* 82, 276-287.
- Ochs, R., Lischwe, M., O'Leary, P., Busch, H., 1983. Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. *Exp Cell Res* 146, 139-149.
- Pathak, S., Hsu, T.C., 1979 Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase. *Chromosoma* 70: 195-203.
- Pedrosa, A., Guerra, M., Soares-Filho, S. 1997 An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Cytobios* 92, 43-51;
- Preuss, S., Pikaard, C.S., 2007. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Bioch Bioph Acta* 1769, 383-392.
- Roa, F., Guerra, M., 2006. Citogenética e Reprodução de um Tetraplóide Espontâneo de *Nothoscordum pulchellum* Kunth (Alliaceae). Congresso Nacional de Genética, Brasil.
- Roa, F., Guerra, M., 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *Evolutionary Biology* 12, 225.
- Rufas, J.S., Gimenez-Abian, J.A., Suja, J.A., Garcia de la Vega, C., 1987. Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained cores. *Genome* 29, 87-121.
- Sato, S., Matsumoto, E., Kuroki, Y., 1981 Satellite association of the nucleolar chromosome in a plant. *Protoplasma* 108, 139-147.
- Sato, S., 1988 Color differential staining of NOR-associated heterochromatic segments using acridine orange. *Stain tech* 63, 235-240.
- Schubert, I., Kunzel, G., 1990. Position-dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99, 352-359.
- Schweizer, D., Ambros, P., 1979. Analysis of nucleolar organizer regions (NOR) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus cocineus* by silver staining and Giemsa C-banding. *Pl. Syst Evol* 132, 27-51.
- Shan, F., Yan, G., Plummer J.A., 2003. Phylogenetic and Cyto-evolutionary analysis of the genus *Boronia* (Rutaceae). *Theor. Appl. Genet.* 46, 507-513.
- Shaw, P., Brown, J., 2012 Nucleoli: composition, function an dynamics. *Plant Physiol* 158, 44-51.
- Souza, L.G.R., Crosa, O., Guerra, M. 2010. Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). *Plant Syst Evol* 287, 119-127.

- Souza, L.G.R., Crosa, O., Speranza, P., Guerra, M. 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Ann Bot* 109, 987-999.
- Souza, L.G.R., 2012. Filogenia molecular, citotaxonomia e evolução cariotípica da subfamília Gillisioideae. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE.
- Stack, S., Herickhoff, L., Sherman, J., Anderson, L., 1991. Staining plant cells with silver. I. The salt-nylon technique 1, 69-78.
- Thiry, M., Scheer, U., Goessens, G., 1991 Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and *in situ* hybridization at the electron microscopic level. *Elect Microsc* 4, 85-110.
- Tucker, S., Vitins, A., Pikaard, C.S., 2010 Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Op Cell Biol* 22, 351-356.
- Vasconcelos, S., Araújo de Souza, A., Gusmão, C.L.S., Milani, M., Benko-Iseppon, A.M., Brasileiro-Vidal, A.C., 2010. Heterocromatin and DNAr 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron* 41, 746-753.
- Vieira, R., Quiroz, A., Morais, L., Barão, A., Mello-Sampayo, T., Viegas, W., 1990. Genetic control of 1R nucleolus organizaer region expression in the presence of wheat genomes. *Genome* 33, 713-718.
- Wanzenbock, E.M., Schofer, C., Schweizer, D., Bachmair, A., 1997. Ribosomal transcription unit integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Jour* 11, 1007-1016.
- Zurita, F., Jiménez, R., Díaz de la Guardia, R., Burgos, M., 1991 The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and *in-situ* hybridization study. *Chrom Res* 7, 563-570.

3 Referências

- Azzam, R., 2004. Phosphorylation by cyclin B–Cdk underlies release of mitotic exit activator Cdc14 from the nucleolus. *Science* 305, 516–519.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K.L., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M., Lamond, A.I., 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 12, 1-11.
- Andersen, J.S, Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., Mann, M., 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433, 77-83.
- Barros e Silva, A.E., Guerra, M., 2010. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech Histochem Journal* 85,115–125.
- Boivert, F.M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A.I., 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature* 8, 574-585.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., Nigg, E.A., 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56,379-390.
- Cabral, J.S., Felix, L.P., Guerra, M., 2006 Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet Molec Biol* 29, 659-664.
- Cabrero, J., Camacho, J.P.M., 2008 Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: Abundance of silent and cryptic loci. *Chrom Res* 16, 595-607.
- Caperta, A.D., Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C.S., Preuss, S., 2007 Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizer in *Secale cereale*. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-007-0277-4
- Carvalho, A., Polanco, C., Lima-Brito, J., Guedes-Pintos, H., 2010. Differential rRNA genes expression in hexaploid wheat related to NOR methylation. *Plant Mol Biol Rep* 28, 403-412.
- Crosa, O., 1972 Estudios de cariólogía en el género *Nothoscordum* (Liliaceae). *Boletín de la Facultad de Agronomía de Uruguay* 122,3-8.
- Dobigny, G., Ozouf-Costaz, C., Bonillo, C., Volobouev, V., 2002 “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytog Genom Research* 98, 75-77.
- Garrido, M.A., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejon, C., Ruiz Rejon, M., Parker, J.S., 1994 DNA site number polymorphism and NOR inactivation in natural populations of *Allium schoenoprasum*. *Genetica* 94, 67-71.
- Gong, L., Yeh, E.T., 2006. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J. Biol. Chem.* 281, 15869–15877.
- Guerra, M., 1998. Mitotic and meiotic analysis of a pericentric inversion associated with a tandem duplication in *Eleutherine bulbosa*. *Chromosoma* 97, 80-87.

- Guerra, M., 1991 Cis-acting regulation of NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Genetica* 83, 235-241.
- Guerra, M., 2000 Patterns of heterochromatin distribution in plants chromosomes. *Gen Molec Biol* 23, 1029-1041.
- Guerra, M., Nogueira, M.T.M., 1990 The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (Asteraceae: *Senecioneae*) occurring in Brazil. *Plant Syst Evol* 170, 229-236.
- Guerra, M., Felix, L.P., 2000. O cariótipo de *Nothoscordum pulchellum* (Alliaceae) com ênfases na heterocromatina e nos sítios de DNAr. *Bol Soc Argent Bot* 35, 283-289.
- Gautier, T., Robert-Nicoud, M., Guilly, M.N., Hernandez-Verdun, D., 1992. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 102, 729-737.
- Grummt, I., Pikaard, C.S., 2003. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Molec Cell Biol* 4, 641-649.
- Hamperl, S., Wittner, M., Babl, V., Perez-Fernandez, J., Tshochner, H., Griesenbeck, J., 2013. Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Bioch et Bioph Acta* 1829, 405-417.
- Highett, M.I., Beven, A.F., Shaw, P.J., 1993. Localization of 5S genes and transcripts in *Pisum sativum* nuclei. *Jour Cell Sci* 105, 1151-1158.
- Hizume, M., Sato, S., Tanaka, A., 1980. A highly reproducible method for nucleolus organicer regions staining in plants. *Stain Technol.* 55, 87-90.
- Jordan, E.G., Martini, G., Bennett, M.D., Flavell, R.B., 1982. Nucleolar fusion in wheat. *J. Cell Sci* 56, 485-495.
- Ksjazczyk, T., Kovarik, A., Eber, F., Huteau, V., Khaitova, L., Tesarikova, Z., Coriton, O., Chèvre, 2011. Immediate unidirectional epigenetic reprogramming of NORs occurs independently of rDNA rearrangements in synthetic and natural forms of a polyploidy species *Brassica napus*. *Chromosoma* 120, 557-571.
- Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., Andersen, J.S., 2007. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Current Biology* 17, 749-760.
- Lawrence, R., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, J., Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C.S., 2004. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Molec Cell* 13, 599-609.
- Leung, A.K. L., Lamond, A.I., 2003. The Dynamics of the Nucleolus. *Critical Reviews* 13, 49-64.
- Lischwe, M.A., Smetana, K., Olson, M.O.J., Busch, H., 1979. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Lifes Sciences* 25, 701-708.
- McKeown, P.C., Shaw, P.J., 2009 Chromatin: linking structure and function in the nucleolus. *Chromosoma* 118, 11-23.

- Moscone, E.A., 1999. Análisis cariotípico en *Caspicum baccatum* var. *umbilicatum* (Solanaceae) mediante bandeos Ag-NORs y de fluorescencia. *Kurtiziana* 27, 225-232.
- Olsen, M., 2004. Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci. STKE* (online) (doi: 10.1126/stke.2242004pe10).
- Pathak, S., Hsu, T.C., 1979. Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase. *Chromosoma* 70, 195-203.
- Pedrosa, A., Guerra, M., Soares-Filho, S., 1997. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Cytobios* 92, 43-51
- Pikaard, C.S., 1999. Nucleolar dominance and silencing of transcription. *Trends in Plant Science* 12, 478-483.
- Pontvianne, F., Blevins, T., Chandrasekhara, C., Mozgová, I., Hassel, C., Pontes, O., Tucker, S., Mokros, P., Muchová, V., Fajkus, J., Pikaard, C.S., 2013. Subnuclear partitioning of rRNA genes between the nucleolus and nucleoplasm reflects alternative epiallelic states. *Genes & Development* 27, 1545-1550.
- Preuss, S., Pikaard, C.S., 2007. rRNA gene silencing and nucleolar dominance: insights into a chromosome-scale epigenetic on/off switch. *Biochim Biophys Acta* 1769, 383-392.
- Reeder, R.H., Roan, J.G., 1984. The mechanism of nucleolar dominance in xenopus hybrids. *Cell* 38, 39-44.
- Roa, F., Guerra, M., 2012. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *Evolutionary Biology* 12, 225.
- Rogers, S.O., Bendich, A.J., 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology* 9, 509-520.
- Sanchez, A., Jimenez, R., Burgos, M., Stitou, S., Zurita, F., Diaz de la Guardia, R., 1995. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity* 75, 10-16.
- Sato, S., Matsumoto, E., Kuroki, Y., 1981. Satellite association of the nucleolar chromosome in a plant. *Protoplasma* 108, 139-147.
- Sato, S., 1988. Color differential staining of NOR-associated heterochromatic segments using acridine orange. *Stain Technology* 63, 235-240.
- Scheer, U., Hock, R., 1999. Structure and function of the nucleolus. *Cell Biology* 11, 385-390.
- Schubert, I., Kunzel, G., 1990. Position-dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99, 352-359.
- Schweizer, D., Ambros, P., 1979. Analysis of nucleolar organizer regions (NOR) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus cocineus* by silver staining and Giemsa C-banding. *Pl. Syst Evol* 132, 27-51.

- Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., Hernandez-Verdun, D., 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129, 13–31.
- Souza, L.G.R., Crosa, O., Speranza, P., Guerra, M., 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* 109, 987-999.
- Souza, L.G.R., 2012. Filogenia molecular, citotaxonomia e evolução cariotípica da subfamília Gillisioideae. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE.
- Shaw, P., Brown, J., 2012. Nucleoli: Composition, Function and Dynamics. *Plant Physiology* 158, 44-51.
- Thiry, M., Scheer, U., Goessens, G., 1991. Localization of nucleolar chromatin by immunocytochemistry and *in situ* hybridization at the electron microscopic level. *Electron Microscopic* 4, 85-110.
- Tucker, S., Vitins, A., Pikaard, C.S., 2010. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 351-356.
- Vasconcelos, S., Araújo de Souza, A., Gusmão, C.L.S., Milani, M., Benko-Iseppon, A.M., Brasileiro-Vidal, A.C., 2010. Heterocromatin and DNAr 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron* 41, 746-753.
- Vieira, R., Quiroz, A., Morais, L., Barão, A., Mello-Sampayo, T., Viegas, W., 1990. Genetic control of 1R nucleolus organization region expression in the presence of wheat genomes. *Genome* 33, 713-718.
- Viegas, W., Neves, N., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecílio, L., 2002. Nucleolar dominance: 'David and Goliath' chromatin imprinting process. *Curr. Genomics* 3, 563-576.
- Visintin, R., Amon, A., 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 752.
- Volkov, R.A., Komarova, N.Y., Hemleben, V., 2007. Ribosomal DNA in plants hybrids: inheritance, rearrangement, expression. *Syst. and Biodiv.* 5, 261-276.
- Zurita, F., Jiménez, R., Díaz de la Guardia, R., Burgos, M., 1991. The relative rDNA content of a NOR determines its level of expression and its probability of becoming active. A sequential silver staining and *in-situ* hybridization study. *Chromosome Research* 7, 563-570.

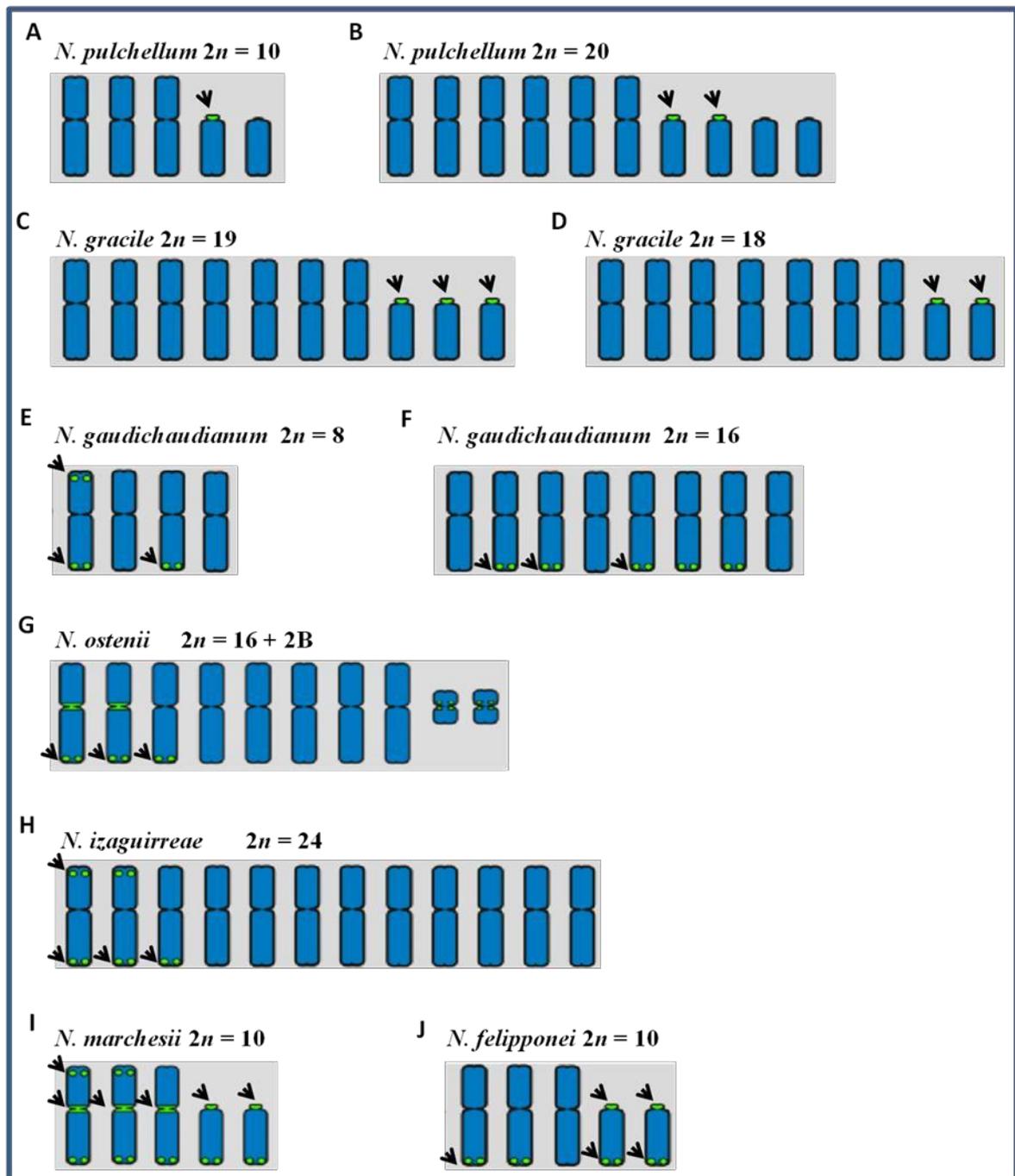


Fig. 1. Idiogramas mostrando a distribuição dos sítios de DNAr (verde) nas espécies analisadas de *Nothoscordum*. As cabeças de setas indicam a quantidade dos sítios que se mostraram ativos para cada espécie embora não sejam exactamente nesses cromossomos, sendo possível que aconteçam em outros pares cromossômicos e em alguns casos unicamente um dos cromossomos do par apresenta o sítio ativo. Todos os demais idiogramas foram reproduzidos de Souza (2012), com pequenas modificações.

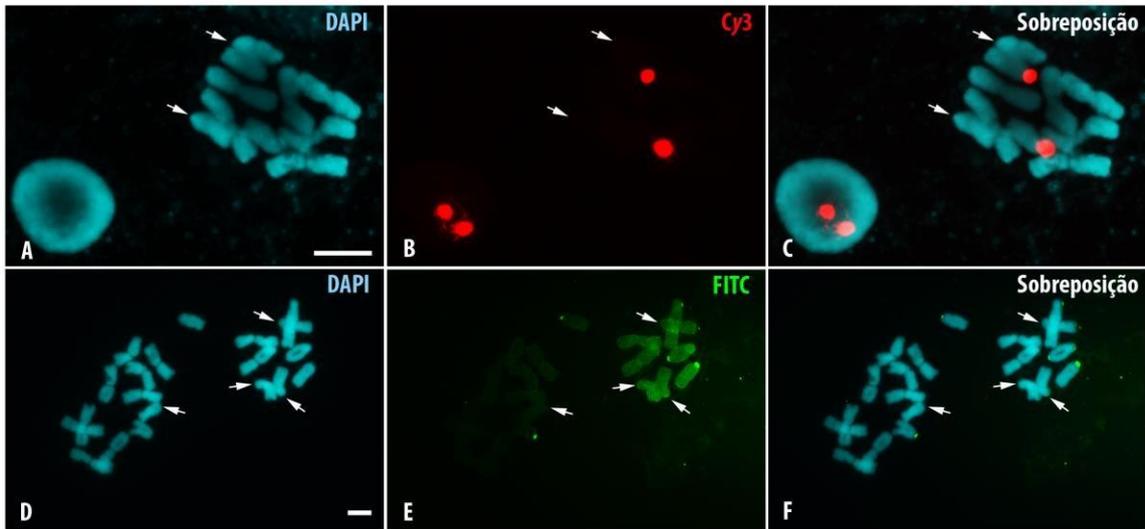


Fig. 2. Localização dos sítios de DNAr em *N. pulchellum* $2n = 10$ (A-C) e $2n = 20$ (D-F). DAPI (A, D), DNAr em vermelho Cy3, super-exposta no momento da captura da imagem (B) e em verde FITC (E) e sobreposição (C, F). Observe-se os sítios de DNAr associados ao nucléolo em C. Setas indicam cromossomos acrocêntricos sem sítios de DNAr. Barra corresponde a 10 μm .

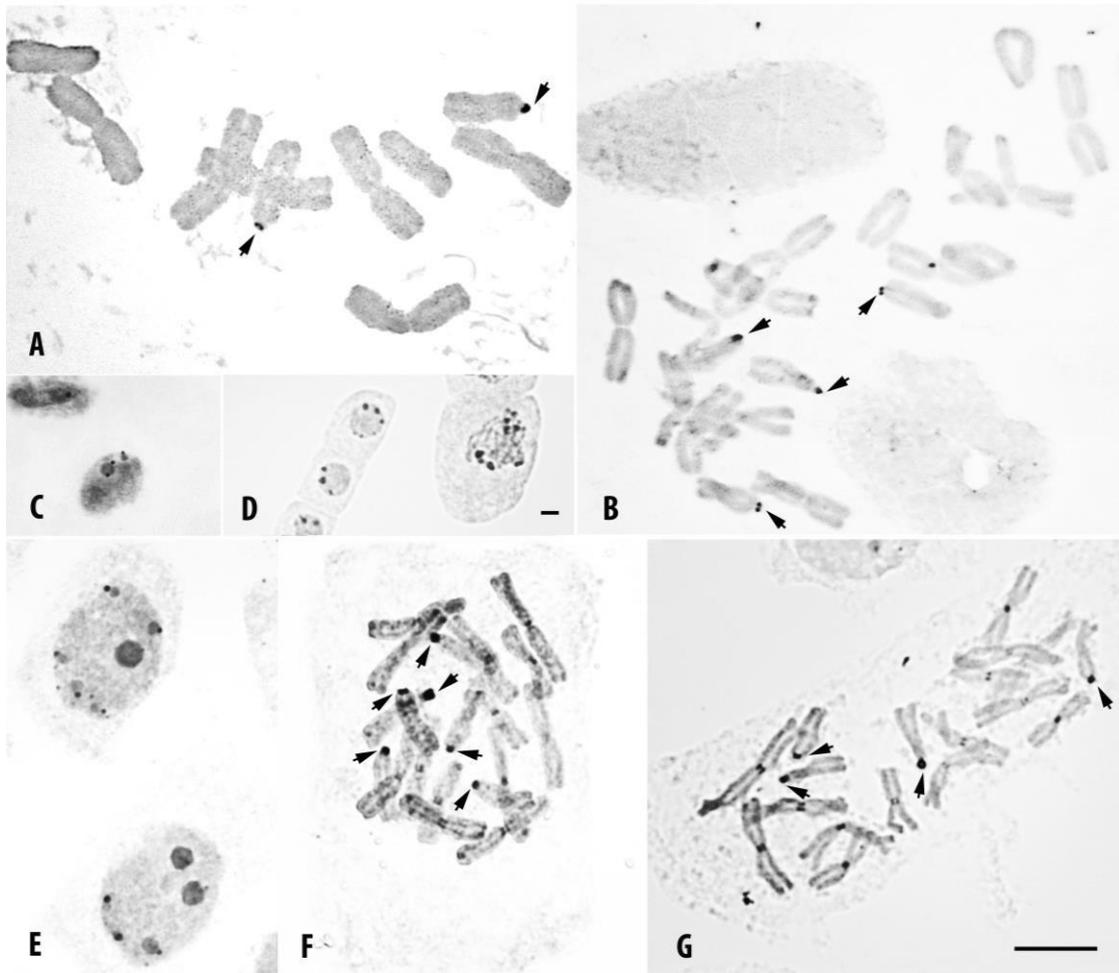


Fig. 3. RONS e nucléolos em algumas espécies de *Nothoscordum*. Coloração direta com prata (A, B) e coloração indireta (C-G). Metáfases de *N. pulchellum* $2n = 10$ (A), $2n = 20$ (B), *N. gracile* $2n = 19$ (F) e $2n = 18$ (G). Nucléolos de *N. pulchellum* diploide (C), *N. felipponei* (D) e *N. marchesii* (E). Setas indicam as RONS. Observe em F e G as regiões proximais nos cromossomos metacêntricos mais coradas que o resto do cromossomo e em A e B as regiões teloméricas. Observe em C e E pequenas estruturas globosas associadas à periferia dos nucléolos. Barra em D realtivas a C e D e barras em G relativas a todas as demais imagens, correspondem 10 μm .

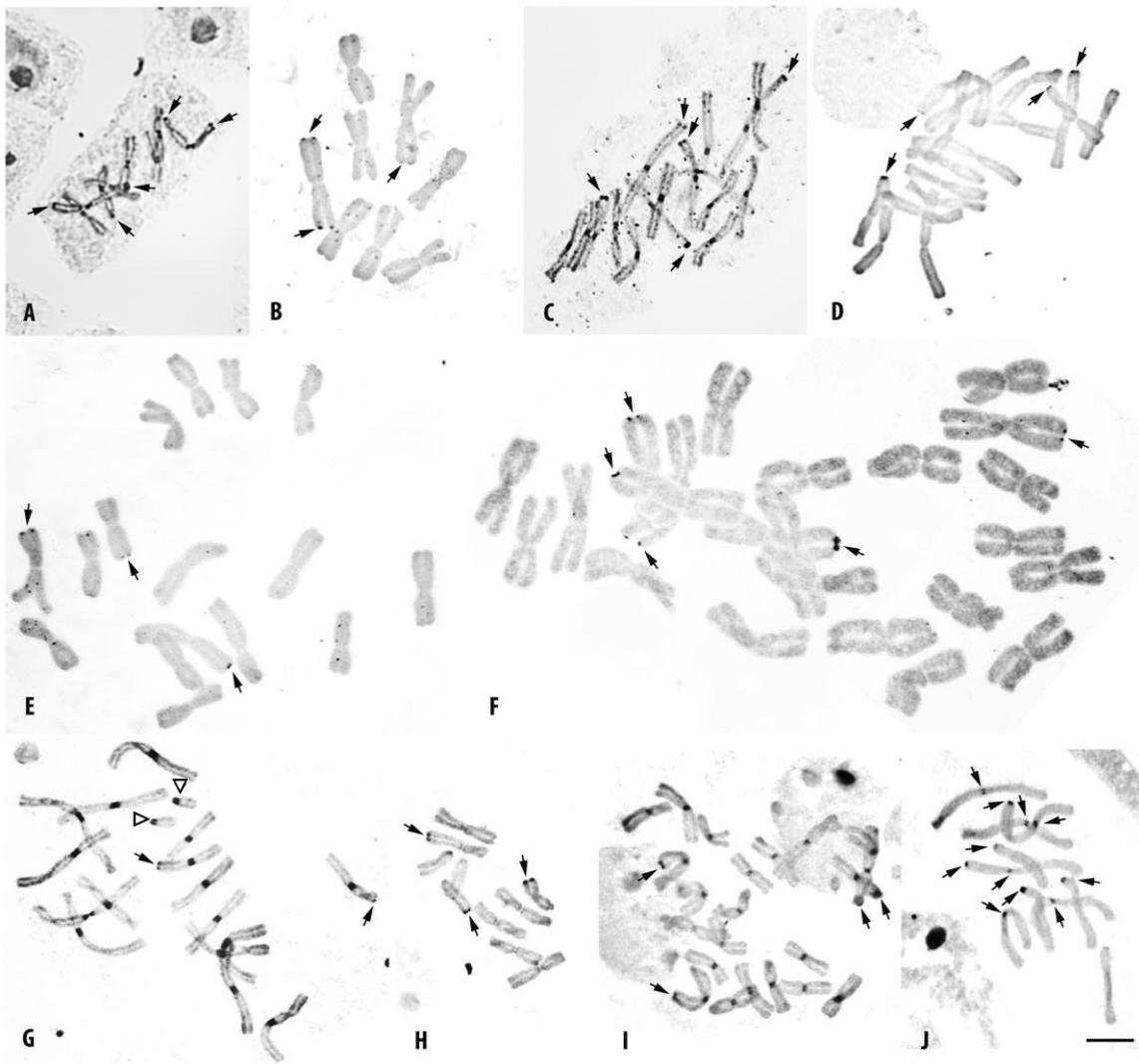


Fig. 4. RONS em metáfases de espécies de *Nothoscordum* coradas com prata, por coloração direta (B, D, E, F) ou coloração indireta (A, C, G-J). *N. gaudichaudianum* $2n = 8$ (A, B) e $2n = 16$ (C, D), *N. ostentii* (E, G), *N. izaguirrae* (F, I), *N. felipponei* (H) e *N. marchesii* (J). Setas indicam RONS e setas vazadas em G indicam cromossomos Bs. Observe em A, C, G, I (coloração indireta) as regiões proximais tão coradas quanto as RONS e em B, D, E, F (coloração direta) algumas regiões teloméricas aparecem mais coradas enquanto que as regiões proximais não são marcadas. Barra corresponde a 10 μm .

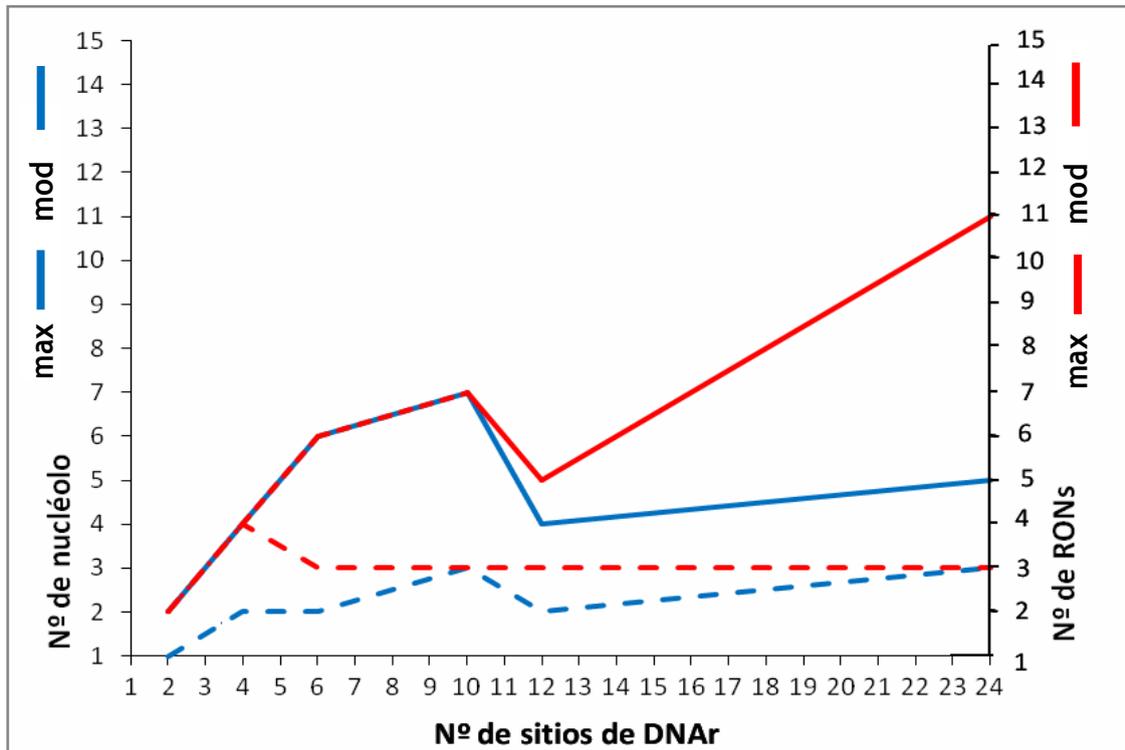


Fig. 5. Variação no número máximo e número modal de nucléolos e de RONs por célula em relação ao número de sítios de DNAr nas espécies de *Nothoscordum* (max = máximo, mod = modal), o número de sítios de DNAr foi tomada de Souza (2012).

Tabela 1

Espécies de *Nothoscordum* analisadas com seus respectivos número de acesso, procedência e fórmula cariotípica.

Espécie	Procedência	Nº de acesso	2n	Fórmula cariotípica
<i>Nothoscordum pulchellum</i> Kunth	Serras das Russas, Pernambuco, Brasil	AML1704	10	6M+4 ^a
	Recife, Pernambuco, Brasil	AML1887	20	12M+8 ^a
<i>N. gracile</i> (Ailton) Stearn	Cambara do sul, Rio Grande do Sul, Brasil	14209	19	13M+6 ^a
<i>N. gracile</i> (Ailton) Stearn	Maldonado, Uruguai	1711	18	14M+4 ^a
<i>N. gaudichaudianum</i> Kunth	Ruta 3 km 175, Uruguai	1377	8	8M
	Montevidéu, Uruguai	1335	16	16M
<i>N. izaguirrae</i> Crosa	Rio Santa Lucia, Lavalleja, Uruguai	1160	24	24M
<i>N. ostenii</i> Beauverd	Montevidéu, Uruguai	1450-4	16	16M+B _s
<i>N. felipponei</i> Beauverd	Minas, Lavalleja, Uruguai	1173	10	6M+4A
<i>N. marchesii</i> Crosa	Sierra de San Miguel, Rocha, Uruguai	1153	10	6M+4A

Tabela 2

Espécies de *Nothoscordum* analisadas com respectivas fórmulas cariotípicas (FC), número e posição de sítios de DNAr, e número modal (Mod) e máximo (Max) de RONS por célula, posição das RONS e número de nucléolos por núcleo. A, cromossomo acrocêntrico; M, cromossomo metacêntrico; p, sítio proximal no braço curto no acrocêntrico ou proximal no metacêntrico; t, sítio terminal no braço longo no acrocêntrico ou metacêntrico.

Espécie	FC	Posição de sítios de DNAr					Número máximo de RONS		Posição das RONS				N° de nucléolos	
		Ap	At	Mp	Mt	Total	Mod	Max	Ap	At	Mp	Mt	Mod	Máx
<i>N. pulchellum</i>	6M+4A	2	-	-	-	2	2	2	4	-	-	-	1	2
<i>N. pulchellum</i>	12M+8A	4	-	-	-	4	4	4	8	-	-	-	2	4
<i>N. gracile</i>	13M+6A	6	-	-	-	6	6	6	6	-	-	-	1	6
<i>N. gracile</i>	14M+4A	4	-	-	-	4	4	4	4	-	-	-	1	4
<i>N. gaudichaudianum</i>	8M	-	-	-	6	6	3	5	-	-	-	5	2	5
<i>N. gaudichaudianum</i>	16M	-	-	-	10	10	2	5	-	-	-	5	2	6
<i>N. izaguirrae</i>	24M	-	-	-	10	10	7	7	-	-	-	7	2	7
<i>N. ostenii</i>	16M	-	-	4	6	10*	3	6	-	-	-	6	3	6
<i>N. felipponei</i>	6M+4A	4	4		4	12	3	5	2	3	-	2	2	4
<i>N. marchesii</i>	6M+4A	4	4	6	10	24	3	11	4		6	2	2	5

* O total de sítios nessa espécie não incluiu os sítios dos cromossomos Bs.

Tabela 3

Variação no número de nucléolos por célula nas espécies analisadas. Número de sítios proximais (p) e terminais (t) é indicado para cada espécie.

Espécie	Nº de sítios de DNAr	Total de células	Número de nucléolos por núcleo							
			1	2	3	4	5	6	7	
<i>N. pulchellum</i> 2n =10	2p	7222	5830	1392						
<i>N. pulchellum</i> 2n =20	4p	613	191	265	130	27				
<i>N. gracile</i> 2n=19	6p	1301	574	509	181	20	7	10		
<i>N. gracile</i> 2n=18	4p	396	206	158	21	11				
<i>N. gaudichaudianum</i> 2n=8	6t	801	171	320	247	57	6			
<i>N. gaudichaudianum</i> 2n=16	10t	313	28	147	107	18	7	6		
<i>N. izaguirrae</i> 2n=24	10t	138	16	38	33	31	14	3	3	
<i>N. ostenii</i> 2n=16	6t+4p	130	21	29	33	21	15	11		
<i>N. felipponei</i> 2n =10	8t+4p	106	21	47	36	2				
<i>N. marchesii</i> 2n =10	14 t +10p	420	47	141	140	76	16			

Tabela 4

Variação no número RONS por célula, em espécies com sítios de DNAr unicamente nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos.

Espécie	FC	Total de células	Número de RONS por célula								
			1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>N. pulchellum</i>	6M+4A	81		81							
<i>N. pulchellum</i>	12M+8A	67				67					
<i>N. gracile</i>	14M+4A	18		2	1	15					
<i>N. gracile</i>	13M+6A	33	1	4		11	1	16			

Tabela 5

Variação nos padrões de marcação das RONS em espécies com sítios de DNAr unicamente nos metacêntricos. Cromossomos com um único sítio terminal (t) ou com sítios em ambos os terminais (tt). Total de RONS por célula é apresentado entre parênteses.

Espécie	Nº de sítios de DNAr	Total de células	Padrão de marcação de RONS											
			1t (1)	2t (2)	1tt (2)	3t (3)	1tt+1t (3)	4t (4)	2tt (4)	1tt+2t (4)	5t (5)	2tt+1t (5)	6t (6)	5t+1tt (7)
<i>N. gaudichaudianum</i> 2x	2t+2tt	62	4	2	3		23	1	17	8		4		
<i>N. gaudichaudianum</i> 4x	10t	65		39		7		14			2			
<i>N. izaguirrae</i> 6x	4tt+2t	10											4	6
<i>N. ostenii</i> 4x	6t+4p	49		11		23		10			4		1	

Tabela 6

Variação nos padrões de marcação das RONS em *N. felipponei*. Total de RONS por padrão de marcação é apresentado entre parênteses. Proporção de RONS por sítio de DNAr proximais e terminais.

Sítios de DNAr	Total de células	Padrão de marcação de RONS											% de RON por posição		
		2At (2)	2Ap (2)	1At+1Mt (2)	2At+1Ap (3)	2At+1Mt (3)	2Ap+1Mt (3)	1At+1Ap+1Mt (3)	2At+2Mt (4)	3At+1Mt (4)	2Apt+1Ap (5)	2Apt+1Mt (5)	Ap	At	Mt
4Mt+4At+4Ap	57	7	3	7	3	20	1	9	3	2	2	1	12,2	41,2	20,2

Tabela 7

Variação nos padrões de marcação das RONS em *N. marchesii*. Total de RONS por padrão de marcação é apresentado entre parênteses. Proporção de RONS por sítio de DNAr proximais e terminais.

Nº de sítios de DNAr	Total de células	Padrão de marcação de RONS										% de RON por posição			
		2Ap (2)	3Ap (3)	2Ap+1Mt (3)	2Ap+2Mp (4)	2Ap+1Mt+4Mp (7)	4Ap+1Mt+2Mp (7)	4Ap+1Mtp+3Mp (9)	4Ap+1Mt+4Mp (9)	3Ap+2Mtp+4Mp (11)	4Ap+4Mp (8)	Ap	At	Mp	Mt
<u>10Mt+6Mp +4At+4Ap</u>	58	20	16	12	2	1	1	1	2	2	1	62,0	0	10,9	3,4

MICRON

The International Research and Review Journal for Microscopy

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

XXX

- **Description p.1**
- **Audience p.1**
- **Impact Factor p.1**
- **Abstracting and Indexing p.2**
- **Editorial Board p.2**
- **Guide for Authors p.3**

ISSN: 0968-4328

DESCRIPTION

Micron is an interdisciplinary forum for all work that involves new applications of **microscopy** or where advanced microscopy plays a central role. The journal will publish on the design, methods, application, practice or theory of microscopy and **microanalysis**, including reports on optical, electron-beam, X-ray microtomography, and scanning-probe systems. It also aims at the regular publication of review papers, short communications, as well as thematic issues on contemporary developments in microscopy and microanalysis. The journal embraces original research in which microscopy has contributed significantly to knowledge in biology, life science, nanoscience and nanotechnology, materials science and engineering.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services. Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Scientists and engineers involved in the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis.

IMPACT FACTOR

2012: 1.876 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

AUTHOR INFORMATION PACK 5 Feb 2014 www.elsevier.com/locate/micron 2

ABSTRACTING AND INDEXING

Aqualine Abstracts

BIOMED

BIOSIS

Current Contents/Life Sciences

EMBASE

Elsevier BIOBASE

INSPEC

Research Alert

SCISEARCH

Science Citation Index

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors:

G. Cox, Electron Microscope Unit, F09, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia (Biological Sciences)

R.F. Egerton, Dept. of Physics, University of Alberta, 11322 - 89 Avenue, Edmonton, T6G 2J1, Canada (Physical Sciences)

F. Braet, Australian Centre for Microscopy & Microanalysis, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia (Biological Sciences)

Editorial Board:

U. Aebi, PhD, Basel, Switzerland

D. Bhella, Glasgow, UK

E.J. Boekema, Groningen, Netherlands

G. Botton, Hamilton, ON, Canada

N.D. Browning, Davis, CA, USA

J.L. Carrascosa, Madrid, Spain

P. Crozier, Tempe, AZ, USA

W. de Souza, Rio de Janeiro, Brazil

A. Gregorc, Ljubljana, Slovenia

J.R. Harris, Mainz, Germany