



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

# **Efeitos do *stress* térmico na transcrição e topologia nuclear de sequências repetitivas**

**Diana Raquel dos Santos Tomás**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biologia Funcional**

Orientador: Doutora Maria Manuela Antunes Gomes da Silva

Co-orientador: Doutora Maria Wanda Sarujine Viegas

**Júri:**

Presidente: Doutora Sara Barros Queiroz Amâncio, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Wanda Sarujine Viegas, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutor Jorge Alexandre Matos Pinto de Almeida, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Maria Manuela de Faria Veloso, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P;

Doutora Maria Manuela Antunes Gomes da Silva, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2010

## Agradecimentos

Este trabalho nunca teria sido possível sem vários intervenientes que durante um ano fizeram com que fosse possível hoje este fim. Neste fim que, depois de alguns sabores amargos, sabe a doce por ser mais uma meta alcançada, o meu **muito obrigada**...

Para começar à Prof.<sup>a</sup> Wanda Viegas, não só por me ter dado esta oportunidade de trabalhar num grupo fantástico, como por estar sempre pronta a dar a ajuda necessária, a comentar coisas engraçadas e a contribuir para o meu “*endurance*”.

A esse mesmo grupo fantástico de pessoas que ajudam no trabalho e no lazer, sem enunciar nomes para que ninguém fique esquecido, pois todos estiveram presentes à sua maneira.

À Luísa Carvalho, sem a qual metade do meu trabalho seria impossível. Por todo o seu tempo, paciência e dedicação muito obrigada.

À Heike Sprenger que tanto me ajudou em resultados obtidos como em muitas horas no computador e microscópio. *Danke se*.

À família, que naqueles dias estive lá para aturar, estive lá para fazer rir, estive lá para apoiar. Estive lá mesmo quando eu não consegui estar. Que acreditou sempre, mesmo quando eu não acreditava. Muito obrigada.

Aos amigos. Aqueles que me davam abraços quando me viam porque a semana foi longa e sabiam que era isso mesmo que eu precisava naquele momento, sem exigências ou amuos. Obrigada.

Ao Miguel Bento, aquele que sabe fazer rir mas também sabe ser sério, aquele que ajuda quando pode e quando não pode, aquele que se senta ao lado e diz “vamos arrumar ideias”. Muito obrigada.

À Manuela Silva à qual não sou capaz de agradecer tudo pois foram “milhentos” passos dados ao meu lado para eu não me perder durante este trilho. Desde me aceitar como orientanda a ser uma amiga. Muito obrigada pelo apoio incondicional, abraço, carinho e motivação que tanto bem me fizeram e tão importantes foram.

Ao Cláudio. Aquele que simplesmente foi o “ pilar” em tantos momentos. Muito obrigada, pelo abraço, pelo “vá força”, simplesmente obrigado por estares aqui.

## Resumo

Neste trabalho pretende-se avaliar a influência do *stress* de alta temperatura (SAT) nos padrões de organização da Cromatina de duas sequências repetitivas – DNA ribossomal 45S e subtelomérica pSc200 - e de nucléolos em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas de *Secale cereale*, utilizando hibridação *in situ* e imunocitoquímica, respectivamente. Foi ainda analisada a influência do SAT nos padrões de transcrição das referidas sequências através de PCR quantitativo em tempo real.

Núcleos dos dois órgãos analisados apresentam diferentes padrões de conformação, sendo os núcleos de ápices radiculares maiores, com sinais de FISH subteloméricos mais dispersos e a sonda ribossomal mais compactada. A alta temperatura provoca uma descondensação da cromatina nas sequências em núcleos de ápices radiculares, enquanto em núcleos de coleótilos se observou, para além do rDNA mais descompactado, um aumento da área nuclear sugerindo uma descondensação de todo o núcleo. Também a área nucleolar aumenta nos dois tipos de núcleos analisados quando sujeitos ao *stress*, indicando, tal como os resultados do PCR quantitativo em tempo real, um aumento na expressão do rDNA. Neste trabalho é demonstrado pela primeira vez, que a sequência, repetitiva subtelomérica pSc200 é transcrita, não sendo no entanto afectados os níveis de transcrição com o SAT.

Palavras-chave: *Secale cereale*, *stress* de alta temperatura, DNA ribossomal, subtelomérica pSc200, nucléolo

## Abstract

The aim of this work was to evaluate the influence of high temperature stress (HTS) in the chromatin organization of two repetitive sequences – 45S ribosomal DNA and subtelomeric pSc200 – and of nucleoli in interphase root tips and coleoptiles nuclei from *Secale cereale* seedlings using fluorescent in situ hybridization and immunocytochemistry, respectively. Furthermore we analyzed the influence of high temperature stress in the transcription patterns of the same sequences through quantitative real-time PCR.

Nuclei from both organs show different conformation patterns. Root tips nuclei have bigger dimensions, more dispersed subtelomeric FISH signals and more compact ribosomal probe.

We observe that high temperature stress causes chromatin decondensation in both sequences in root tips nuclei, while in coleoptile nuclei, beside the rDNA decondensation, we observe an increase in the nuclear area suggesting a global nuclear decompaction. The nucleolar area is also higher in both types of nuclei of stressed seedlings. This increase could be correlated with the increase in the ribosomal genes expression level induced by temperature stress, demonstrated through real-time PCR. The present work describes for the first time that the subtelomeric sequence pSc200 is transcribed, although its levels are not significantly altered with high temperature stress.

Keywords: *Secale cereale*, high temperature stress, ribosomal DNA, subtelomeric pSc200, nucleolus

## Extended Abstract

The effects of stress have been studied in plants morphology, physiology and gene expression. The aim of this work was to evaluate the high temperature stress (HTS) influence in chromatin conformation patterns of interphase nuclei from two distinct organs, and in the transcription level of repetitive coding and non coding sequences in rye (*Secale cereale*). Two repetitive sequences were chosen - ribosomal coding sequence 45S and subtelomeric non coding sequence pSc200 - both present in rye genome in high copy number, allowing a rigorous cytogenetic analysis. Chromatin organizing patterns were evaluated through fluorescent in situ hybridization (FISH) technique using probes to the referred sequences produced through polymerase chain reaction (PCR). On other hand, nucleoli were also evaluated using the immunodetection technique with an antibody that targets fibrillarin, a nucleolar protein. Nuclei from root tips and coleoptiles of rye seedlings without treatment (kept at 22°C) and subjected to a high temperature stress (2°C per hour gradual increase in temperature from 22°C until 40°C, followed by 4 hours at 40°C) were analyzed. Finally, sequence transcription patterns were estimated in seedling leaves with and without HTS through quantitative real time PCR.

We observed that nuclei from both organs of non treated seedlings analyzed shows different conformation patterns. Root tips nuclei have higher dimension, pSc200 FISH signals more dispersed and smaller ribosomal FISH signals comparatively to coleoptile nuclei. Additionally, in root tips nuclei it was possible to distinguish heterochromatic domains that co-localize mostly with subtelomeric knobs. Conversely, the frequency of coleoptile nuclei presenting heterochromatic domains is lower but, when observed, they are also co-localizing with the subtelomeric probe.

The results revealed that in root tips nuclei, HTS doesn't affect the nuclear area, but induces both ribosomal and subtelomeric sequences decondensation. This was quantified using in situ area measurements that confirmed the increased dimension of FISH signals, being however the in situ signal number constant. In coleoptile nuclei an increase in nuclear area was observed, revealing a global nucleus decompactation, accompanied by an increase in ribosomal in situ area and a more scattered subtelomeric FISH signals. The differences observed between root tips and coleoptiles nuclei from non-treated seedlings are no longer observed in comparison with coleoptile nuclei from treated seedlings.

The nucleolar analysis showed equally a significantly effect of HTS in area and number of nucleoli. In fact, temperature stress caused an increase in the number of cell with two nucleoli and of the nucleolar area, both in root tips and coleoptile nuclei. The increase in nucleolar area could be related to the greater ribosomal genes expression. In fact, the results obtained from quantitative real-time PCR showed approximately a two fold increase in the

transcription level of rRNA genes in seedlings HTS treated, in comparison with non treated seedlings. On the other hand, it was demonstrated for the first time that the subtelomeric sequence pSc200 is transcribed, however the transcription levels are not affected by HTS.

The results obtained allowed to conclude that different organs from plants in the same developmental stage have different nuclear topology patterns and that HTS affects chromatin organization, leading to an increase in the decondensation and in the transcription levels of rDNA repetitive coding sequences.

## Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Extended Abstract.....	v
Lista de quadros e figuras.....	3
Lista de abreviaturas.....	5
Preâmbulo .....	8
Revisão do estado da Arte.....	9
Organização e dinâmica da cromatina.....	9
Dinâmica de domínios heterocromáticos durante o desenvolvimento .....	10
Alterações epigenéticas mediadas por <i>stress</i> .....	12
Organização genómica de sequências repetitivas em <i>Secale cereale</i> .....	14
Sequências subteloméricas.....	15
DNA ribossomal .....	15
Material e Métodos.....	18
Material Vegetal.....	18
Análise Citogenética.....	19
Obtenção de preparações .....	19
Hibridação <i>in situ</i> fluorescente .....	19
Imunodeteccção <i>in situ</i> de Proteínas .....	21
Observação, captação e tratamento de imagem .....	22
Análise quantitativa.....	22
Avaliação de níveis de transcrição.....	23
Obtenção de cDNA .....	23
PCR quantitativo em tempo real (PCRq) .....	25
Quantificação relativa .....	25
Resultados.....	27

Efeitos do <i>stress</i> térmico nos padrões de conformação de cromatina em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de centeio.....	27
Avaliação quantitativa de distintos parâmetros da topologia nuclear.....	29
Efeitos do <i>stress</i> térmico na dinâmica nucleolar em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de centeio .....	33
Alteração dos níveis de transcrição das sequências repetitivas rDNA e pSc200 em plântulas de centeio sujeitas a <i>stress</i> térmico.....	37
Discussão .....	41
Referências bibliográficas .....	46
ANEXO I .....	50

## Lista de quadros e figuras

**Figura 1.** Representação esquemática do NOR (Adaptado de (Neves et al., 2005)).

**Figura 2.** Representações esquemáticas da organização do rDNA de centeio em interfase (A) e em cromossomas metafásicos (B).

**Figura 3.** Representação esquemática dos locais de restrição da enzima *Bfal*.

**Figura 4.** Representação esquemática de uma unidade de rDNA com os locais de ligação dos primers utilizados no PCRq.

**Figura 5.** Núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratadas (A a E) e sujeitas a *stress* térmico SAT (L a P) com marcação DAPI (A e L), sinal de rDNA (B e M), sinal de pSc200 (C e N) e sobreposições do DAPI com a sonda ribossomal (D e O) e com a sonda subtelomérica (E e P). Núcleos de plântulas não tratadas (F a J) e sujeitas a *stress* térmico SAT (Q a U) com marcação DAPI (F e Q), sinal de rDNA (G e R), sinal de pSc200 (H e S) e sobreposições do DAPI com a sonda ribossomal (I e T) e com a sonda subtelomérica (J e U). Barra = 5  $\mu$ m.

**Figura 6.** Núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas (A a F) e tratadas com SAT (G a L) com marcação para a proteína nucleolar fibrilarina. Barra = 5  $\mu$ m.

**Figura 7.** Produtos de PCR quantitativo em tempo real individualizados por electroforese em gel de agarose (1% m/v), obtidos a partir de cDNA de plântulas não tratadas (A, C, D e F), ou sujeitas a SAT (B, E e G). Produtos amplificados com *primers* específicos para a sequência de actina (A, B e C) e posteriormente submetidos à digestão enzimática com *Bfal* (C). Produtos resultantes da amplificação com *primers* para a sequência de rDNA (D e E) e *primers* para a sequência subtelomérica (F e G). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1Kb<sup>+</sup> sendo indicada à direita a banda correspondente a 300 pb.

**Gráfico 1.** Curvas de desnaturação obtidas utilizando *primers* específicos para a sequência do gene de actina a partir de cDNA de plântulas não tratadas (laranja e amarelo) ou tratadas com SAT (azul e verde). As curvas verde e amarela resultam da amplificação de cDNA sem restrição e as curvas azul e laranja resultam de cDNA digerido com a enzima *Bfal*, como descrito nos Materiais e Métodos.

**Gráfico 2.** Curvas de desnaturação de cDNA de plântulas não tratadas (roxo e vermelho) ou sujeitas a SAT (rosa e verde). As curvas verde e vermelha resultam da amplificação de cDNA com *primers* específicos para o rDNA de centeio, e as curvas azul, rosa e roxa resultam de cDNA amplificado com *primers* específicos para a sequência subtelomérica. A obtenção de uma única curva de desnaturação prova a amplificação de um único produto de PCR em todos os casos.

**Gráfico 3.** Alteração nos níveis de transcrição (*fold change*), das sequências ribossomal e subtelomérica em plântulas tratadas com SAT relativamente a plântulas não tratadas.

**Tabela 1.** Componentes da mistura de hibridação e respectivas quantidades.

**Tabela 2.** Valores médios das áreas nucleares (AN), números (N) e áreas de sinais de hibridação (A) e razão entre a área de sinais de hibridação e a área nuclear (A/AN) da sequência

subtelomérica pSc200 em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas e tratadas com SAT.

**Tabela 3.** Valores médios das áreas nucleares (AN), números (N) e áreas de sinais de hibridação (A) e razão entre a área de sinais de hibridação e a área nuclear (A/AN) da sequência ribossomal 45S em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas e tratadas com SAT.

**Tabela 4.** Disposição de sinais de hibridação de rDNA em núcleos interfásicos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas e sujeitas a SAT.

**Tabela 5.** Áreas nucleolares e frequência de núcleos apresentando diferente número de nucléolos em células de ápices radiculares e de coleótilo provenientes de plântulas não tratadas e tratadas com SAT.

**Tabela 6.** Valores de  $\Delta Ct$  para as sequências ribossomal e subtelomérica nas situações controle e *stress*.

## Lista de abreviaturas

% - Percentagem

5mC – 5 metilcitosina

APX – ascorbato peroxidase

BSA – albumina de soro de bovino

CCS1 - sonda para a região centromérica de cereais

cDNA – DNA complementar

cm, mm,  $\mu\text{m}$ , nm - centímetros, milímetros, micrómetros, nanómetros

CMT - *chromomethyl-transferase*

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

Col-0 – ecótipo de *Arabidopsis thaliana Columbia-0*

Ct – ciclo limite (*threshold cycle*)

Cy3 - fluorocromo com emissão na zona do vermelho

d, h, min, s - dias, horas, minutos, segundos

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindole

DFC – componente fibrilar densa (*dense fibrillar component*)

DNA - ácido deoxirribonucleico

DNMT - *mammalian DNA methyltransferase*

DRM - *domains rearranged methyltransferase*

dsRNA – *double stranded RNA*

dUTP - deoxiuridina trifosfato

EB - tampão enzimático (*enzyme buffer*)

FCs – centros fibrilares (*fibrillar centers*)

FISH – hibridação *in situ* fluorescente

GC – componente granular (*granular component*)

GRS – família de sequências repetitivas de *Nicotiana tabacum*

H1 – Histona H1

H2A – Histona H2A

H2B – Histona H2B

H<sub>2</sub>O – água

H3 – Histona H3

H3K27<sub>me3</sub> – trimetilação do resíduo 27 de lisina da histona H3

H3K4<sub>me2</sub> – dimetilação do resíduo 4 de lisina da histona H3

H3K4<sub>me3</sub> – trimetilação do resíduo 4 de lisina da histona H3

H3K9<sub>me2</sub> – dimetilação do resíduo 9 de lisina da histona H3

H4 – Histona H4

HAT – acetiltransferases de histonas  
HCl – ácido clorídrico  
HDA6 – *HISTONE DEACETYLASE 6*  
HDAC – desacetilases de histonas  
HDMT - desmetilases de histonas  
HMT – metiltransferases de histonas  
HRS60 – família de sequências repetitivas de *Nicotiana tabacum*  
HSF – factores de transcrição de choque térmico (*heat shock transcription factors*)  
HSP – proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)  
HTS – *High temperature stress*  
ITS – *spacers* internos transcritos  
Kg, g, mg, µg, ng - kilograma, grama, miligramma, micrograma, nanograma  
Kpb – kilopares de bases  
l, ml, µl - litros, mililitros, microlitros  
Ler - ecótipo de *Arabidopsis thaliana Landsberg erecta*  
m/v – massa/volume  
MET - *methyltransferase*  
miRNA – micro RNA  
NOR - região do organizador nucleolar (“*nucleolus organizer region*”)  
°C – graus Celsius  
p/v – peso/volume  
pb – pares de base  
PBS – solução tampão fosfato (*phosphate buffer solution*)  
PCR - *polymerase chain reaction*  
PCRq – PCR quantitativo em tempo real  
PHYB – *PHYTOCHROME-B*  
pSc200 – sonda para a região subtelomérica de centeio  
pTa71 - sonda para a região do NOR  
RdDM – *RNA directed DNA methylation*  
rDNA – DNA ribossomal 45S  
RNA - ácido ribonucleico  
RNase – ribonuclease  
ROS – espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*)  
rRNA – RNA ribossomal  
SAT – *stress* de alta temperatura  
SDS - dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulphate*)  
siRNA – *small interfering RNA*

SOD – superóxido dismutase

SSC - citrato de sódio salino (*saline sodium citrate*)

v/v – volume/volume

$\chi^2$  - teste estatístico Qui-quadrado

## Preâmbulo

As plantas estão expostas a diversos factores ambientais, alguns dos quais induzem situações de *stress* que afectam o seu crescimento e desenvolvimento. Os factores causadores de *stress* podem ser de dois tipos: bióticos, no caso do agente causador do *stress* ser um organismo vivo, ou abióticos, no caso de o *stress* ser causado por factores ambientais (Madlung and Comai, 2004). Os *stresses* abióticos englobam, nomeadamente, os *stresses* hídrico, térmico, salino, luminoso ou escassez de nutrientes, sendo o *stress* hídrico o mais estudado. Os mecanismos de resistência, que permitem sobreviver ao *stress* envolvem dois tipos de respostas possíveis: tolerância, que permite à planta manter a actividade metabólica semelhante à situação normal; evasão em que a planta entra num estado de dormência, diminuindo acentuadamente a actividade metabólica. Por outro lado a planta pode ser susceptível ao *stress* a ponto de não sobreviver a este. A sobrevivência do organismo está também dependente da sua aclimação e/ou adaptação ao *stress* imposto. A aclimação é a capacidade que as plantas têm de ajustar atributos fisiológicos e estruturais como resposta a um determinado estímulo ambiental, ajustes que lhe permitirão responder melhor a uma situação de *stress* posterior (Buchanan, 2000).

A tolerância das plantas ao *stress* reflecte-se normalmente a quatro níveis: homeostase, ajuste metabólico, controlo de crescimento e controlo de danos sofridos. Estas respostas envolvem variações na expressão génica controlada por factores de transcrição activados (Zhu, 2002) através das vias de sinalização celular.

Alterações nos padrões de expressão de genes específicos ou na actividade de determinadas proteínas como resposta ao *stress* têm sido amplamente estudadas (Kim et al., 2010). No entanto desconhecem-se ainda os efeitos do *stress* térmico na transcrição e nos padrões de organização nuclear de sequências repetitivas. Este trabalho pretende assim avaliar as alterações induzidas por *stress* térmico nos padrões de organização e expressão de duas sequências repetitivas em diferentes órgãos de plântulas de *Secale cereale*. O centeio é uma planta modelo em estudos citogenéticos, devido ao grande genoma (8110 Kpb (Bennett and Smith, 1976)) e ao número reduzido de cromossomas ( $2n=14$ ). As sequências seleccionadas para este estudo, uma codificante (DNA ribossomal) e outra não codificante (subtelomérica pSc200) estão presentes em elevado número de repetições localizadas em regiões restritas dos cromossomas, possibilitando uma análise rigorosa dos efeitos do *stress* térmico em sequências envolvidas na síntese proteica e na organização do genoma.

## Revisão do estado da Arte

### Organização e dinâmica da cromatina

Nos eucariotas o DNA encontra-se associado a proteínas (histonas), formando a cromatina que pode apresentar distintos níveis de organização. O nucleossoma representa o primeiro nível de organização sendo constituído por 147 nucleótidos que envolvem um octâmero de quatro histonas, H2A, H2B, H3 e H4 (existindo duas histonas de cada tipo) que se encontram ligadas pela histona H1. A fibra de cromatina de 30nm constitui o segundo nível, resultante da associação dos nucleossomas levando a um novo enrolamento helicoidal (Woodcock and Ghosh, 2010).

As alterações de aminoácidos localizados nas caudas das histonas modulam a acessibilidade da cromatina à transcrição, sendo as mais estudadas a metilação, a acetilação e a fosforilação (Peterson and Laniel, 2004). As alterações das histonas influenciam o nível de compactação da cromatina, nomeadamente a hipoacetilação das histonas H3 e H4 e a hipermetilação dos resíduos de lisina 9 e 27 da histona H3 (H3K9me e H3K27me) induzem a condensação, enquanto a hiperacetilação das histonas H3 e H4 promove a descondensação (Bender, 2004). As enzimas mais comuns responsáveis pelas alterações de aminoácidos presentes nas caudas das histonas são as acetiltransferases (HAT), as desacetilases (HDAC) as metiltransferases (HMT), as desmetilases (HDMT) e as cinases (Peterson and Laniel, 2004).

A metilação de citosinas influencia igualmente a organização da cromatina. Ao contrário do que acontece em animais, em que a metilação ocorre maioritariamente em sequências simétricas CpG, a metilação de citosinas em plantas pode também ocorrer em locais CpG e CpNpG (Bender, 2004). Existem quatro classes distintas de metilases do DNA em plantas: DRM1 e DRM2 (*domains rearranged methyltransferase*) responsáveis pela metilação *de novo* e ortologas da DNMT3 dos mamíferos (Aufsatz et al., 2004), CMT3 (*chromomethyl-transferase*), exclusiva de plantas, que actua como metilase *de novo* nas regiões não CpG e como metilase de manutenção das regiões CpNpG; e a DNMT2 (*mammalian DNA methyltransferase*), uma metiltransferase ainda de função desconhecida (Fransz et al., 2006). Aquando da replicação do DNA, a metilação dos locais CpG é mantida pela actuação da MET1 (*methyltransferase*), uma enzima de metilação de manutenção (que também pode actuar como metilase *de novo*) que, por interacções com outras proteínas, metila a cadeia réplica reconhecendo os locais de metilação presentes na cadeia molde. A manutenção da metilação em locais CpHpG pensa-se ser feita através de uma interacção com as histonas. Por fim a metilação assimétrica é mantida pela DRM2 (Law and Jacobsen, 2010).

A determinação dos locais de metilação de novo pode ser mediada pelo processo *RNA directed DNA methylation* (RdDM), que também pode estar envolvido na metilação de manutenção. A transcrição de diversas sequências origina moléculas de RNA em cadeia dupla (dsRNA) que após a degradação por proteínas *DICER-like* originam pequenas moléculas de RNA que podem ser de dois tipos: *small interfering RNA* (siRNA), originadas de uma molécula de dsRNA simples, ou micro RNA (miRNA), caso tenham resultado da clivagem de uma molécula de RNA com estrutura secundária em gancho. As pequenas moléculas de RNA, associados à proteína ARGONAUTA possibilitam a metilação através do mecanismo RdDM utilizando uma das metilases *de novo*. A metilação de manutenção dos locais não CpG baseia-se num processo semelhante, utilizando as metilases DRM ou CMT3 consoante seja uma zona CpNpN ou CpNpG, respectivamente (Fransz et al., 2006).

Existem portanto duas formas globais de organização da cromatina, que diferem no estado de condensação: a eucromatina, que se encontra descondensada, e a heterocromatina, que se encontra bastante condensada durante todo o ciclo celular (Neves, 2007). Estas diferenças estão correlacionadas, na maioria dos organismos, com diferentes estados de metilação de citosinas do DNA e com diferentes tipos de alterações das histonas designando-se por marcas epigenéticas (Szyf, 2007).

### **Dinâmica de domínios heterocromáticos durante o desenvolvimento**

O desenvolvimento das plantas superiores envolve diferentes fases, iniciando-se na fase embrionária e terminando na fase reprodutiva através da formação de novas estruturas (Poethig, 2003). A transição entre as fases é regulada por vias independentes de sinalização celular e envolve a modulação da expressão de inúmeros genes em resposta ao efeito de hormonas, a alterações do fotoperíodo, da qualidade da luz e da temperatura, entre outros factores (Mouradov et al., 2002).

Durante o desenvolvimento observam-se diversas alterações dos domínios heterocromáticos do genoma, acompanhados por modificações das marcas epigenéticas. (Mathieu et al., 2003) observou que em plântulas de *Arabidopsis thaliana* o estabelecimento de cromocentros (domínios heterocromáticos) ocorre entre os 2 e os 4 dias após a germinação, estando associado a alterações dos padrões de distribuição de citosinas metiladas e à localização topológica de diversas sequências tais como os genes rRNA 5S. Apesar de em núcleos de plântulas com 2 dias os pré-cromocentros apresentarem marcas de histonas características da fracção heterocromática, o padrão de organização de citosinas metiladas (5mC) é disperso pelo núcleo. Em núcleos de plantas com 3 semanas de desenvolvimento já se observam os blocos de DNA (cromocentros), corroborando o facto de numa fase inicial do desenvolvimento ainda não existirem verdadeiros cromocentros.

Durante o início da germinação de organismos híbridos ou poliploides, também a dominância nucleolar (silenciamento preferencial de NORs de um dos genomas parentais), associada a modificações da organização da cromatina, é afectada. (Pontes et al., 2007) estudaram o estabelecimento da dominância nucleolar durante o desenvolvimento de *Arabidopsis suecica* (híbrido alotetraploide entre *A. thaliana* e *A. arenosa*). Nesse trabalho demonstrou-se que a dominância nucleolar se estabelece precocemente, observando-se mais transcritos ribossomais do genoma silenciado nos cotilédones e nas raízes jovens, seguindo-se uma progressiva redução desses transcritos nas plantas com quatro folhas até ao total silenciamento detectado na planta adulta. As marcas epigenéticas para a heterocromatina estão não só associadas a estas alterações na expressão dos genes ribossomais de *A. thaliana* no híbrido, mas também com a fracção de genes de rRNA inactivos de *A. arenosa* (que co-localizam parcialmente com H3K9me2). Esses autores identificaram a importância de duas deacetilases de histonas (HDA6 e HDT1) no estabelecimento da dominância nucleolar ao longo do desenvolvimento em *A. suecica*, bem como a correlação existente entre a desacetilação de histonas e a metilação de citosinas.

(Chen and Pikaard, 1997) demonstraram ainda que a dominância nucleolar é incompleta na fase de transição floral em indivíduos do género Brassica como (Pontes et al., 2007) veio a confirmar detectando transcritos de *A. thaliana* no híbrido *A. suecica* nesta mesma fase do desenvolvimento.

Na transição floral observam-se igualmente marcantes alterações na topologia nuclear, como demonstrado em *A. thaliana* por (Tessadori et al., 2007b). Nessa fase de desenvolvimento, em núcleos de mesófilo foliar, verifica-se a descompactação de sequências heterocromáticas centroméricas e também de zonas ricas em sequências génicas associada à diminuição da metilação de citosinas. A descompactação da cromatina está relacionada com um dos genes responsáveis por um fotoreceptor da via de sinalização luminosa, CRYPTOCHROME 2 (CRY2). De facto, em plantas mutantes para o gene CRY2 nos dois ecotipos analisados (Col-0 e Ler), não se observa a referida descompactação. Posteriormente, (Tessadori et al., 2009) confirmaram que a organização da cromatina é afectada pelas condições luminosas em ambientes naturais através da análise de diferentes ecotipos de *A. thaliana* com distintas proveniências geográficas. Como reguladores da organização dos domínios heterocromáticos de *A. thaliana* esses autores indicam o fotoreceptor PHYTOCHROME-B (PHYB) e a HDA6.

## Alterações epigenéticas mediadas por stress

Diversos trabalhos têm provado o envolvimento de alterações epigenéticas nos mecanismos de resposta das plantas a condições de *stress*. Em arroz (Tsuji et al., 2006) verificaram que a transcrição dos genes que codificam para as enzimas álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase 1 são induzidos em duas fases do tratamento de submersão, às 2 e 12 horas. A estas induções estão associadas alterações nas marcas epigenéticas, as H3K4<sub>2me</sub> passam a H3K4<sub>3me</sub>, e há um aumento da acetilação da histona H3. Ambas as alterações descritas são reversíveis, observando-se um retorno a padrões normais após o fim do *stress* que corresponde ao arejamento das sementes e ao retorno dos níveis de transcrição aos valores basais. Também em arroz se verifica uma alteração na expressão de algumas HDAC em resposta a *stress* térmico (24 horas a 4°C), ou ao aumento das concentrações de manitol e cloreto de sódio, indicando o possível envolvimento de deacetilases de histonas nas vias de resposta ao *stress* (Fu et al., 2007)

Em Arabidopsis, verificou-se também que os *stresses* abiótico e biótico induzem desacetilação de histonas mediada pelas HDA6 e HDA19 (Chinnusamy and Zhu, 2009) sendo a expressão de ambas induzida pelo ácido jasmónico e o etileno, em resposta a interações entre a planta e o agente patogénico (Zhou et al., 2005). Kim et al 2008 verificaram, também em Arabidopsis, que quatro genes de resposta ao *stress* de déficit hídrico, *responsive to dehydration (RD)29A*, *RD29B*, *RD20* e *AP2 domain-containing transcription factor (At2g20880)*, apresentam um aumento progressivo da H3K4me3 e H3K9ac durante as 5 horas após a indução do *stress*. Com excepção do gene RD29A, todos os restantes apresentam também um aumento nos níveis de H3K23ac e H3K27ac, indicando uma marcante alteração de padrões epigenéticos. Todas estas marcas estão associadas ao aumento de actividade génica.

(Sokol et al., 2007) verificaram que plantas de tabaco e de *A. thaliana* respondem ao *stress* salino e térmico (frio) e ao ácido abscísico exógeno, através de um aumento (5 minutos após o tratamento, mantendo-se por 20 minutos e 1 hora após o *stress*) da fosforilação do resíduo 10 de serina da H3, e um posterior aumento da fosfoacetilação da H3 e acetilação da H4.

A modulação do nível de metilação das citosinas está também envolvida na resposta a *stress*. Em milho, o *stress* de baixa temperatura (6 dias a 4°C) induz a hipometilação do DNA, mantendo-se esse padrão durante 7 dias após a transferência para 23°C (Steward et al., 2002). Em plantas de tabaco sujeitas a *stress* osmótico e salino verifica-se a indução da hipermetilação de sequências repetitivas dispostas *em tandem* não transcritas HRS60 (Koukalova et al., 1989) e GRS (Gazdova et al., 1995), duas famílias de sequências repetitivas de *Nicotiana tabacum*. Em resposta ao *stress* induzido por altas concentrações

de alumínio, salinidade e baixas temperaturas, as plantas de tabaco expressam uma proteína (*glycerophosphodiesterase-like* NtGPD<sub>L</sub>) que induz a hipometilação de sequências de DNA em locais CCGG (Choi and Sano, 2007).

(Sunkar and Zhu, 2004) verificaram em *A. thaliana* a influência do *stress* de baixa temperatura (0°C durante 24 horas), desidratação (através da privação de água ou da exposição a elevados níveis de salinidade) e de ácido abscísico nos níveis de expressão de alguns miRNAs. Concluíram que os miRNAs actuam regulando a expressão de genes e/ou processos envolvidos na resposta ao *stress*, e que os seus níveis de expressão dependem da sua sequência alvo.

Alterações no desenvolvimento podem também ocorrer como resposta das plantas ao *stress*. De facto, são comuns alterações na diferenciação celular induzidas por condições de *stress*, nomeadamente na transição para a fase reprodutiva, através do atraso do desenvolvimento em condições ambientais adversas (Chinnusamy and Zhu, 2009). O excesso de espécies reactivas de oxigénio (ROS) pode induzir um *stress* oxidativo na planta, mas também são necessárias para o desenvolvimento da planta. Em folhas de milho (Bernstein et al., 2010) verificaram que, sob efeitos de *stress* salino, diferentes fases de desenvolvimento necessitam de diferentes enzimas para a evasão ao *stress* oxidativo. Há uma redução do nível de ROS nas folhas mais jovens devido à actividade da superóxido dismutase (SOD) e da ascorbato peroxidase (APX), sendo preterida a necessidade de ROS para o crescimento perante a possibilidade da planta ser afectada por *stress* oxidativo induzido pelo *stress* salino. Em folhas adultas a quantidade de ROS é controlada pela acetiltransferase do clorafenicol (CAT).

(Lee and Lee, 2003) demonstraram a susceptibilidade do pólen de *A. thaliana* ao *stress* térmico resultante da exposição a baixa temperatura (0°C durante 72 horas) através da redução da taxa de germinação do pólen e do atraso na produção de sementes. Os autores indicam que estes efeitos se devem à ausência de expressão dos genes de resposta ao frio no grão de pólen, ao contrário do verificado em folhas adultas. (Zou et al., 2010) indicam a existência de uma correlação entre esta ausência de expressão e WRKY34, factor de transcrição da família WRKY geralmente associada a respostas da planta a situações de *stress*.

Por outro lado, o *stress* térmico pode causar distúrbios ao nível da homeostase celular, com consequentes atrasos no crescimento e desenvolvimento da planta ou mesmo induzindo a morte celular (Kotak et al., 2007). Relativamente a este *stress* abiótico, há respostas bem caracterizadas, como o aumento da produção de proteínas de choque térmico (HSPs), que actuam como chaperonas de modo a manter a conformação das proteínas que podem desnaturar com temperaturas elevadas. As HSPs dividem-se em várias famílias consoante o seu peso molecular (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, small

HSPs e ainda a Ubiquitina) (Efeoglu, 2009). Por outro lado, os factores de transcrição de resposta ao *stress* de alta temperatura (HSFs) medeiam a expressão das HSPs e de outros transcritos induzidos pelo calor. Os referidos factores de transcrição dividem-se em três classes, A, B e C, que diferem entre si essencialmente pelas características estruturais dos seus domínios de oligomerização (Nover et al., 2001) e estão igualmente envolvidos na resposta a outros *stresses* como luminosidade elevada (Nishizawa et al., 2006). Existem várias vias de sinalização onde se encontram envolvidas HSPs, HSFs e hormonas como o etileno, ácido salicílico e o ácido abscísico permitindo à planta alcançar a termotolerância. Estas vias estão também envolvidas na resposta ao *stress* oxidativo, o que indica uma relação próxima entre distintos *stresses* (Kotak et al., 2007). (Vacca et al., 2004) verificaram um aumento da quantidade de ROS (nomeadamente peróxido de hidrogénio e o ião superóxido) após a exposição de plantas de tabaco a altas temperaturas (55°C) induzindo morte celular programada. Um estímulo oxidativo pode também ter repercussões ao nível da termotolerância da planta, assim como a aplicação de ácido abscísico e de um precursor do etileno (*1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*), por exemplo (Larkindale and Huang, 2004).

(Qin et al., 2008) expuseram duas variedades de trigo, uma susceptível ao calor e outra tolerante a *stress* térmico e verificaram que existiam alterações na expressão de diversos genes nomeadamente os que codificam para HSPs, factores de transcrição, sinalização/biosíntese de fitohormonas, componentes do metabolismo primário e secundário e de resposta a *stresses* biótico e abiótico. Plantas aclimatadas e não aclimatadas dos distintos genótipos de trigo foram também expostas a alta temperatura durante 1 ou 24 horas tendo-se verificado que a aclimação tem um papel preponderante na resposta ao *stress* de curta duração mas que o metabolismo da planta aclimatada foi mais afectado no *stress* de longa duração em ambos os genótipos.

### **Organização genómica de sequências repetitivas em *Secale cereale***

O genoma de centeio (*Secale cereale* L.) é constituído por 8110 Mpb (Bennett and Smith, 1976), sendo a fracção de sequências repetitivas correspondente a 92% (Bartos et al., 2008). O DNA ribossomal e as regiões subtelo méricas não codificantes constituem duas fracções repetitivas do genoma, particularmente bem caracterizadas em centeio. A heterocromatina subtelo mérica corresponde a 12-18% do genoma total (Bedbrook et al., 1980) enquanto a ribossomal corresponde apenas a 0,32% (Appels et al., 1980; Rogers and Bendich, 1987)

Algumas plantas com genomas grandes, como o trigo o centeio e a cevada, (Dong and Jiang, 1998) apresentam os seus cromossomas com uma organização Rabl (Rabl,

1885). Esta disposição é uma consequência directa da configuração dos cromossomas em anafase e caracteriza-se pela posição em interfase dos telómeros num pólo e dos centrómeros no pólo oposto (AragonAlcaide et al., 1996).

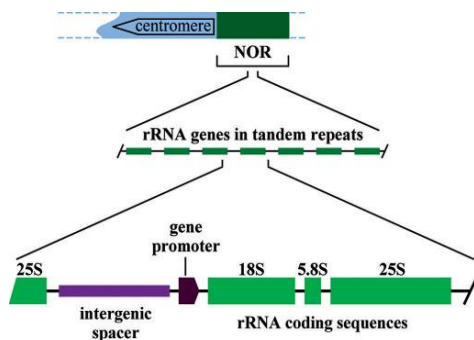
### **Sequências subteloméricas**

As zonas teloméricas e subteloméricas dos cromossomas são bastante importantes desempenhando funções relevantes na estabilidade dos cromossomas, na organização nuclear e no emparelhamento homólogo (Vershinin et al., 1995). As regiões subteloméricas heterocromáticas de centeio consistem num número restrito de famílias de sequências de DNA, que englobam, entre outras, a pSc119.2, a pSc200 e a pSc250. Estas três famílias correspondem a repetições com 120, 521 e 476 pares de bases, respectivamente (Vershinin et al., 1995). A sequência pSc200 representa aproximadamente 2,5% do genoma de centeio, a pSc250 1% (Rivin et al., 1986) e a pSc119.2 menos de 1% (Bedbrook et al., 1980). Quanto à localização destas sequências repetitivas, a sequência pSc200 localiza-se nas extremidades (imediatamente antes da zona telomérica) dos braços de todos os cromossomas de centeio, sendo que as unidades repetitivas se organizam em dímeros com organização “*head-to-head*” ou “*tail-to-tail*” (Vershinin et al., 1995). Adjacente às sequências pSc200 encontra-se um domínio também heterocromático correspondente a sequências pSc250, apenas em 18 braços cromossómicos (Vershinin et al., 1996). A sequência pSc119.2 apresenta múltiplas localizações intercalares e subteloméricas nos cromossomas de centeio (Vershinin et al., 1995). Os sinais de hibridação *in situ* fluorescente das sequências pSc200 e pSc250 co-localizam-se com os blocos subteloméricos DAPI-positivos. Nesses domínios existe uma elevada concentração de repetições em série, tendo a sequência pSc200 uma estrutura interna mais homogénea tal como comprovado pelo padrão dos produtos de PCR (*polymerase chain reaction*) (Vershinin et al., 1996). As sequências pSc200 estão presentes não só em centeio, mas também noutras espécies dos géneros *Agropyron* e *Dasypyron*. No entanto, nestas espécies, localizam-se apenas em algumas regiões subteloméricas, podendo ser igualmente detectadas noutras regiões cromossómicas (Vershinin et al., 1996).

### **DNA ribossomal**

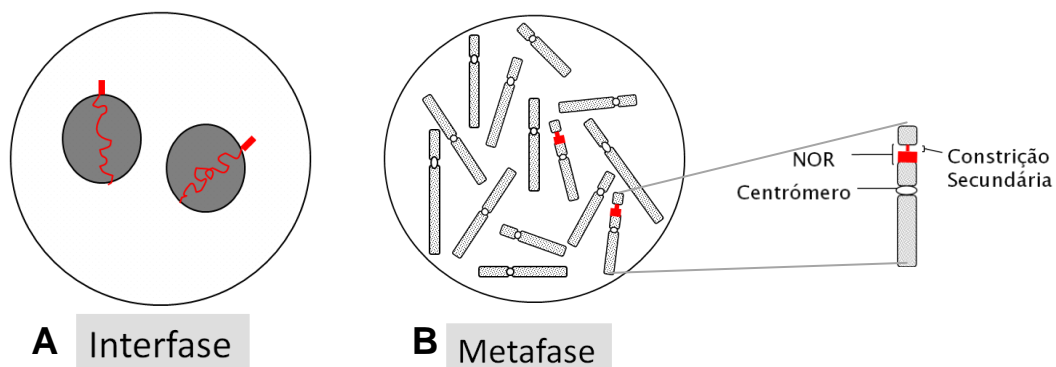
As unidades de DNA ribossomal 45S (rDNA) encontram-se repetidas e dispostas em série em regiões específicas dos cromossomas, os NORs (*Nucleolar Organizer Regions*). Nestas unidades, encontram-se zonas codificantes, 18S, 5,8S e 25S (25S em plantas, 28S em animais (Sumner, 1990) (Pederson and Politz, 2000) e não codificantes – região intergénica e *spacers* internos transcritos (ITSs 1 e 2) posteriormente removidos do

transcrito inicial (Fig. 1). O rDNA 5S encontra-se em *loci* distintos da unidade 45S (Heslop-Harrison, 2000).



**Figura 1.** Representação esquemática do NOR (Adaptado de (Neves et al., 2005))

No genoma de centeio existe um *locus* de rDNA localizado no cromossoma 1 e a organização desse domínio em interfase revela duas fracções distintas: heterocromática e eucromática. Assim, na maioria dos núcleos interfásicos observam-se dois blocos heterocromáticos localizam-se na periferia do nucléolo (blocos perinucleolares) de onde emanam fibras de rDNA para o interior do nucléolo, que correspondem às zonas transcricionalmente activas (Fig. 2A) (Leitch, 1993). Estudos posteriores revelaram que apesar de esta organização ser a maioritariamente observada (89%), podem verificar-se outros tipos de organização do rDNA em núcleos de ápices radiculares de centeio (Caperta et al., 2002), nomeadamente: (i) núcleos em que se observam apenas os blocos perinucleolares (9%) ou (ii) núcleos apresentando blocos perinucleolares e pequenos blocos de rDNA intranucleolares ligados por finos filamentos de cromatina (2%). Em metafase, a região dos NORs que foi transcrita na interfase anterior mantém-se descondensada e denomina-se constrição secundária, continuando a observar-se o bloco heterocromático, proximal em relação ao centrómero, que corresponde aos genes inactivos na interfase anterior (Fig. 2B) (Caperta et al., 2002).



**Figura 2.** Representações esquemáticas da organização do rDNA de centeio em interfase (A) e em cromossomas metafásicos (B)

Os rRNAs resultantes da transcrição destes genes, em conjunto com vários complexos proteicos, participam na produção dos ribossomas nos nucléolos, que correspondem a regiões com menor densidade de DNA do núcleo interfásico (Neves et al., 2005). O nucléolo apresenta três componentes distintas: os centros fibrilares (FCs – *fibrillar centers*), a componente fibrilar densa (DFC – *dense fibrillar component*) e a componente granular (GC – *granular component*) (Sirri et al., 2008). Os FCs são as zonas mais internas do nucléolo, quando comparadas com as restantes, e onde é possível distinguir uma subestrutura fibrilar (Recher et al., 1969). À sua volta dispõem-se os DFC, que apresentam uma estrutura mais densa, por vezes com um aspecto rendilhado devido à existência de pequenos FC intercalados (Sato et al., 2005). Por fim, na zona mais periférica do nucléolo, existe uma região granular que consiste em grânulos de ribonucleoproteínas com 15 a 20 nm (Raska et al., 2006).

Considera-se que na fronteira entre FCs e DFCs ocorre a transcrição dos genes ribossomais (Gonzalez-Melendi et al., 2001; Raska, 2003), apesar de haver outros estudos que indicam que a transcrição ocorre no interior dos FCs (p.e. (Cmarko et al., 2000; Raska et al., 1995; Scheer and Benavente, 1990; Thiry et al., 2000)). No DFC ocorre a maturação dos pré-RNAs e a síntese de rRNAs funcionais (Bartova et al., 2010). Os grânulos que se observam no GC correspondem a partículas pré-ribossomais (Raska et al., 2006), sendo nesta região que ocorre a síntese das subunidades ribossomais (Bartova et al., 2010).

O nucléolo é composto por várias ribonucleoproteínas, como a fibrilarina, que participa no processamento do pré-rRNA e a organização das subunidades ribossomas (Nicol et al., 2000), e a nucleolina, envolvida no processo de génese das subunidades ribossomais (Ginisty et al., 1999) (Bartova et al., 2010).

## Material e Métodos

### Material Vegetal

As sementes de centeio (*Secale cereale*, 2n=14, RR, linha fornecida pelo Prof. Neil Jones, Aberystwyth University) foram submetidas a um tratamento a 4°C durante cerca de 2 dias, de forma a sincronizar a germinação. Posteriormente, foram transferidas para uma câmara de crescimento a 22°C sem exposição à luz e ao fim de 3 a 4 dias, as plântulas foram submetidas a um tratamento térmico em que a temperatura foi elevada em rampa de 2°C por hora, dos 22°C aos 40°C. Ao fim de 4 horas a 40°C (SAT, *stress* de alta temperatura), os ápices radiculares com 1-2 cm e os coleóptilos foram recolhidos de plântulas controlo e com tratamento e foram fixados.

Para a realização de hibridação *in situ*, o material foi fixado em etanol acético (solução 3:1 (v/v) etanol absoluto/ácido acético) durante 16 horas à temperatura ambiente, com agitação e renovação da solução de fixador cerca de 4 a 5 vezes durante esse período e posterior armazenamento a -20°C. Para a realização de imunodeteção *in situ*, o material foi fixado em formaldeído 0,2% em 1xPBS<sup>1</sup> durante 30 minutos, tendo sido posteriormente realizada uma fixação em metanol 100% durante 8 horas à temperatura ambiente com agitação e renovação da solução a cada 40 minutos durante esse período e por fim armazenado a -20°C.

Para os estudos moleculares, as plântulas obtidas da mesma forma foram mantidas em câmaras de crescimento com 8 horas de escuridão (15°C) e 16 horas de luz (22°C). As plântulas de centeio com 13 dias, no estado de crescimento 10, que corresponde à primeira folha fora do coleóptilo (código de crescimento de planta nova 10) segundo o Código Decimal de Zadoks para os estados de crescimento dos cereais (Tottman, 1977) foram submetidas a tratamento de alta temperatura (SAT, anteriormente descrito). No fim do tratamento térmico as folhas de pelo menos três plântulas foram congeladas individualmente em azoto líquido e posteriormente guardadas a -80°C.

---

<sup>1</sup> 10x Phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Fosfato de sódio dibásico, 2 mM fosfato de sódio monobásico em água destilada, ajustar pH a 7,4. PBS 1x: diluição de 1:10 de PBS 10x

## **Análise Citogenética**

### **Obtenção de preparações**

As raízes foram retiradas do fixador e lavadas numa solução de tampão enzimático (1xEB<sup>2</sup>) 2 x 5 minutos. Em seguida, o material foi sujeito a uma digestão com uma solução enzimática<sup>3</sup> durante 1h15m para as raízes e 1h30m para os coleóptilos (aproximadamente), a 37°C. Os ápices radiculares digeridos foram então transferidos novamente para tampão enzimático (1xEB). Posteriormente, cada ápice radicular foi colocado numa lâmina, numa gota de ácido acético a 60% (v/v), procedendo-se à dispersão do material com o auxílio de agulhas. Para finalizar, foi colocada uma lamela sobre o material, exercendo pressões para promover a separação das células num único plano, removendo o excesso de líquido com o papel de filtro.

A qualidade das preparações foi aferida com recurso a um microscópio de contraste de fase, sendo depois removidas as lamelas dos esfregaços seleccionados, fazendo incidir CO<sub>2</sub> durante 30 segundos na face da lâmina oposta à da lamela, para possibilitar descolar depois a lamela com o auxílio de uma lâmina de barbear. As preparações assim obtidas, depois de secas ao ar, foram conservadas a 4°C até serem utilizadas

### **Hibridação *in situ* fluorescente**

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes sondas:

- pSc200: sequência repetitiva subtelomérica de centeio (Vershinin et al., 1996), marcada com digoxigenina-11-dUTP;
- Sonda designada como rDNA 45S, que corresponde à amplificação de três fragmentos distintos de rDNA do plasmídeo pTa71: dois fragmentos localizados no 25S e um fragmento localizado no 18S, que foram usados numa mistura com a proporção 1:1:1.

As sondas foram obtidas por PCR utilizando uma mistura de nucleótidos marcados e não marcados.

As lâminas foram sujeitas a pré-tratamentos de modo a reduzir as possíveis interações entre as sondas e componentes celulares e facilitar a acessibilidade das sondas

---

<sup>2</sup> 1xEB: A – Ácido cítrico monohidratado 0,1 M; B – Citrato trissódico desidratado 0,1 M; 10xEB: adicionar na proporção 2:3 (A:B); diluir 1:10 em água destilada para obter 1xEB.

<sup>3</sup> Solução enzimática: 0,3% (p/v) celulase R10, 0,3% pectoliase Y-23 e 0,25% citohelicase (v/v), 0,03% EDTA em 2 x SSC, pH 4.2.

e reagentes de detecção. Procedeu-se à digestão do citoplasma e fracção proteica do DNA com uma solução de pepsina<sup>4</sup> e posteriormente à lavagem das lâminas para remover a pepsina com 2x SSC<sup>5</sup>. Em seguida, procede-se a um tratamento com uma solução de RNase<sup>6</sup> durante uma hora em câmara húmida a 37°C, seguida de lavagem das lâminas com 2xSSC (3x5 minutos).

Por fim, procedeu-se a desidratação das lâminas utilizando etanol a 70% (v/v) durante 3 minutos e etanol a 100% por mais 3 minutos, deixando a secar ao ar pelo menos 30 minutos.

A Tabela 1 descreve a preparação da mistura de hibridação.

Soluções	µl/lâmina
Formamida a 100%	14
20xSSC	0,4
SDS 10%	0,5
DNA de esperma de salmão (5 µg/µl)	1
Sonda	y*
Sulfato de dextrano 50%	8
H <sub>2</sub> O	Até 40

\*O valor utilizado para a sonda (y) varia com a sonda que está a ser utilizada.

**Tabela 1:** componentes da mistura de hibridação e respectivas quantidades.

Para promover a desnaturação das sondas, esta mistura é colocada num banho a 100°C durante 10 minutos, sendo depois colocada em gelo durante 5 minutos para evitar a renaturação. Foram adicionados 40µl da mistura a cada lâmina, cobrindo a região da preparação com uma lamela de plástico. As lâminas foram então colocadas no termociclador e submetidas a um programa que promove a desnaturação a 78°C, durante 10 minutos, seguida de uma descida gradual da temperatura até 37°C, temperatura a que são mantidas as lâminas durante a noite, em câmara húmida.

No dia seguinte, as lâminas foram sujeitas a uma série de lavagens pós-hibridação da seguinte forma: 2xSSC, 3 minutos a 42°C; formamida a 20% (10ml de formamida para 40ml de 0,1xSSC), 10 minutos a 42°C; 2xSSC, 2x5 minutos a 42°C; 2xSSC, 2x5 minutos à

<sup>4</sup> Pepsina (actividade 3.200-4.500 unidades/mg de proteína) – Solução “stock” de 500 µg/ml em 0,01 M HCl. Usar uma diluição 1:75 em 0,01 M HCl.

<sup>5</sup> Saline Sodium Citrate: 0.3 M NaCl, 0.03 M citrato de sódio em água destilada, ajustar a pH 7,0.

<sup>6</sup> RNase – Solução “stock” 10 mg/ml em 10 m M Tris.HCl, pH 8, preparada a partir de ribonuclease A, solução em 10 mM Tris.HCl, pH 8 e 50% glicerol. Usar 100mg/ml diluindo 1/100 em 2xSSC.

temperatura ambiente: 4xSSC/Tween<sup>7</sup>, 2x5 minutos à temperatura ambiente. A lavagem com formamida a 20% corresponde a uma estringência de 85%.

Posteriormente foi usada uma solução de BSA 5%<sup>8</sup>, durante 5 minutos à temperatura ambiente para bloquear os locais que interferem com o anticorpo utilizado na detecção das sondas. Em seguida, é colocada 50µl/lâmina da mistura de detecção, que contém BSA 5%, estreptavidina conjugada com fluorocromo Cy3 (1:200, excitação no verde, emissão no vermelho), que irá detectar as sondas marcadas com biotina e anti-digoxigenina conjugada com fluoresceína (1:20, excitação no azul, emissão no verde amarelado) que irá detectar as sondas marcadas com digoxigenina, 1 hora em câmara húmida a 37°C. No final, as lâminas foram lavadas em 4xSSC/Tween, 3x5 minutos.

Por último, as lâminas foram sujeitas à coloração por DAPI<sup>9</sup>, um composto com uma grande afinidade para o DNA com emissão no azul. Para tal, foram colocados 7 µl de DAPI em citifluor<sup>10</sup> na zona do esfregaço, colocando por fim uma lamela de vidro e removendo o excesso com o auxílio de papel de filtro.

### **Imunodeteção *in situ* de proteínas**

Para a avaliação de nucléolos, foi realizada imunodeteção *in situ* utilizando um anticorpo para a proteína nucleolar fibrilarina (Fibrillarin antibody [38F3] – Nucleolar Marker, Abcam ab4566)

As preparações foram obtidas como descrito no ponto “Obtenção de preparações” alterando os tempos de digestão para 1 hora para as raízes e 2h30m para os coleótilos. Após a remoção da lamela com o auxílio do CO<sub>2</sub> as lâminas foram imediatamente mergulhadas em 1xPBS.

De seguida, foi realizada uma fixação com formaldeído a 4% em 1xPBS durante 10 minutos à temperatura ambiente. As preparações foram bloqueadas com uma solução de BSA a 8% (p/v) em 0,1% Triton x100 em 1xPBS<sup>11</sup>. Foi feita uma lavagem rápida em 1x PBS

---

<sup>7</sup> 4xSSC 0,2% (v/v) Tween 20 - Preparação de 500 ml: fazer uma diluição 1:5 de 20xSSC em água, adicionar 1 ml de Tween 20 e misturar bem devido à sua viscosidade.

<sup>8</sup> Solução de BSA 5% - Albumina de soro de bovino (BSA, B-8894, fracção V isenta de globulina, Sigma) em 4xSSC/Tween.

<sup>9</sup> DAPI (dihidroclorato de 4', 6-diamino-2-fenilindole), solução de 2 µg/ml.

<sup>10</sup> Citifluor AF1 – Solução glicerol/PBS redutora da dissipação de fluorescência.

<sup>11</sup> 0,16g BSA, 2 ml 1xPBS, 2µl Triton x100

e foi colocado o anticorpo primário para a fibrilarina numa diluição de 1:500 em 1x PBS. A incubação foi feita durante a noite a 4°C.

No dia seguinte, as preparações foram lavadas rapidamente em 1x PBS e foi colocado o anticorpo secundário numa diluição de 1:200 também em 1x PBS mas durante uma hora a 37°C. Fizeram-se duas lavagens de 15 minutos em 1x PBS e submeteram-se as lâminas à coloração por DAPI como descrito anteriormente.

### **Observação, captação e tratamento de imagem**

As imagens foram observadas no microscópio de epifluorescência Zeiss, modelo Auxiskop 2. A captação de imagens foi realizada com o programa axiovision 4.5 e com a câmara digital Zeiss, modelo Axio Cam MRc5. O tratamento de imagens foi efectuado com o programa Adobe Photoshop versão 7.0.

### **Análise quantitativa**

Procede-se à análise quantitativa recorrendo ao *software ImageJ*, utilizando as imagens recolhidas no microscópio de fluorescência (antes de serem tratadas com o programa Adobe Photoshop).

Neste programa é aplicado um valor mínimo (*threshold*) a partir do qual todos os pixéis com intensidade média igual ou superior a este valor são seleccionados para quantificação. Com este programa foram avaliados os seguintes parâmetros relativamente aos sinais de hibridação *in situ* das sondas de rDNA e pSc200: área total do núcleo interfásico, área total e média do sinal de hibridação *in situ* (em  $\mu\text{m}^2$ ) e número de partículas obtidas na hibridação. Foram ainda avaliadas as distâncias entre os blocos de rDNA e o diâmetro com a mesma direcção desta distância. Relativamente à análise da imunocitoquímica, foram avaliados o número de nucléolos, as áreas nucleolares, total e média, obtidas pela marcação do anticorpo para a proteína nucleolar fibrilarina.

Após a recolha destes valores foi realizada uma análise estatística, com recurso ao teste  $\chi^2$  para as frequências obtidas no número de nucléolos e Teste T para os restantes resultados, de modo a verificar se existem diferenças significativas entre os valores médios obtidos.

## **Avaliação de níveis de transcrição**

### **Obtenção de cDNA**

#### **Extracção de RNA**

As extracções de RNA de folhas mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram efectuadas utilizando o Kit *Frozen, hard consistency, or RNase-rich tissue sample preparation* do Kit RNAqueous® da Ambion, de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo começa com a maceração do material congelado num almofariz com o recurso a azoto líquido. O macerado obtido é posteriormente colocado em tubo de 1,5 ml que já contem 750  $\mu\text{l}$  do tampão que permite a lise das células e inibe RNases endógenas e 62  $\mu\text{l}$  de um tampão com um polímero de alto peso molecular que se liga a polifenóis e polissacáridos e facilita a obtenção de RNA de tecidos vegetais. Mistura-se vigorosamente e procede-se à centrifugação 2 minutos a 16000g em seguida o sobrenadante é transferido para um tubo de microcentrifuga de 2 ml e misturado com 812  $\mu\text{l}$  de etanol a 62% (v/v), de modo a preparar o RNA a aderir às fibras da coluna de extracção. De seguida, faz-se passar a mistura por uma coluna centrifugando a 14000g 1 minuto a  $4^{\circ}\text{C}$  para reter o RNA, procedendo-se posteriormente a 2 lavagens com o 1º tampão de lavagem, a primeira com 700  $\mu\text{l}$  e a segunda com 500  $\mu\text{l}$ , com centrifugações de 1 minuto a 14000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  para fazer os tampões passarem pela coluna. A terceira lavagem é feita com 500  $\mu\text{l}$  do segundo tampão de lavagem que contem etanol e procede-se a uma nova centrifugação a 14000 g durante 1 minuto também a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para remover todo o etanol que pode interferir com a eluição do RNA é feita uma centrifugação de 2 minutos a 14000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  sem qualquer tampão. A eluição do RNA foi feita adicionando 50  $\mu\text{l}$  do tampão de eluição que se encontra a  $80^{\circ}\text{C}$ , centrifugando a 13600g à temperatura ambiente. O RNA é então sujeito a uma precipitação por adição de 25  $\mu\text{l}$  de cloreto de lítio, deixando a incubar durante 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  e realizando de seguida uma centrifugação durante 15 minutos a 16000g a  $4^{\circ}\text{C}$ , removendo depois o sobrenadante. Por último, foi feita uma desidratação com 100  $\mu\text{l}$  etanol absoluto a 70% (v/v) do precipitado obtido anteriormente seguida de uma nova centrifugação igual à anterior. Deixou-se evaporar ao ar todo o etanol e resuspendeu-se o precipitado em 50  $\mu\text{l}$  de água destilada estéril. De modo a aferir a integridade, qualidade e concentração dos RNAs extraídos, foram retirados 5  $\mu\text{l}$  para avaliação por espectrofotometria e 5  $\mu\text{l}$  para electroforese.

### Digestão com DNase

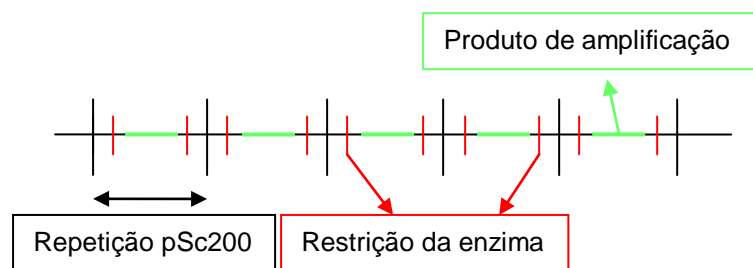
O RNA extraído foi submetido a uma digestão com RQ1 RNase-Free DNase da Promega. Para isso foi utilizada a seguinte mistura: 1  $\mu$ l de DNase, 1  $\mu$ l de tampão<sup>12</sup>, X  $\mu$ l de RNA de modo a obter 1  $\mu$ g, e H<sub>2</sub>O até 20  $\mu$ l, 1 hora a 37°C. Decorrido este tempo, adicionou-se 1  $\mu$ l de solução STOP<sup>13</sup>, para inibir o funcionamento da enzima, 10 minutos a 65°C.

### Transformação em cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit DyNAmo™ cDNA Synthesis (Finnzymes), utilizando a seguinte mistura: 10  $\mu$ l de tampão, 1  $\mu$ l de *primers* aleatórios (*random hexamers*), 2  $\mu$ l de transcriptase reversa M-MuLV RNase H<sup>+</sup> e X  $\mu$ l de RNA, com um máximo de 1  $\mu$ g e H<sub>2</sub>O até 20  $\mu$ l. A mistura foi submetida a diferentes temperaturas controladas num termociclador: extensão dos *primers* a 25°C durante 10 minutos; síntese do DNA a 37°C durante 30 minutos; inactivação da transcriptase reversa a 85°C durante 5 minutos; e arrefecimento da amostra a 4°C.

### Digestão enzimática

Devido à estrutura repetitiva da zona subtelomérica de centeio em que a sequência pSc200 se encontra disposta em tandem e dado que em PCR quantitativo em tempo real (PCRq) se pretende obter um único pico de amplificação na curva de *melting*, que corresponde a uma única banda no gel de agarose, foi efectuada uma digestão enzimática prévia do cDNA de forma a individualizar as repetições sem afectar o produto de amplificação obtido por PCRq.



**Figura 3:** representação esquemática dos locais de restrição da enzima *Bfal*

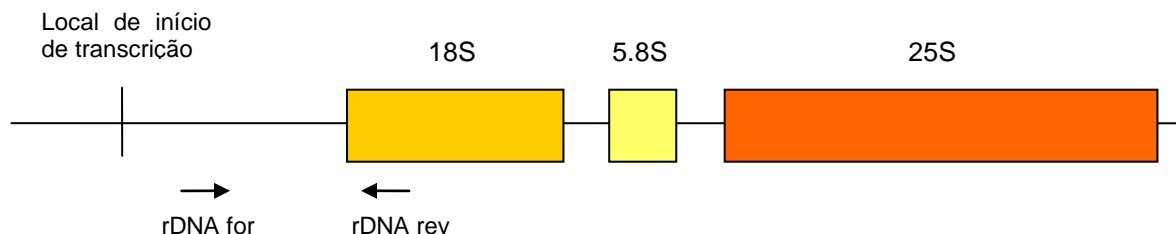
<sup>12</sup> Tampão 10X - 400mM Tris-HCl [pH 8.0 at 25°C], 100mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>

<sup>13</sup> STOP solution - (20mM EGTA [pH 8.0 at 25°C])

Foi utilizada a enzima de restrição *Bfal* (Finnzymes) que tem como local de reconhecimento  $\begin{matrix} \text{C TAG} \\ \downarrow \\ \text{GAT C} \end{matrix}$  para efectuar a restrição com a seguinte mistura: 1µl de cDNA, 1µl de *Bfal*, 2µl de buffer 10x Tango e 16µl de água miliQ durante 15 horas (*overnight*) a 37°C.

### PCR quantitativo em tempo real (PCRq)

O cDNA assim obtido foi utilizado como molde na reacção de PCRq com *primers* específicos para amplificar a região intergénica transcrita de rDNA de centeio e a região repetida da sequncia pSc200, utilizando diluições de trabalho de 1:20 e 1:100. Foram também utilizados *primers* específicos para o gene de actina utilizado como controlo amplificado a partir da diluição de trabalho 1:20. Os *primers* utilizados foram os seguintes: **actina** - *primers* for 5'- GCTGGATTCTGGTGATGGTGTGAG -3' e rev 5'- CAATGAGAGATGGCTGGAAGAGGAC -3'; **rDNA** - *primers* for 5'- CGGCACGTACGTCTGGTG -3' e rev 5'- AGACAAGCATATGACTACTGGCAG -3'; **pSc200** - *primers* for 5'- TCTTTGATCACCGTTTCTTCG -3' e rev 5'- ACGTGCGTGGAAAATTCTG -3'.



**Figura 4:** representação esquemática de uma unidade de rDNA com os locais de ligação dos primers utilizados no PCRq.

O PCRq foi realizado segundo o protocolo da Finnzymes, HS SYBR<sup>®</sup> qPCR Kit, com a seguinte mistura: 1 µl de amostra, 1µl de *primers* (com uma concentração de 10mM), 10 µl do mix SYBR Green (que incorpora uma versão modificada da DNA polimerase *hot start* da *Thermus Brokianus*) e 8 µl de H<sub>2</sub>O. O programa de PCR a que as amostras são submetidas tem como temperatura de *annealing* 60°C e um tempo de extensão de 30 segundos. O programa utilizado submete as amostras a 40 ciclos de 10 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 60°C e 30 segundos de extensão a 72°C. Foi registada a *melting curve* e os valores de temperaturas de *melting*. As amostras foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose a 1% (m/v).

### Quantificação relativa

A quantificação relativa foi efectuada através do método  $\Delta\Delta Ct$  em que os valores de Ct (threshold cycle) de cada amostra são subtraídos para obter a transcrição da sequência em estudo normalizada ao gene de referência e relativa à situação controlo.

Para isso são resolvidas as seguintes equações:

$$\left. \begin{aligned} \Delta Ct_{\text{situação alvo}} &= Ct_{\text{gene em estudo}} - Ct_{\text{gene controlo}} \\ \Delta Ct_{\text{situação controlo}} &= Ct_{\text{gene em estudo}} - Ct_{\text{gene controlo}} \end{aligned} \right\} \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{situação alvo}} - \Delta Ct_{\text{situação controlo}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Expressão da sequência alvo}$$

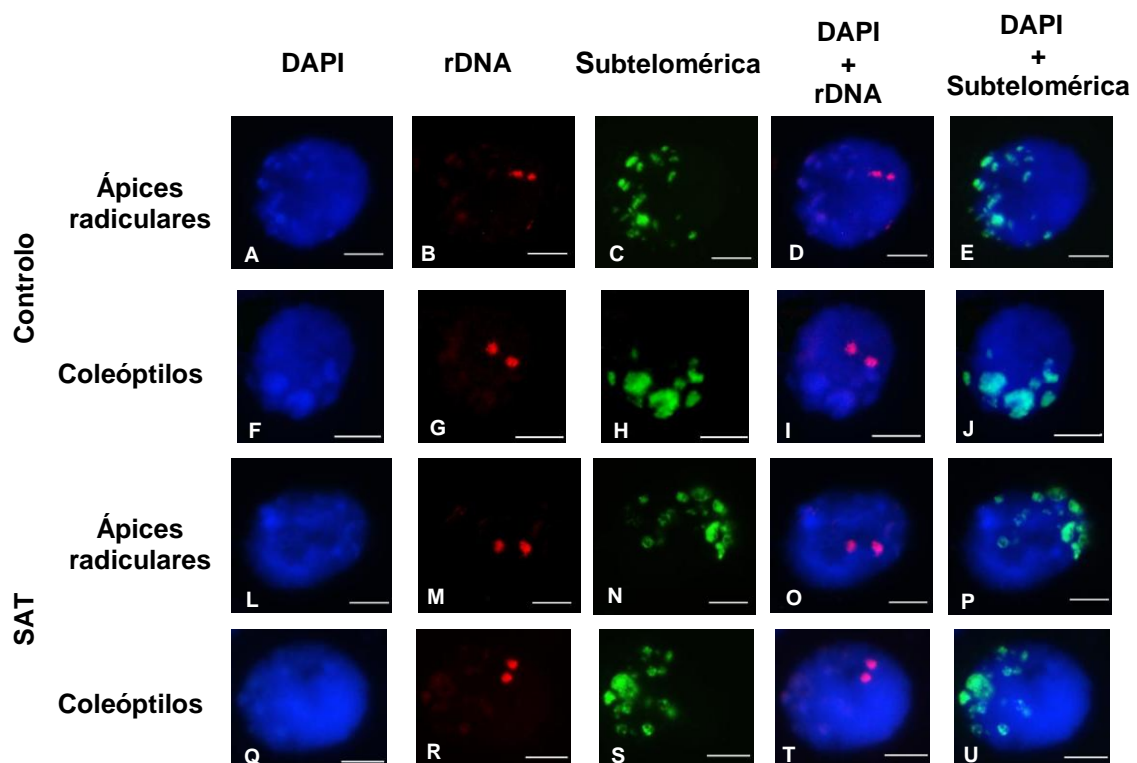
Com os resultados obtidos foi feito o tratamento estatístico com recurso ao teste T para verificar se existiam diferenças significativas entre os valores médios de  $\Delta Ct$  controlo e tratamento.

## Resultados

Com o objectivo de avaliar o efeito de *stress* de alta temperatura (SAT) em diferentes órgãos de plântulas de centeio procedeu-se ao estudo dos padrões de conformação da cromatina utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sondas de rDNA e sequência repetitiva pSc200. Procedeu-se igualmente à avaliação de alterações na dinâmica nucleolar utilizando a técnica de imunodeteção com anticorpo para a proteína nucleolar fibrilarina. Por fim são apresentados os resultados relativos à quantificação dos níveis de transcrição de sequências ribossomal e pSc200 por PCR quantitativo em tempo real obtidos em plântulas controlo e sujeitas a SAT.

### Efeitos do *stress* térmico nos padrões de conformação de cromatina em núcleos de ápices radiculares e coleóptilos de centeio

A análise da conformação da cromatina das duas sequências referidas em núcleos de células interfásicas de ápices radiculares e coleóptilos de plântulas de centeio revela a existência dois blocos de rDNA, correspondentes aos dois NORs de centeio, e na observação dos blocos subtelo méricos de pSc200 agrupados num dos pólos nucleares, característica da conformação Rabl existente em centeio.



**Figura 5:** Núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratadas (A a E) e sujeitas a *stress* térmico SAT (L a P) com marcação DAPI (A e L), sinal de rDNA (B e M), sinal de pSc200 (C e N) e sobreposições do DAPI com a sonda ribossomal (D e O) e com a sonda subtelomérica (E e P). Núcleos de plântulas não tratadas (F a J) e sujeitas a *stress* térmico SAT (Q a U) com marcação DAPI (F e Q), sinal de rDNA (G e R), sinal de pSc200 (H e S) e sobreposições do DAPI com a sonda ribossomal (I e T) e com a sonda subtelomérica (J e U). (barra 5µm).

Através da análise das imagens de núcleos de ápices radiculares foi possível verificar que em quase todos os núcleos de plântulas não tratadas (95,2%) as zonas heterocromáticas - zonas com marcação DAPI-positiva - co-localizam-se com as marcações da sonda subtelomérica pSc200. Esta correlação não é tão evidente em núcleos sujeitos a SAT, uma vez que estes núcleos apresentam uma maior homogeneidade da morfologia da cromatina, sendo menor o número de núcleos com os domínios heterocromáticos bem definidos (50,94%). Ainda assim, os blocos DAPI-positivos, quando existentes, co-localizam-se com marcações da sonda subtelomérica na maioria dos núcleos observados.

Verificou-se ainda que cerca de metade dos núcleos provenientes de células de coleóptilo de plântulas não tratadas (44,23%) apresentam um padrão de DAPI homogêneo sem zonas heterocromáticas bem definidas. No entanto, quando existem blocos DAPI-positivos (55,77%) estes co-localizam-se com as zonas marcadas pela sonda subtelomérica. Nos núcleos de plântulas sujeitas a SAT esta proporção é diferente, sendo que a maioria dos núcleos (79,31%) apresenta domínios heterocromáticos coincidentes com as marcações da sonda subtelomérica, enquanto apenas 20,69% dos núcleos apresenta um aspecto homogêneo da cromatina sem blocos DAPI-positivos bem definidos.

Por outro lado, comparando núcleos de células de ápices radiculares e de coleóptilos provenientes de plântulas sem tratamento verifica-se que os blocos subteloméricos que apresentam uma maior dimensão no coleóptilo do que nas células meristemáticas associada a uma redução do seu número. Também os blocos ribossomais apresentam uma maior dimensão em núcleos de coleóptilo mas sem influência no seu número.

A observação dos núcleos interfásicos apresentados na Figura 4 permite verificar que os sinais resultantes da hibridação com a sonda ribossomal (B e M) ou com a sonda subtelomérica pSc200 (C e N) apresentam uma morfologia mais descondensada em núcleos de ápices radiculares de plântulas sujeitas a SAT do que nos provenientes de plântulas não tratadas.

## Avaliação quantitativa de distintos parâmetros da topologia nuclear

Considerando-se necessário quantificar de um modo rigoroso as alterações morfológicas anteriormente descritas, procedeu-se seguidamente à quantificação de áreas e número de sinais de hibridação utilizando o software ImageJ, como referido na secção Materiais e Métodos. Os resultados, obtidos a partir da análise de pelo menos três plântulas diferentes, estão sumarizados nas Tabelas 2 a 4. Os valores apresentados correspondem à média, e respectivo desvio padrão, dos valores obtidos para os diferentes parâmetros avaliados: AN - área nuclear (quantificação do sinal da coloração DAPI); N e A – número e área total de sinais da hibridação obtidos com cada sonda.

### Sequência subtelomérica pSc200

Na tabela 2 estão sumarizados os valores médios dos sinais de hibridação com a sonda subtelomérica pSc200 e os valores das áreas abrangidas pelos referidos sinais

**Tabela 2.** Valores médios das áreas nucleares (AN), números (N) e áreas de sinais de hibridação (A) e razão entre a área de sinais de hibridação e a área nuclear (A/AN) da sequência subtelomérica pSc200 em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas e tratadas com SAT.

		AN ( $\mu\text{m}^2$ )	N	A ( $\mu\text{m}^2$ )	A/AN	Nº total de núcleos analizados
Controlo	Ápices radiculares	154,29 $\pm 49,26$	14,63 $\pm 4,05$	30,29 $\pm 10,72$	0,20 $\pm 0,07$	41
	Coleótilos	114,44 $\pm 77,64$	9,88 $\pm 5,69$	26,72 8,82	0,26 0,08	51
SAT	Ápices radiculares	145,49 $\pm 44,76$	14,66 $\pm 6,16$	36,04 $\pm 15,60$	0,25 $\pm 0,08$	53
	Coleótilos	156,85 $\pm 54,45$	16,02 $\pm 7,37$	29,44 10,33	0,19 0,06	58

Os núcleos de ápices radiculares controlo apresentam um valor médio de área nuclear de  $154,29 \mu\text{m}^2$ , sendo de  $114,44 \mu\text{m}^2$  em núcleos de coleótilos. A análise comparativa destes valores utilizando o teste *t-students* revela uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ).

Em plântulas submetidas a *stress* térmico, o valor médio da área nuclear nas células meristemáticas é inferior ( $145,49 \mu\text{m}^2$ ) ao observado em plântulas sem tratamento, embora essa diferença não seja significativa. Nos núcleos de coleótilo das plântulas tratadas

verifica-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) do valor médio da área nuclear ( $156,85 \mu\text{m}^2$ ) em relação aos núcleos de plântulas não tratadas ( $114,44 \mu\text{m}^2$ ).

Em núcleos de ápices radiculares e coleótilos controlo a sequência subtelomérica apresenta um número médio de 14,63 e 9,88 blocos, com sinais de hibridação a ocupar a área de  $30,29 \mu\text{m}^2$  e  $26,72 \mu\text{m}^2$ , respectivamente. A análise comparativa destes valores revela diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) no número de sinais de FISH embora o valor médio da área global da marcação desta sonda não apresente alterações significativas. No entanto, quando comparados os valores médios da razão entre a área de sinais de *in situ* e a área nuclear em coleótilo (0,26) e em raiz (0,20) verifica-se que a diferença observada é significativa ( $p < 0,01$ ).

A sequência subtelomérica em núcleos de ápices radiculares de plântulas sujeitas a SAT apresenta um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da área total média ( $36,04 \mu\text{m}^2$ ) em relação ao controlo ( $30,29 \mu\text{m}^2$ ), não sendo alterado o número médio de sinais (14,63 em núcleos de plântulas não tratadas e 14,66 em núcleos de plântulas sujeitas a SAT). Observa-se igualmente uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os valores das razões entre o valor médio da área de sinais de *in situ* e o valor médio da área nuclear, correspondente a um aumento de 0,20 para 0,25.

Contrariamente ao que ocorre em núcleos de ápices radiculares, em núcleos de coleótilos as diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) verificam-se ao nível do número de sinais de hibridação, que aumentam de 9,88 em núcleos de plântulas não tratadas para 16,02 em núcleos de plântulas sujeitas a SAT. Quanto aos valores médios das áreas ocupadas pelos sinais desta sequência subtelomérica, apesar de se detectar um aumento de  $26,72 \mu\text{m}^2$  em núcleos de plântulas não tratadas para  $29,44 \mu\text{m}^2$  em núcleos de plântulas submetidas a *stress* térmico, esta diferença não é significativa. Em núcleos de coleótilos também se verificam alterações significativas ( $p < 0,01$ ) nas razões entre os valores médios das áreas das marcações da sonda pSc200 e o valor médio da área dos núcleos, correspondentes a um decréscimo de 0,26 em núcleos de plântulas não tratadas para 0,19 em núcleos de plantas sujeitas a SAT.

Por outro lado, a análise comparativa entre núcleos de ápices radiculares e de coleótilo de plântulas sujeitas a SAT, apenas revela diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) relativamente à área total dos sinais de hibridação, que é maior em núcleos de ápices radiculares SAT ( $36,04 \mu\text{m}^2$ ) do que em núcleos de coleótilo SAT ( $29,44 \mu\text{m}^2$ ).

Globalmente podemos verificar que o *stress* de alta temperatura afecta de modo diferente a organização e disposição nucleares da sequência pSc200 em núcleos de raiz e

de coleóptilo. Enquanto nas células meristemáticas este efeito se observa ao nível da área dos sinais de hibridação, nas células de coleóptilo é alterado o número de sinais.

### Sequência ribossomal rDNA 45S

Na tabela 3 apresentam-se os valores médios relativos às áreas e número de sinais de hibridação referentes à sequência ribossomal.

**Tabela 3.** Valores médios das áreas nucleares (AN), números (N) e áreas de sinais de hibridação (A) e razão entre a área de sinais de hibridação e a área nuclear (A/AN) da sequência ribossomal 45S em núcleos de ápices radiculares e coleóptilos de plântulas não tratadas e tratadas com SAT.

		AN ( $\mu\text{m}^2$ )	N	A ( $\mu\text{m}^2$ )	A/AN	Nº total de núcleos analisados
<b>Controlo</b>	<b>Ápices radiculares</b>	154,29 $\pm 49,26$	2,17 $\pm 0,54$	2,04 $\pm 1,00$	0,014 $\pm 0,007$	41
	<b>Coleóptilos</b>	114,44 $\pm 77,64$	2,08 $\pm 0,34$	2,42 $\pm 0,77$	0,025 $\pm 0,01$	51
<b>SAT</b>	<b>Ápices radiculares</b>	145,49 $\pm 44,76$	2,32 $\pm 1,05$	3,10 $\pm 1,36$	0,022 $\pm 0,008$	53
	<b>Coleóptilos</b>	156,85 $\pm 54,45$	2,35 $\pm 1,47$	2,85 $\pm 0,93$	0,020 $\pm 0,008$	58

Em núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratadas a sequência ribossomal apresenta um número médio de blocos de 2,17 ocupando a área total de 2,04  $\mu\text{m}^2$ . Em núcleos de coleóptilos o número médio de blocos ribossomais é 2,08 sendo o valor médio da área total de 2,42  $\mu\text{m}^2$ . Verifica-se que o valor médio da área total de rDNA é significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em núcleos de coleóptilo, apesar do número de blocos ser semelhante entre os núcleos destes dois órgãos.

O SAT induz um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da área dos sinais da sequência ribossomal em núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratadas, 2,04  $\mu\text{m}^2$ , em relação a plântulas tratadas com SAT, 3,10  $\mu\text{m}^2$ . O número de blocos não apresenta diferenças significativas, sendo 2,17 e 2,32 em plântulas tratadas e não tratadas, respectivamente. Quanto aos valores das razões entre a área ribossomal e a área nuclear, observa-se um aumento de 0,014 em núcleos de plântulas não tratadas para 0,022 em núcleos de plântulas sujeitas a SAT.

Também em núcleos de coleóptilos o SAT induz um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da área total dos sinais da rDNA, de 2,42  $\mu\text{m}^2$  em núcleos de plântulas não tratadas para 2,85

$\mu\text{m}^2$  em núcleos de plântulas sujeitas a SAT. Em relação ao número de sinais de hibridação, observam-se 2,08 em núcleos de plântulas não sujeitas a SAT e 2,35 em plântulas sujeitas a SAT, valores que no entanto não apresentam diferenças significativas. De igual modo verifica-se uma alteração significativa ( $p < 0,01$ ) nas razões entre as áreas totais das marcações obtidas com sonda ribossomal e a área nuclear, correspondente a um decréscimo de 0,025 em núcleos de plântulas controlo para 0,020 em núcleos de plântulas sujeitas a SAT.

As distâncias entre os dois maiores blocos ribossomais observados nos núcleos analisados foram igualmente calculadas tanto em plântulas tratadas como em plântulas não tratadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Disposição de sinais de hibridação de rDNA em núcleos interfásicos de ápices radiculares e coleóptilos de plântulas não tratadas e sujeitas a SAT.

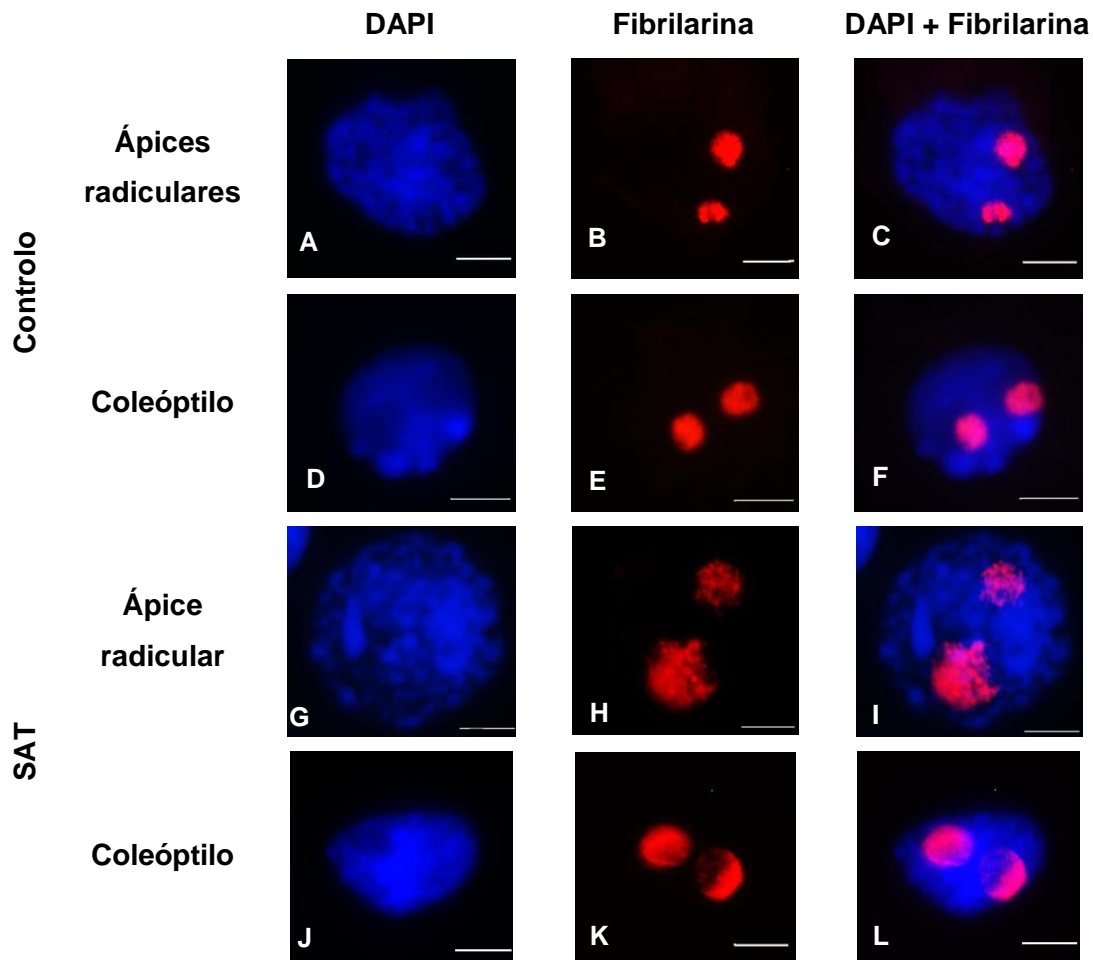
		<b>Distância entre sinais (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Nº de núcleos com sinais co-localizados</b>	<b>Nº total de núcleos analisados</b>
<b>Controlo</b>	<b>Ápice radicular</b>	6,36 $\pm 2,56$	1	41
	<b>Coleóptilos</b>	4,42 $\pm 2,30$	1	51
<b>SAT</b>	<b>Ápice radicular</b>	5,67 $\pm 1,75$	0	53
	<b>Coleóptilo</b>	5,14 $\pm 3,08$	4	58

Em núcleos de ápices radiculares essa distância é de 6,36  $\mu\text{m}$  e de 4,42  $\mu\text{m}$  em coleóptilo, resultados que revelam uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ). No entanto o número de núcleos onde foram detectados sinais de rDNA co-localizados é igual nos dois casos.

Entre núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratadas e de plântulas sujeitas a SAT estes valores não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,1$ ), ainda que a distância observada em núcleos de plântulas controlo seja ligeiramente superior (6,36  $\mu\text{m}$ ) que à detectada em núcleos de plântulas sujeitas a *stress* (5,67  $\mu\text{m}$ ). O mesmo se verifica em núcleos de coleóptilos – onde não se verificam diferenças significativas entre plântulas tratadas e não tratadas, apesar de esse valor ser mais elevado em núcleos de plântulas sujeitas a SAT (5,14  $\mu\text{m}$ ) do que em núcleos de plântulas não sujeitas a SAT (4,42  $\mu\text{m}$ ). Neste caso verifica-se que o SAT induz um aumento do número de núcleos com sinais de rDNA co-localizados (de 1 para 4).

## Efeitos do stress térmico na dinâmica nucleolar em núcleos de ápices radiculares e coleótilos de centeio

Utilizando a imunodeteção *in situ* da proteína nucleolar fibrilarina em núcleos proveniente de ápices radiculares e coleótilo de plântulas controle ou sujeitos a *stress* de alta temperatura (SAT) analisou-se a dinâmica nucleolar (Figura 2).



**Figura 6.** Núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas (A a F) e tratadas com SAT (G a L) com marcação para a proteína nucleolar fibrilarina. Barra com 5  $\mu$ m.

Foram observados núcleos de centeio apresentando dois nucléolos (Figura 5), antes de ter ocorrido a fusão nucleolar, que conduz a observação de núcleos com apenas um nucléolo. Em todas as células interfásicas de plântulas não tratadas os nucléolos observados apresentam uma configuração arredondada e de contornos geralmente bem definidos. A marcação para a fibrilarina que se observa nas figuras 5B e 5E comprova esse padrão para núcleos de ápices radiculares e coleótilos de plântulas não tratadas.

Os nucléolos de núcleos de ápices radiculares de plântulas sujeitas a SAT (figuras 5H e 5I) em comparação com os observados em plântulas não tratadas (figuras 5B e 5C) apresentam uma dimensão maior, contorno irregular e um aspecto mais granulado em núcleos sujeitos a SAT quando comparados com os de controlo.

Também se verificou um aumento da dimensão nucleolar e um aspecto mais granulado em núcleos provenientes de coleóptilos de plântulas tratadas com SAT (Figuras 5K e 5L), em relação aos núcleos de plântulas não tratadas (Figuras 5E e 5F).

Pretendendo-se uma análise quantitativa dos efeitos do SAT na dinâmica nucleolar procedeu-se à quantificação da área utilizando o software ImageJ e à contagem de núcleos apresentando diferentes números de nucléolos, apresentando-se os resultados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Áreas nucleolares e frequência de núcleos apresentando diferente número de nucléolos em células de ápices radiculares e de coleóptilo provenientes de plântulas não tratadas e tratadas com SAT.

		Área nucleolar ( $\mu\text{m}^2$ )	% de núcleos com diferente número de nucléolos	
			1	2
Controlo	Ápices radiculares	43,19 (56)	78,8% (268)	21,2% (72)
	Coleóptilos	15,50 (60)	81,0% (145)	19,0% (34)
SAT	Ápices radiculares	62,32 (62)	62,5% (130)	37,5% (78)
	Coleóptilos	33,37 (76)	73,3% (326)	26,7% (119)

Nota: os valores entre parênteses representam o número total de núcleos analisados para cada situação.

A comparação dos resultados obtidos utilizando o teste t-students revelou uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre as áreas nucleolares observadas em núcleos de ápice radicular ( $43,19 \mu\text{m}^2$ ) e em núcleos de coleóptilo ( $15,50 \mu\text{m}^2$ ) relativamente ao valor obtido.

A análise de núcleos de ápices radiculares de plântulas sujeitas a SAT revelou um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) do valor médio da área nucleolar de  $43,19 \mu\text{m}^2$  em plântulas não tratadas para  $62,32 \mu\text{m}^2$  em plântulas tratadas com SAT. Do mesmo modo, em núcleos de coleóptilos os nucléolos aumentam significativamente ( $p < 0,01$ ) de dimensão quando as plântulas são sujeitas a SAT ( $15,50 \mu\text{m}^2$  em controlo e  $33,37 \mu\text{m}^2$  em SAT).

Por outro lado, procedeu-se à contagem do número de núcleos apresentando um ou dois nucléolos, tendo sido as respectivas distribuições de frequências comparadas utilizando o Teste  $\chi^2$ .

Relativamente às distribuições de frequências de núcleos com diferentes números de nucléolos obtidas para os dois órgãos analisados de plântulas não tratadas não foram obtidas diferenças significativas, apesar da ligeira superioridade de núcleos com um nucléolo no caso do coleóptilo (81%) em relação ao valor obtido em ápices radiculares (78,8%).

Em ápices radiculares de plântulas não tratadas a frequência de núcleos com 2 nucléolos é de 21,2%, enquanto em ápices sujeitos a SAT essa classe aumenta para 37,5%, o que corresponde a um aumento significativo ( $p < 0,01$ ). Também em núcleos de coleóptilos se observa um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na frequência de núcleos com dois nucléolos na situação de *stress* térmico, 26,7%, em relação à situação sem tratamento, 19,0%.

Os resultados obtidos permitiram verificar um efeito curioso. A maioria das diferenças significativas observadas nos parâmetros avaliados detectadas entre núcleos de ápices radiculares e coleóptilos de plântulas não tratadas deixam de existir ao compararmos com núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratada com coleóptilos de plantas sujeitas a SAT. A análise comparativa dos valores médios de áreas nucleares de ápices radiculares ( $154,29 \mu\text{m}^2$ ) com núcleos de coleóptilos de plântulas sujeitas a SAT ( $156,85 \mu\text{m}^2$ ), não revelam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ). De igual modo, não são detectadas diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) na conformação interfásica da sequência subtelomérica, apesar do aumento do número de sinais (de 14,63 em ápices radiculares para 16,02 em coleóptilo SAT) e da diminuição da área dos sinais (de  $30,29 \mu\text{m}^2$  em ápices radiculares para  $29,44 \mu\text{m}^2$  em coleóptilo SAT). Os resultados obtidos para a sequência ribossomal apenas revelam diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) na área total dos sinais de hibridação, que é inferior em ápices radiculares ( $2,04 \mu\text{m}^2$ ) comparativamente a coleóptilos sujeitos a SAT ( $2,85 \mu\text{m}^2$ ). Esta diferença reflecte-se nas razões entre área dos blocos ribossomais e a nuclear, que apresentam uma diferença significativa ( $p < 0,01$ ), sendo essa razão maior em coleóptilos (0,020) do que em ápices radiculares (0,014). A disposição dos sinais de rDNA também não apresenta diferenças significativas ( $p < 0,01$ ).

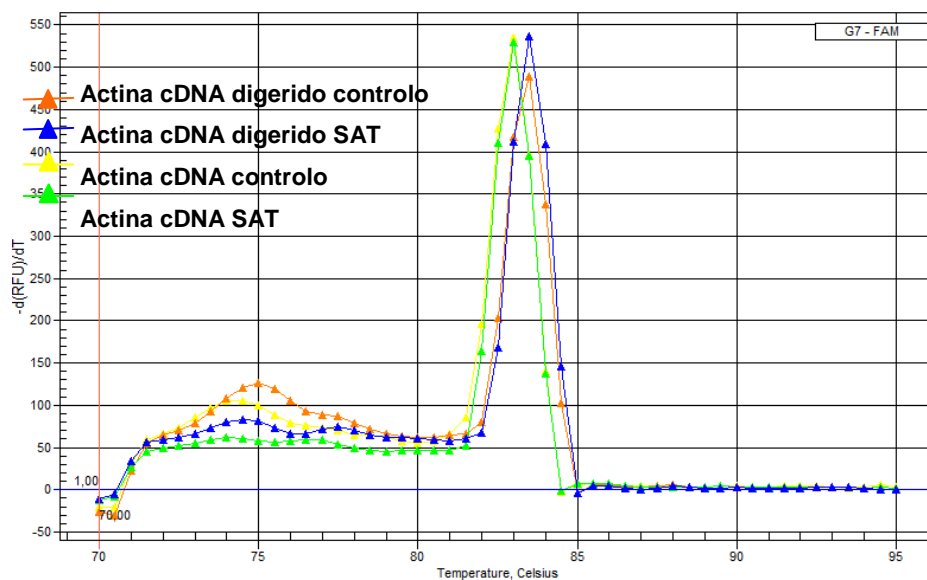
O mesmo se verifica em relação à análise de nucléolos, uma semelhança entre os valores obtidos em núcleos de ápices radiculares de plântulas não tratadas e de coleóptilo de plântulas sujeitas à situação de *stress* térmico. Os valores médios das áreas nucleolares não apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo o valor para os núcleos de ápices

radiculares ligeiramente superior ( $43,19\mu\text{m}^2$ ) ao obtido em coleóptilo ( $33,37\mu\text{m}^2$ ). Também relativamente ao número de nucléolos, a comparação não resulta em diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quanto à distribuição de frequências de núcleos com diferente número de nucléolos.

## Alteração dos níveis de transcrição das sequências repetitivas rDNA e pSc200 em plântulas de centeio sujeitas a *stress* térmico

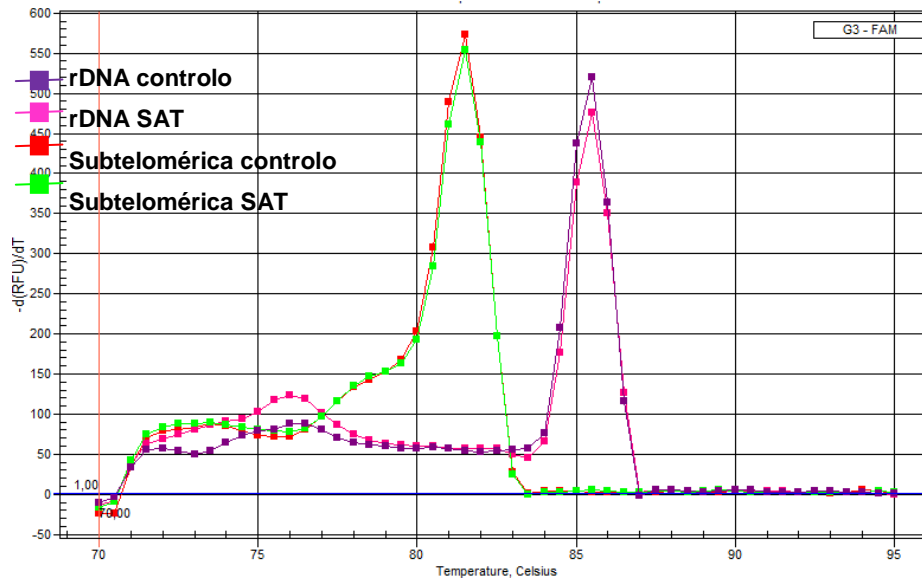
Tendo como objectivo avaliar o efeito de *stress* de alta temperatura (SAT) nos níveis de transcrição de sequências repetitivas procedeu-se à análise dos níveis de transcrição das sequências de rDNA e repetitiva subtelomérica pSc200 através de PCR quantitativo em tempo real.

A quantificação de transcritos da sequência pSc200 foi realizada a partir de cDNA digerido com a enzima de restrição *Bfal*, de modo a obter um único produto de amplificação, utilizando como controlo a actividade do gene da actina. As curvas de desnaturação (*melting curves*) foram comparadas entre cDNA digerido e não digerido com a referida enzima de restrição, tendo como objectivo confirmar que esta enzima não digere a sequência do gene da actina. Uma vez que as curvas obtidas são semelhantes (Gráfico 1), o gene da actina foi utilizado como controlo nas duas situações descritas.



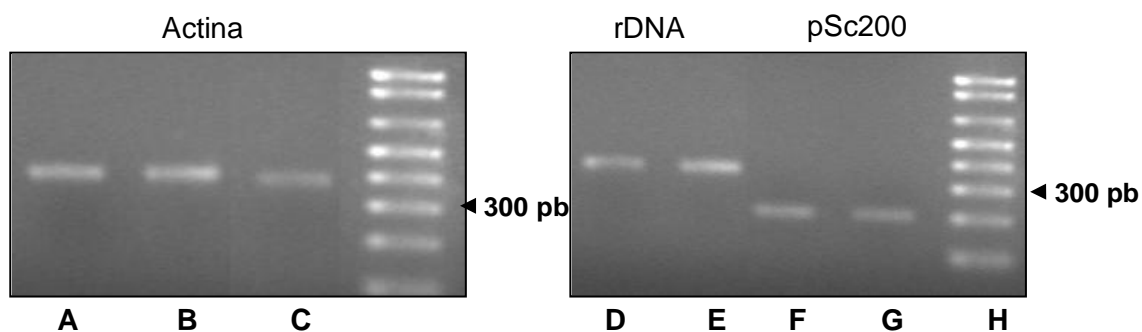
**Gráfico 1:** Curvas de desnaturação obtidas utilizando *primers* específicos para a sequência do gene de actina a partir de cDNA de indivíduos não tratados (laranja e amarelo) ou tratados com SAT (azul e verde). As curvas verde e amarelo resultam da amplificação de cDNA sem restrição e as curvas azul e laranja resultam de cDNA digerido com a enzima *Bfal*, como descrito nos materiais e métodos.

As curvas de desnaturação obtidas por amplificação de cDNA de plantas não tratadas e tratadas com SAT utilizando *primers* específicos para rDNA de centeio e para a sequência subtelomérica pSc200 são apresentadas no Gráfico 6 e revelam um único produto de PCR em todos os casos.



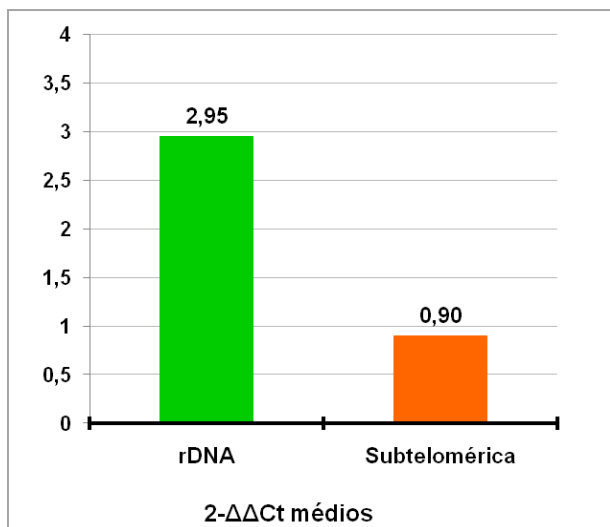
**Gráfico 2:** Curvas de desnaturação de cDNA de indivíduos não tratados (roxo e vermelho) ou sujeitos a SAT (rosa e verde). As curvas verde e vermelha resultam da amplificação de cDNA com *primers* específicos para o rDNA de centeio, e as curvas azul, rosa e roxa resultam de cDNA amplificado com *primers* específicos para a sequência subtelomérica. A obtenção de uma única curva de *melting* prova a amplificação de um único produto de PCR em todos os casos.

Os produtos de PCR quantitativo em tempo real resultantes da amplificação com *primers* específicos para as sequências de actina, rDNA e sequência subtelomérica, a partir de cDNA de plantas não tratadas ou submetidas a SAT, foram seguidamente separados por electroforese em gel de agarose (Figura 6). A análise dos produtos de amplificação confirma a existência de fragmentos de DNA com números de pares de bases compatíveis com os valores expectáveis.



**Figura 7:** Produtos de PCR quantitativo em tempo real individualizados por electroforese em gel de agarose (1% m/v), obtidos a partir de cDNA de plantas controlo (A, C, D e F), ou sujeitas a SAT (B, E e G). Produtos amplificados com *primers* específicos para a sequência de actina (A, B e C) e posteriormente submetidos à digestão enzimática com *Bfal* (C). Produtos resultantes da amplificação com *primers* para a sequência de rDNA (D e E) e *primers* para a sequência subtelomérica (F e G). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1Kb<sup>+</sup> sendo indicada à direita a banda correspondente a 300 pb.

Através dos resultados de PCR quantitativo em tempo real é possível avaliar nas plantas tratadas alterações ao nível da transcrição induzidas pelo SAT, comparativamente às plantas não tratadas calibrando ambas as situações com valores do gene referência. Assim, com os resultados obtidos para o gene da actina a partir das duas diluições utilizadas (1:10 e 1:20) foi obtido um valor médio do ciclo limite (*threshold cycle*, Ct) para a situação controlo e para a situação de *stress* (Ct = 27,484, Ct = 27,791, respectivamente). A análise estatística efectuada, utilizando o Teste *t-student*, não revela diferenças significativas ( $p = 0,21$ ) entre os valores do Ct obtidos para o gene da actina na situação controlo e SAT, confirmando que este gene constitui um controlo válido para a análise dos níveis de transcritos realizada. Com estes valores foram calculados os  $\Delta Ct$  para a sequência ribossomal e subtelomérica nas situações controlo e *stress* (sumarizados na Tabela 6 do Anexo I) para todas as diluições e foi calculado um valor médio dos  $\Delta Ct$  das situações controlo da sequência ribossomal (1:10: -4,224, 1:20: -2,548) e da sequência subtelomérica (1:20: 0,178, 1:100: 0,0974, 1:200: -0,416). Os valores médios de  $\Delta Ct$  obtidos para as situações controlo foram utilizados para calcular os valores de  $\Delta\Delta Ct$  de todas as repetições e diluições efectuadas para a situação SAT, tendo sido por último calculado o valor correspondente à alteração nos níveis de transcrição obtido na situação de *stress* ( $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Alteração nos níveis de transcrição (*fold change*), das sequências ribossomal e subtelomérica em plântulas tratadas com SAT relativamente a plântulas não tratadas.

Os valores médios de alteração nos níveis de transcrição, apresentados no Gráfico 3, revelam um claro aumento na expressão dos genes ribossomais correspondente a  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2,95$ . Relativamente à sequência subtelomérica pSc200 não é observada uma alteração tão marcada correspondendo a diferença no nível de transcrição a  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,90$ . Os valores médios de  $\Delta Ct$  para a situação controlo e SAT obtidos para as duas sequências foram comparados através de um teste *T de student* confirmando a existência de uma diferença significativa para a sequência ribossomal ( $p=0,039$ ) e a ausência de alteração significativa para a sequência subtelomérica ( $p=0,07$ ).

## Discussão

Os efeitos de *stresses* abióticos nas plantas têm vindo a ser estudados ao nível da modulação epigenética da expressão génica e regulação fisiológica, (Chinnusamy and Zhu, 2009; Hirayama and Shinozaki, 2010; Kim et al., 2010; Kotak et al., 2007). No entanto, pouco se sabe relativamente aos seus efeitos nos padrões de organização da cromatina e transcrição de sequências repetitivas. O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar, em centeio (*Secale cereale*), as alterações induzidas pelo *stress* de alta temperatura em diferentes parâmetros da topologia nuclear, nomeadamente a organização da cromatina de sequências repetitivas não codificantes (subtelomérica pSc200) e codificantes (rDNA 45S), bem como a morfologia e área nucleolares. Esta análise foi efectuada em núcleos interfásicos de diferentes órgãos - raiz e coleóptilo - de plântulas de centeio mantidas em situação controlo (22°C) ou submetidas a *stress* de alta temperatura (SAT, 4h a 40°C), utilizando hibridação *in situ* e imunocitoquímica, respectivamente. Foi igualmente efectuado o estudo comparativo dos padrões de transcrição das referidas sequências em plântulas de centeio com uma folha expandida sem tratamento e submetidas a *stress* térmico, utilizando PCR quantitativo em tempo real.

Núcleos de ápices radiculares e coleóptilos de plântulas não tratadas apresentam diferenças na sua morfologia. Verifica-se através da coloração por DAPI um valor médio de área nuclear significativamente inferior em núcleos de coleóptilos, facto que poderá estar relacionado com uma maior compactação da cromatina de todo o núcleo em células de coleóptilos. Adicionalmente, foi observado um menor número de domínios heterocromáticos DAPI-positivos em núcleos de coleóptilo, resultado similar ao descritos por (Tessadori et al., 2007a) que detectaram, através da análise comparativa da conformação da cromatina em protoplastos e células de mesófilo foliar mantidas em cultura de *A. thaliana*, uma alteração no número de cromocentros DAPI-positivos observados.

Os resultados observados permitiram ainda identificar diferenças em termos de organização das sequências repetitivas analisadas entre diferentes órgãos no desenvolvimento inicial da planta. De facto, os núcleos de ápices radiculares apresentam diferenças significativas, comparativamente com os núcleos de coleóptilo, em termos de área de sinais de *in situ* de rDNA e número de sinais de pSc200. Em núcleos de coleóptilo verifica-se que os blocos ribossomais apresentam uma maior área e um menor número de blocos subteloméricos pSc200. Também por comparação entre núcleos de diferentes órgãos da mesma planta (Pontes et al., 2007), observaram em *A. suécica* uma diferença na organização dos blocos ribossomais provenientes da *A. thaliana* que apresentam um aspecto mais descondensado em núcleos interfásicos de cotilédones, comparativamente

com o detectado em núcleos de ápices radiculares de plântulas com 4 dias, diferenças que não foram detectadas relativamente aos cromocentros.

No que diz respeito ao efeito do *stress* de alta temperatura na organização da cromatina, os resultados obtidos em ápices radiculares demonstraram a indução de diferenças significativas na organização das sequências ribossomal e subtelomérica pSc200, com o aumento da área de sinais de hibridação de ambas, não sendo no entanto a área nuclear afectada. Em núcleos de coleóptilo, por outro lado, o *stress* de alta temperatura induz igualmente a descondensação das sequências ribossomais, aumentando no entanto marcadamente tanto o número de sinais de pSc200 como a área nuclear. Assim, os mecanismos de resposta ao *stress* parecem induzir nos dois tipos de núcleos analisados uma alteração marcante orientada para uma maior disponibilidade física para a transcrição das sequências ribossomais. (Leitch, 1995) utilizando a técnica de hibridação *in situ* genómica com sondas para o genoma de centeio em núcleos de ápices radiculares da cultivar Beaver de trigo com a translocação 1B<sup>L</sup>/1R<sup>S</sup>, observou igualmente um incremento na descondensação da cromatina de centeio, avaliada pelo comprimento do braço 1R<sup>S</sup>, assim como um maior número de *loci* de rDNA descondensados, após um aumento de temperatura de 25°C para 37°C. O mesmo autor (Leitch, 1995) sugere que a descondensação da cromatina observada poderá estar relacionada com um possível aumento do número de genes activos ou alterações no estado de metilação devidos à temperatura.

Uma característica bem definida de núcleos de algumas espécies de cereais com genomas de grandes dimensões, como o centeio, é a organização Rabl (Rabl, 1885). Esta organização foi inicialmente descrita em núcleos de salamandra e caracteriza-se pela disposição dos cromossomas no núcleo de uma forma polarizada. Esta organização resulta da manutenção em interfase do posicionamento estabelecido aquando da separação dos cromossomas para os pólos em anafase, mediada pela ligação do cinetócoro aos microtúbulos do fuso acromático. Assim os centrómeros permanecem agrupados num pólo e os telómeros no pólo oposto. Este padrão de organização é observado em núcleos dos dois órgãos analisados das plântulas de centeio, confirmando a disposição cromossómica interfásica anteriormente descrita para esta espécie (AragonAlcaide et al., 1996). Em núcleos de ápices radiculares tanto controlo como submetidos a SAT, o número médio de sinais de pSc200 confirma a disposição cromossómica descrita. Possuindo o centeio tem 14 cromossomas, cada um com duas zonas subteloméricas marcadas pela sonda pSc200 (Vershinin et al., 1995), seria expectável a observação de 28 sinais de hibridação. No entanto, a observação de um número médio de 14 sinais de hibridação com esta sonda confirma a organização Rabl que resulta na sobreposição dos dois sinais de FISH subteloméricos de cada cromossoma descrita por (Abranches et al., 1998). Estes autores

demonstram que os braços do cromossoma 1R de centeio se encontram paralelos entre si, e em alguns casos sobrepostos, tornando-se indistinguíveis. Em núcleos coleóptilo de plântulas não tratadas, apesar de ter sido detectada uma diminuição no número de sinais *in situ* de pSc200, essa diminuição pode resultar simplesmente da sua maior aglomeração resultante da consideravelmente menor área nuclear, não sendo afectada a organização Rab1. Também em núcleos de *Schizosaccharomyces pombe* se verifica uma reorganização de domínios heterocromáticos influenciada pelo aumento da temperatura (Goto et al., 2001). Neste caso verifica-se uma migração dos domínios centroméricos para o *spindle pole body* (SPB, correspondente ao centrossoma em células animais) formando um aglomerado, não observado em nenhuma das células controlo. Por outro lado os telómeros separam-se do SPB, espalhando-se pelo núcleo o que origina uma estrutura tipo Rab1.

Ou seja, ao contrário do que se verifica relativamente à organização física da cromatina ribossomal e subtelomérica, a disposição Rab1 dos cromossomas no núcleo é observada em núcleos dos dois órgãos analisados, apesar de apresentarem diferenças significativas relativamente à condensação global do núcleo. Também (Abranches et al., 1998) verificam que o padrão de organização Rab1 dos cromossomas de centeio se mantém independentemente da dimensão do núcleo. Mais ainda, a disposição dos cromossomas no núcleo não é afectada pelo stress de alta temperatura nem em núcleos de ápices radiculares nem de coleóptilos.

Em relação à topologia nuclear avaliou-se também a disposição relativa dos dois *loci* de rDNA 45S. Este parâmetro não parece ser afectado pelo SAT nos dois tipos de núcleos analisados, uma vez que não se observam diferenças significativas nos valores da distância média entre os sinais de FISH obtidos com a sonda de rDNA. Da mesma forma, o número médio de dois blocos de rDNA por núcleo também não é afectado pelo SAT nos dois tipos de núcleos analisados. De facto, tendo em conta os diferentes padrões de organização descritos por (Caperta et al., 2002) em células de ápices radiculares de centeio, o número médio de sinais de rDNA expectável seria de 2, uma vez que os referidos autores comprovaram que a maioria dos núcleos apresentam um bloco por NOR localizado na zona perinucleolar. Adicionalmente, a frequência de núcleos em que é possível encontrar sinais de FISH de rDNA co-localizados é reduzida e muito próxima da anteriormente estimada em centeio por (Caperta et al., 2002), não sendo também afectada pela situação de *stress* estudada.

O nucléolo é formado como resultado da transcrição dos genes ribossomais, sendo a sua dimensão influenciada pelo número de genes de rRNA activos, entre outros factores (Caperta et al., 2007; Martini and Flavell, 1985). A quantificação da área nucleolar efectuada neste trabalho revelou diferenças significativas induzidas pelo SAT quer em células de ápices radiculares, quer em células de coleóptilo. De facto, núcleos de ápices radiculares e

coleóptilos de plântulas sujeitas a SAT apresentam nucléolos de maiores dimensões comparativamente com os valores obtidos em plântulas controlo. (Stepinski, 2009) verifica que o *stress* de baixa temperatura induz um aumento da área nucleolar em núcleos de soja. No entanto, este aumento pode não se dever a um aumento de expressão, uma vez que (Olszewska et al., 1988) demonstram que tratamentos com frio (4°C) em células de ápices radiculares de centeio inibem o transporte de rRNA do núcleo para o citoplasma, o que poderá conduzir a uma acumulação da componente granular dos nucléolos e resultar num aumento do tamanho do nucléolo. O efeito de condições de *stress* na morfologia e área de nucléolos foi também recentemente descrito por (Balcerzak et al., 2010) que detectaram que plantas de *Lupinus angustifolius* L. sujeitas a *stress* induzido pela presença de nitrato de chumbo alterações na morfologia e no número de nucléolos. Na presença do referido metal pesado deixam de se observar apenas nucléolos redondos, aparecendo nucléolos em forma de anel e de fuso, diminuindo igualmente a área e número de nucléolos. Por outro lado, observamos também um aumento do número de nucléolos em situação de *stress*, tanto em células de ápices radiculares como de coleóptilos, revelado por um aumento significativo da frequência de células com dois nucléolos. Este aumento do número de células com dois nucléolos poderá dever-se ao facto de o *stress* de alta temperatura bloquear a progressão do ciclo celular na fase G1, diminuindo a ocorrência de núcleos com apenas um nucléolo resultante da fusão nucleolar. (Leitch, 1995) observou igualmente em núcleos de ápices radiculares da cultivar Beaver de trigo (1B<sup>L</sup>/1R<sup>S</sup>) um aumento do número de nucléolos resultante do aumento da temperatura (de 25°C para 37°C) tal como o observado no nosso trabalho.

O referido aumento da área nucleolar, directamente proporcional ao nível de expressão dos genes ribossomais, resultante do efeito do *stress* parece estar de facto correlacionado com o nível de expressão da sequência ribossomal em plantas controlo e sujeitas a SAT. De facto, os resultados da quantificação dos níveis de transcritos de rDNA na primeira folha de plântulas de centeio obtidos por PCR quantitativo em tempo real demonstram claramente a ocorrência de um claro aumento do nível de expressão dos genes de rRNA induzido pela alta temperatura. A actividade da sequência subtelomérica de centeio pSc200 também foi analisada, tendo sido demonstrado pela 1ª vez que esta sequência não codificante é transcrita. No entanto, contrariamente ao detectado relativamente à sequência ribossomal, não são observadas alterações significativas relativamente ao nível de transcrição induzidas pelo *stress* de alta temperatura.

Os resultados descritos neste trabalho permitem-nos concluir que as respostas das plantas ao *stress* de alta temperatura envolvem alterações de diferentes parâmetros da topologia nuclear de sequências repetitivas codificantes e não codificantes, que dependem do órgão considerado, assim como dos níveis de transcrição de genes ribossomais. Tendo

como objectivo aprofundar a compreensão dos referidos mecanismos de resposta das plantas a condições de *stress*, pretendemos futuramente proceder à análise da quantificação do nível de transcritos, em diferentes órgãos, nomeadamente coleótilo e raiz, da sequência subtelomérica pSc200, do rDNA 45S e de outras sequências repetitivas, como por exemplo sequências centroméricas. Por outro lado, seria importante também observar se existem diferenças nos parâmetros avaliados entre outros órgãos da planta em distintas fases do desenvolvimento. Seria ainda interessante observar se existem alterações na organização física e disposição nuclear induzidas pelo SAT de outras sequências repetitivas como a CCS1 (*cereal centromeric sequence*) (AragonAlcaide et al., 1996) do genoma de centeio.

Por último, uma vez que foram anteriormente observadas diferenças entre a disposição Rabl característica dos cromossomas de centeio induzidas pelo tratamento com 5aC (5 azacitidina, um inibidor de metilação do DNA) em núcleos de tritcale (Neves, 1995) mas não em núcleos de trigo com o cromossoma 1R introgrado (Abranches et al., 1998), seria interessante verificar se as sequências de centeio analisadas são de igual modo influenciadas pelo *stress* quando se encontram em núcleos com genomas de outras espécies.

## Referências bibliográficas

- Abranches, R., Beven, A. F., Aragon-Alcaide, L., and Shaw, P. J. (1998). Transcription sites are not correlated with chromosome territories in wheat nuclei. *Journal of Cell Biology* *143*, 5-12.
- Appels, R., Gerlach, W. L., Dennis, E. S., Swift, H., and Peacock, W. J. (1980). Molecular and Chromosomal Organization of DNA-Sequences Coding for the Ribosomal-Rnas in Cereals. *Chromosoma* *78*, 293-311.
- AragonAlcaide, L., Miller, T., Schwarzacher, T., Reader, S., and Moore, G. (1996). A cereal centromeric sequence. *Chromosoma* *105*, 261-268.
- Aufsatz, W., Mette, M. F., Matzke, A. J. M., and Matzke, M. (2004). The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides. *Plant Molecular Biology* *54*, 793-804.
- Balcerzak, L., Glinska, S., and Godlewski, M. (2010). The reaction of *Lupinus angustifolius* L. root meristematic cell nucleoli to lead. *Protoplasma*.
- Bartos, J., Paux, E., Kofler, R., Havrankova, M., Kopecky, D., Suchankova, P., Safar, J., Simkova, H., Town, C. D., Lelley, T., *et al.* (2008). A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *Bmc Plant Biology* *8*, -.
- Bartova, E., Horakova, A. H., Uhlirva, R., Raska, I., Galiova, G., Orlova, D., and Kozubek, S. (2010). Structure and Epigenetics of Nucleoli in Comparison With Non-nucleolar Compartments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* *58*, 391-403.
- Bedbrook, J. R., Jones, J., Odell, M., Thompson, R. D., and Flavell, R. B. (1980). Molecular Description of Telomeric Heterochromatin in *Secale* Species. *Cell* *19*, 545-560.
- Bender, J. (2004). DNA methylation and epigenetics. *Annual Review of Plant Biology* *55*, 41-68.
- Bennett, M. D., and Smith, J. B. (1976). Nuclear-DNA Amounts in Angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* *274*, 227-274.
- Bernstein, N., Shosh, M., Xu, Y., and Huang, B. (2010). Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. *Free Radic Biol Med* *49*, 1161-1171.
- Buchanan, B. G., W.; Jones, R., ed. (2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (American Society of Plant Physiologists).
- Caperta, A. D., Neves, N., Morais-Cecilio, L., Malho, R., and Viegas, W. (2002). Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. *Journal of Cell Science* *115*, 2839-2846.
- Caperta, A. D., Neves, N., Viegas, W., Pikaard, C. S., and Preuss, S. (2007). Relationships between transcription, silver staining, and chromatin organization of nucleolar organizers in *Secale cereale*. *Protoplasma* *232*, 55-59.
- Chen, Z. J., and 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.
- Chinnusamy, V., and Zhu, J. K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* *12*, 133-139.
- Choi, C. S., and Sano, H. (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics* *277*, 589-600.
- Cmarko, D., Verschure, P. J., Rothblum, L. I., Hernandez-Verdun, D., Amalric, F., van Driel, R., and Fakan, S. (2000). Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochemistry and Cell Biology* *113*, 181-187.
- Dong, F. G., and Jiang, J. M. (1998). Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Research* *6*, 551-558.
- Efeoglu, B. (2009). Heat Shock Proteins and Heat Shock Response in Plants. *GU Journal of Science* *22*, 67-75.

Fransz, P., ten Hoopen, R., and Tessadori, F. (2006). Composition and formation of heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* *14*, 71-82.

Fu, W. Q., Wu, K. Q., and Duan, J. (2007). Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *356*, 843-850.

Gazdova, B., Siroky, J., Fajkus, J., Brzobohaty, B., Kenton, A., Parokony, A., Heslop-Harrison, J. S., Palme, K., and Bezdek, M. (1995). Characterization of a New Family of Tobacco Highly Repetitive DNA, Grs, Specific for the *Nicotiana-Tomentosiformis* Genomic Component. *Chromosome Research* *3*, 245-254.

Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science* *112*, 761-772.

Gonzalez-Melendi, P., Wells, B., Beven, A. F., and Shaw, P. J. (2001). Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli. *Plant Journal* *27*, 223-233.

Goto, B., Okazaki, K., and Niwa, O. (2001). Cytoplasmic microtubular system implicated in de novo formation of a Rab1-like orientation of chromosomes in fission yeast. *Journal of Cell Science* *114*, 2427-2435.

Heslop-Harrison, J. S. (2000). Comparative genome organization in plants: From sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* *12*, 617-635.

Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant Journal* *61*, 1041-1052.

Kim, J. M., To, T. K., Nishioka, T., and Seki, M. (2010). Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant Cell and Environment* *33*, 604-611.

Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E., and Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* *10*, 310-316.

Koukalova, B., Reich, J., Matyasek, R., Kuhrova, V., and Bezdek, M. (1989). A BamHI Family of Highly Repeated DNA-Sequences of *Nicotiana-Tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics* *78*, 77-80.

Larkindale, J., and Huang, B. (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology* *161*, 405-413.

Law, J. A., and Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* *11*, 204-220.

Lee, J. Y., and Lee, D. H. (2003). Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiology* *132*, 517-529.

Leitch, A. R., Glyn, M.; Kingham, K.; Quinn, M.; Aragon-Alcaide, L.F.; Somasekaram, A.; Duckett, J. G. (1995). The dynamic organization of interphase nuclei during cell differentiation and with changing cell activity. In *Kew Chromosome Conference IV*, P. E. B. Brandham, M.D., ed. (Royal Botanic Gardens Kew), pp. 83-94.

Leitch, A. R. H.-H., J.S. (1993). Ribosomal RNA gene expression and localization in cereals. In *Chromosomes Today*, pp. 91 -100.

Madlung, A., and Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* *94*, 481-495.

Martini, G., and Flavell, R. (1985). The Control of Nucleolus Volume in Wheat, a Genetic-Study at 3 Developmental Stages. *Heredity* *54*, 111-120.

Mathieu, O., Jasencakova, Z., Vaillant, I., Gendrel, A. V., Colot, V., Schubert, I., and Tourmente, S. (2003). Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *15*, 2929-2939.

Mouradov, A., Cremer, F., and Coupland, G. (2002). Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* *14*, S111-S130.

Neves, N., Castilho, A., Silva, M., Heslop-Harrison, J. S. & Viegas, W. (1995). Genomic interactions: gene expression, DNA methylation and nuclear architecture. In *Chromosomes today*, pp. 182-200.

Neves, N., Delgado, M., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecilio, L., and Viegas, W. (2005). Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenetic and Genome Research* *109*, 104-111.

Neves, W. V. M. S. N. (2007). Epigenetics: the functional memory of ribosomal genes. In *A Portrait of State-of-art Research at the Technical University of Lisbon*, M. S. Pereira, ed. (Springer, Netherlands), pp. 251-257.

Nicol, S. M., Causevic, M., Prescott, A. R., and Fuller-Pace, F. V. (2000). The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase. *Experimental Cell Research* *257*, 272-280.

Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K., and Shigeoka, S. (2006). Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant Journal* *48*, 535-547.

Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S. K., Ganguli, A., and Scharf, K. D. (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress & Chaperones* *6*, 177-189.

Olszewska, M. J., Kuran, H., and Marciniak, K. (1988). Relationship between Resumption of Ribosomal-Rna Transport into Cytoplasm after Cold Treatment and Progression through the Cell-Cycle in Root-Meristem Cells. *Environmental and Experimental Botany* *28*, 375-380.

Pederson, T., and Politz, J. C. (2000). The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *Journal of Cell Biology* *148*, 1091-1095.

Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology* *14*, R546-R551.

Poethig, R. S. (2003). Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science* *301*, 334-336.

Pontes, O., Lawrence, R. J., Silva, M., Preuss, S., Costa-Nunes, P., Earley, K., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C. S. (2007). Postembryonic Establishment of Megabase-Scale Gene Silencing in Nucleolar Dominance. *Plos One* *2*, e1157.

Qin, D. D., Wu, H. Y., Peng, H. R., Yao, Y. Y., Ni, Z. F., Li, Z. X., Zhou, C. L., and Sun, Q. X. (2008). Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *Bmc Genomics* *9*, 432-450.

Rabl, C. (1885). Ueber Zelltheilung. In *Morphologisches Jahrbuch*, pp. 214:230.

Raska, I. (2003). Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends in Cell Biology* *13*, 517-525.

Raska, I., Dundr, M., Koberna, K., Melcak, I., Risueno, M. C., and Torok, I. (1995). Does the Synthesis of Ribosomal-Rna Take Place within Nucleolar Centers or Dense Fibrillar Components - a Critical-Appraisal. *Journal of Structural Biology* *114*, 1-22.

Raska, I., Shaw, P. J., and Cmarko, D. (2006). New insights into nucleolar architecture and activity. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology* *255*, 177-235.

Recher, L., Whitescarver, J., and Briggs, L. (1969). The fine structure of a nucleolar constituent. *J Ultrastruct Res* *29*, 1-14.

Rivin, C. J., Cullis, C. A., and Walbot, V. (1986). Evaluating quantitative variation in the genome of *Zea mays*. *Genetics* *113*, 1009-1019.

Rogers, S. O., and Bendich, A. J. (1987). Ribosomal-Rna Genes in Plants - Variability in Copy Number and in the Intergenic Spacer. *Plant Molecular Biology* *9*, 509-520.

Sato, S., Yano, H., Makimoto, Y., Kaneta, T., and Sato, Y. (2005). Nucleolonema as a fundamental substructure of the nucleolus. *Journal of Plant Research* *118*, 71-81.

Scheer, U., and Benavente, R. (1990). Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioessays* *12*, 14-21.

Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology* *129*, 13-31.

Sokol, A., Kwiatkowska, A., Jerzmanowski, A., and Prymakowska-Bosak, M. (2007). Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta* *227*, 245-254.

Stepinski, D. (2009). Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma* *235*, 77-89.

- Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., and Sano, H. (2002). Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37741-37746.
- Sumner, A. T. (1990). Nucleolar organizers (NORs). In *Chromosome Banding*, U. H. Ltd, ed., pp. 187-205.
- Sunkar, R., and Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2001-2019.
- Szyf, M. (2007). The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicological Sciences* 100, 7-23.
- Tessadori, F., Chupeau, M. C., Chupeau, Y., Knip, M., Germann, S., van Driel, R., Fransz, P., and Gaudin, V. (2007a). Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* 120, 1200-1208.
- Tessadori, F., Schulkes, R. K., van Driel, R., and Fransz, P. (2007b). Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 50, 848-857.
- Tessadori, F., van Zanten, M., Pavlova, P., Clifton, R., Pontvianne, F., Snoek, L. B., Millenaar, F. F., Schulkes, R. K., van Driel, R., Voeselek, L. A. C. J., *et al.* (2009). PHYTOCHROME B and HISTONE DEACETYLASE 6 Control Light-Induced Chromatin Compaction in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics* 5, e1638.
- Thiry, M., Cheutin, T., O'Donohue, M. F., Kaplan, H., and Ploton, D. (2000). Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus. *Rna-a Publication of the Rna Society* 6, 1750-1761.
- Tottman, D. R. (1977). Identification of Growth Stages in Winter-Wheat with Reference to Application of Growth-Regulator Herbicides. *Annals of Applied Biology* 87, 213-224.
- Tsuji, H., Saika, H., Tsutsumi, N., Hirai, A., and Nakazono, M. (2006). Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant and Cell Physiology* 47, 995-1003.
- Vacca, R. A., de Pinto, M. C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., and De Gara, L. (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology* 134, 1100-1112.
- Vershinin, A. V., Alkhimova, E. G., and HeslopHarrison, J. S. (1996). Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions in some Triticeae species. *Chromosome Research* 4, 517-525.
- Vershinin, A. V., Schwarzacher, T., and HeslopHarrison, J. S. (1995). The Large-Scale Genomic Organization of Repetitive DNA Families at the Telomeres of Rye Chromosomes. *Plant Cell* 7, 1823-1833.
- Woodcock, C. L., and Ghosh, R. P. (2010). Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a500592 .
- Zhou, C. H., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., and Wu, K. Q. (2005). HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1196-1204.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 247-273.
- Zou, C., Jiang, W., and Yu, D. (2010). Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 61, 3901-3914.

## ANEXO I

Valores de  $\Delta Ct$  para as sequências ribossomal e subtelomérica nas situações controlo e *stress*, obtidos em relação ao Ct da actina.

rDNA		Subtelomérica	
Controlo	SAT	Controlo	SAT
-2,754	-5,4505	0,026	-0,0005
-3,734	-4,8605	0,186	0,4095
-3,414	-4,3505	-0,084	-0,0605
-3,194	-4,0905	0,076	-0,0005
-4,594	-3,2905	0,386	-0,3905
-3,954	-3,8105	0,476	-0,3505
-4,444	-6,8805	-1,274	0,0695
-5,884	-7,2405	0,396	0,6095
-5,894	-6,1305	0,296	0,9295
-4,374	-4,6005	0,216	0,9595
-3,564	-4,7905	0,256	0,2495
-3,384	-1,5505	0,546	-0,4505
-1,354	-1,5405	0,246	-0,5705
-0,284	-1,7405	-1,084	-0,4805
-2,494	-3,6705	-0,784	0,2695
-2,164	-5,3405	0,066	-0,3805
-2,894		1,476	0,3095
-3,804		-0,434	0,6795
-2,994		-0,024	1,0595
		-1,364	1,2295
		-1,304	
		-0,294	

**Tabela 6.** Valores de  $\Delta Ct$  para as sequências ribossomal e subtelomérica nas situações controlo e *stress*

