

## IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA EN SECCIONES DE GLICOLMETACRILATO PARA LA DEMOSTRACIÓN DE NORs EN ÁPICES RADICALES DE *ALLIUM CEPA* (ALLIACEAE)

MARÍA C. LABRAGA<sup>1</sup>, ADRIANA N. PEREZ<sup>2</sup>, VIVIANA TRAVERSO<sup>3</sup> y VICTOR H. TOMASI<sup>4</sup>

**Summary:** Silver staining to glycolmethacrylate sections for demonstration of NORs in root tips of *Allium cepa* (Alliaceae). Nucleolar organizer regions (NORs) are loops of DNA, which are transcribed into ribosomal RNA. NORs can be demonstrated by silver staining techniques, since NOR-associated proteins are argyrophilic, producing structures termed "AgNOR". The AgNOR methods, currently available to paraffin-embedded samples, are not entirely satisfactory when applied in order to semithin glycolmethacrylate sections, as unspecific silver precipitates readily from in the sections. In the present study, we report an AgNOR staining procedure to demonstrate NORs in glycolmethacrylate-embedded root meristem cells of *Allium cepa* L., "onion". The technique involves the use of microwave pretreatment of tissue sections before incubation in silver developer solution to optimize the specificity of the method.

**Key words:** glycolmethacrylate, silver staining, NORs, microwaves treatment, plant anatomy.

**Resumen:** Las regiones organizadoras del nucléolo (NORs) son bucles de ADN, los cuales transcriben para la síntesis de ARN ribosomal. Los NORs se pueden demostrar con técnicas de plata, ya que las proteínas asociadas a los NOR son argirófilas y originan estructuras denominadas "AgNOR". Los métodos de AgNOR empleados en la rutina de muestras incluidas en parafina dan resultados insatisfactorios cuando se los aplican en cortes semifinos de glicolmetacrilato, debido a los precipitados inespecíficos producidos. Informamos aquí un procedimiento de impregnación con plata para NORs de células meristemáticas de ápices radicales de *Allium cepa* L. (cebolla). Para ello, antes de colorear los NORs con la solución coloidal de plata, se realiza un pretratamiento en un horno de microondas a fin de optimizar la especificidad del método.

**Palabras clave:** glicolmetacrilato, impregnación argéntica, NORs, tratamiento con microondas, anatomía vegetal.

### INTRODUCCIÓN

La técnica de AgNOR para la "tinción" de regiones organizadoras del nucléolo (NORs) en tejidos vegetales ha sido empleada como uno de los métodos para evaluar hiperactividad celular en diferentes condiciones experimentales (Maszewski & Kwiatkowska, 1984; Sato, 1985; Vázquez Nin *et al.*, 1986; Moreno *et al.*, 1988; Doležel *et al.*, 1989; Zhang,

1995; Medina *et al.*, 1995a; Olszewska *et al.*, 1997; Arkhipchuk & Garanko, 2002; Marcano *et al.*, 2002).

Los NORs son porciones de ADN que contienen genes que codifican para la síntesis de ARN ribosomal. Los NORs transcripcionalmente activos están asociados a proteínas ácidas específicas, argirófilas, no histonas, que pueden ser visualizados como pequeños puntos marrón oscuro con técnicas de plata y son denominados AgNOR (Derenzini & Ploton, 1991).

Muchos métodos de AgNOR han sido aplicados en muestras biológicas. En 1963, Das & Alfert utilizaron este método en preparaciones "squash" de células meristemáticas. Goodpasture & Bloom (1975) desarrollaron una técnica para cortes de parafina a 70°C y fueron los primeros en describir la propiedad tintórea específica de los NORs. Howell & Black (1980) modi-

<sup>1</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan. Combate de los Pozos 1881, C.P. 1252 BsAs. Email: mlabraga@garrahan.gov.ar

<sup>2</sup>Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (UNC-CONICET). C.C. 495. Córdoba. <sup>3</sup>Cátedra de Histotecnología, Facultad de Ciencias Médicas (UNC). C.P. 5000. Córdoba.

<sup>4</sup>Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología (UBA), CONICET. Email: vht@cap.odon.uba.ar

ficaron esta técnica de dos pasos, al emplear una solución coloidal de gelatina-ácido fórmico-nitrato de plata en un solo reactivo "colorante". Desde entonces, diferentes modificaciones del método "AgNOR" han sido realizadas en muestras incluidas en parafina, a fin de obtener "coloraciones" de elevado contraste y evitar la formación de precipitados inespecíficos de plata metálica. Estas modificaciones metodológicas se ajustaron al procesamiento y características de la muestra, grado de pureza de los reactivos utilizados, técnica y tiempo de fijación, concentración del "colorante", temperatura de "coloración", tratamientos previos a la "tinción" y masa de inclusión. (Hizume *et al.*, 1980; Ploton *et al.*, 1986; Cromie *et al.*, 1988; Li Q *et al.*, 1995; Medina *et al.*, 1995b; Öfner *et al.*, 1995; Juntas, 1996; Orrea *et al.*, 2001).

En microtécnica vegetal, el método de Howell & Black (1980) ha sido ampliamente aceptado para la "tinción" de NORs en secciones de parafina y resinas plásticas de origen epoxídico o acrílico (Schubert, 1984; Sato, 1985; Khuong & Schubert, 1985; Doležel *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1985, 1988; Medina *et al.*, 1995b). Sin embargo, se observó que la aplicación de esta técnica en cortes semifinos de ápices radicales de *Allium cepa* L. (cebolla) Alliaceae incluidos en glicolmetacrilato mostró precipitados de plata inespecíficos y "tinción" de fondo inadecuados para el estudio de los NORs de células meristemáticas. De esta manera, el propósito del presente trabajo fue ajustar el método de AgNOR en secciones semifinas de glicolmetacrilato para la demostración de NORs en meristemas de ápices radicales de cebolla, a fin de obtener preparaciones histológicas de alto contraste y sin precipitados inespecífico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Cinco fragmentos de 5 mm de longitud de ápices radicales de *Allium cepa* ( $2n=16$ ) desarrollados a partir de bulbos colocados en agua común a 25°C durante 48 horas fueron fijados en FAA (formaldehído puro, etanol 96°, ácido acético 1:4:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras lavar con agua común a corriente continua durante 30 minutos, las muestras se deshidrataron en una serie de alcohol etílico en graduación creciente hasta etanol 96° (15 minutos en cada uno). Posteriormente, las muestras se colocaron durante 12 horas en una mezcla a partes igua-

les de etanol 96° y Glicolmetacrilato (GMA) (Historesin®, Leica) e incluyeron en GMA nuevo, siguiendo las instrucciones del kit comercial. Se realizaron cortes seriados de 3 µm de espesor con micrótopo de rotación (Leica®) y navaja de vidrio, los cuales se pegaron sobre portaobjetos silanizados (ICN, Cat.: 154766). Tras estirar sobre Platina termostatizada a 50°C, los cortes se secaron en Estufa a 60°C durante 24 horas.

Las secciones histológicas se sumergieron en una solución acuosa 12 mM de ácido cítrico (Anedra) a pH 6.0, contenida en una caja de Koplín. El pH se ajustó con hidróxido de sodio en perlas (Mallinckrodt). Se colocaron en un Horno de Microondas BGH® de 1100W con bandeja giratoria (Potencia al 30% a 60°C) y se irradiaron con 3 ciclos de 5 minutos cada uno. Se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y lavaron con agua destilada. Luego, las preparaciones se colocaron durante 30 minutos en otra caja de Koplín limpia conteniendo el reactivo de plata, en cámara oscura y a temperatura ambiente. El reactivo de impregnación se preparó en el momento de usar, mezclando 2 partes de una solución acuosa de nitrato de plata al 25% y 1 parte de una solución acuosa de gelatina al 2% (ambas Mallinckrodt), adicionada con 1 ml de ácido fórmico puro (Anedra). Tras la "tinción", las secciones se lavaron con 3 cambios de agua destilada, se deshidrataron con alcohol etílico, clarificaron con 2 cambios de xilol y montaron con Entellán (Merck). Paralelamente, se realizaron pruebas con 3 ciclos de irradiación de 3 y 10 minutos cada uno en el mismo ácido y a igual temperatura (60°C). Otro set de cortes histológicos adyacentes fue "coloreado" de acuerdo al método de rutina de Howell & Black (1980), empleando el mismo reactivo de plata a 70°C, sin pretratamiento con ácido cítrico ni microondas.

Las fotografías fueron obtenidas con un fotomicroscopio Axioskop MOT-2 C. Zeiss

## RESULTADOS

Los preparados histológicos irradiados con 3 ciclos de 5 minutos cada uno en Horno de Microondas (potencia al 30% a 60°C), sumergidos en ácido cítrico a pH 6.0, mostraron los mejores resultados de «coloración» (Fig. 1A). En las muestras analizadas se observaron claramente los NORs de color marrón oscuro sobre una matriz nuclear de tonalidad amarilla. Es-

tos resultados de "tinción" fueron de elevado contraste y no presentaron precipitados inespecíficos.

Las preparaciones que fueron irradiadas con 3 ciclos de 3 minutos cada uno mostraron "coloración" débil de los NORs (Fig. 1B). Los preparados que fueron coloreados con la técnica de Howell & Black mostraron "coloración" marrón oscuro de los núcleos al igual que los NORs y precipitados inespecíficos de plata metálica depositados sobre la matriz citoplasmática. Si bien los NORs se colorearon más intensamente, el contraste con la matriz nuclear fue insuficiente (Fig. 1C). Las preparaciones que se irradiaron durante 10 minutos por cada ciclo mostraron desprendimiento del corte histológico a partir del portaobjeto silanizado.

dos en la matriz nuclear (Trerè, 2000). Los NORs presentan fragmentos de ADN que codifican para la síntesis de ARN ribosomal. Las variaciones en el patrón normal de los AgNORs indican cambios cualitativos y cuantitativos en la síntesis de proteínas. Un incremento en el número de AgNORs refleja hiperactividad celular, lo que a su vez indica, en diferentes condiciones experimentales, un incremento en el rango de proliferación celular, cambios en los procesos de diferenciación y actividad secretora (Wachtler *et al.*, 1986; Trerè, 2000).

En microtécnica vegetal, diferentes trabajos han sido desarrollados con el propósito de determinar cambios morfológicos y cuantitativos de los NORs, provocados tras la aplicación de sustancias tales como 6-benzilaminopurina y 24-epibrassinolida

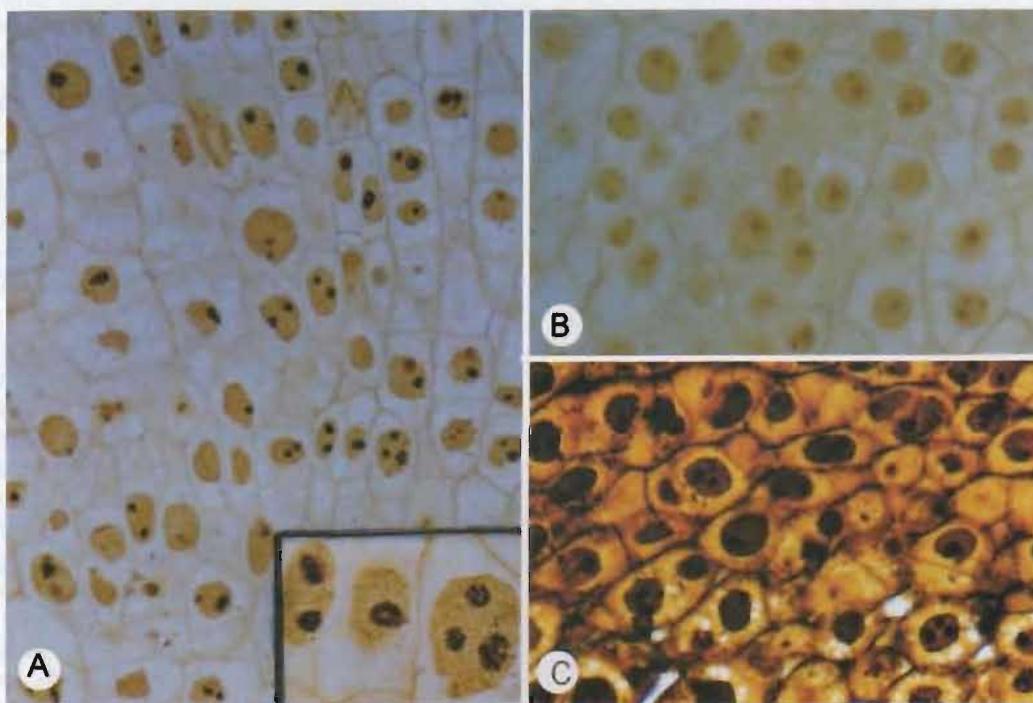


Fig. 1. Tinción de AgNOR de ápices radicales de *Allium cepa* en secciones de Glicolmetacrilato. A: Pretratamiento con ácido cítrico e irradiación de 3 ciclos de 5 minutos cada uno. x 200. El «inset» ilustra detalles de los NORs sobre la matriz nuclear, x 500. B: Pretratamiento con 3 ciclos de 3 minutos de irradiación, x 200. C: Método de AgNOR de rutina, x 200.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los NORs son componentes nucleolares que contienen una serie de proteínas argirófilas, las cuales son selectivamente coloreadas por métodos de plata. Tras la tinción, los AgNORs pueden ser fácilmente identificados como puntos marrón oscuro localiza-

(Fatkhutdinova *et al.*, 2002), mercurio (II), metolachlor y 4-nitroquinilina-N-óxido (Arkhipchuk & Garanko, 2002). 5-azacitodina (Olszewska *et al.*, 1997), cloruro de cadmio o aluminio (Zhang, 1995; Marcano *et al.*, 2002). Otros autores caracterizaron la organización funcional de los NORs a fin de relacionarla con mecanismos de proliferación celular y análisis de ploidía en condiciones normales de crecimiento (Maszewski

& Kwiatkowska, 1984; Moreno *et al.*, 1988; Doležal *et al.*, 1989; Medina *et al.*, 1995a; Zurita *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2000). En estos trabajos se utilizó la técnica de plata de rutina con resultados satisfactorios de "tinción". Sin embargo, la aplicación de este método en secciones semifinas de GMA mostró "coloración" argéntica inespecífica que dificultó la identificación de los NORs.

De esta manera y de acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que el pretratamiento con ácido cítrico 12 mM en microondas durante 3 ciclos de 5 minutos cada uno, mejora substancialmente la "tinción" de los NORs de ápices radicales de *Allium cepa* incluidos en glicolmetacrilato, ya que los NORs se colorean de marrón oscuro sobre una matriz nuclear amarilla que permite obtener imágenes histológicas de elevado contraste y sin precipitados inespecíficos. Tiempos menores a 5 minutos de pretratamiento por ciclo de irradiación fueron insuficientes para obtener resultados de "tinción" adecuados y, al respecto, acordamos con Horobin (2002) quien enfatizó que los tiempos de pretratamiento y "coloración" de secciones semifinas de GMA deben ser prolongados. La aplicación de tiempos mayores produjo pérdida del corte histológico debido a la exposición excesiva de calor y microondas.

Si bien las impregnaciones argénticas se producen por mecanismos predominantemente físico-químicos, donde determinadas estructuras tisulares electronegativas atraen iones de plata cargados positivamente por un mecanismo electrostático (García del Moral, 1993), los fenómenos por los cuales se producen estas "tinciones" son aún poco entendidos. En este contexto, no obstante, el pretratamiento con ácido cítrico permitiría desenmascarar los aminoácidos ácidos concentrados en los dominios terminales aminos de la nucleolina, responsable de la coloración específica de los NORs (Öfner *et al.*, 1995). Esta reacción estaría acelerada por la irradiación con microondas que actúa como co-factor aumentando la temperatura. Si bien la irradiación con microondas ha sido empleada para la "tinción" argéntica de NORs en cortes de parafina (Medina *et al.*, 1995b; Juntas, 1996), el pretratamiento con ácido cítrico en solución diluida (12mM) e irradiación moderada con microondas mejoró la calidad de las imágenes histológicas en secciones de GMA.

Por otra parte, los precipitados inespecíficos de plata metálica sobre el corte histológico es uno de los problemas más importantes que se presenta durante el análisis de parámetros morfológicos y cuantitati-

vos de los AgNORs, especialmente, cuando el estudio histomorfológico se realiza con un analizador de imágenes asistido por computadora (Rüschoff *et al.*, 1990; Böcking & Rüschoff, 1999). En este sentido, acordamos con Cromie *et al.* (1988), quienes informaron que los precipitados inespecíficos podrían originarse por la presencia de residuos aldehídicos libres, los cuales quedan en el tejido tras la fijación con formalina. Al respecto, se sabe que la formalina es un agente reductor muy empleado en "tinciones" argénticas para revelar la plata catiónica (Ag<sup>+</sup>) a plata metálica (Ag<sup>0</sup>) (García del Moral, 1993). La mezcla fijadora utilizada rutinariamente en histología vegetal contiene formalina y, por tanto, sería posible que dichos residuos de formalina presentes en el tejido precipiten la plata sobre el corte histológico de manera inespecífica, a menos que se neutralice la actividad reductora del residuo aldehídico en un paso previo a la coloración. De esta manera y como sucede con otros agentes químicos tales como glicina, hexacianoferrato de potasio y ácido nítrico (Cromie *et al.*, 1988; Li Q *et al.*, 1995; Orrea *et al.*, 2001), el pretratamiento con ácido cítrico podría neutralizar la acción reductora de la formalina, evitando la precipitación inespecífica (Öfner *et al.*, 1995; Juntas, 1996).

El GMA ha sido ampliamente utilizado para microscopía de luz, debido a que las imágenes histológicas que se obtienen con este medio de inclusión son de excelente calidad cuando se las comparan con las de parafina. El grado de dureza de esta resina acrílica permite incluir y seccionar muestras vegetales duras, asegurando la obtención de cortes con imágenes más nítidas. Moreno *et al.* (1988) emplearon la tinción de AgNOR en cortes semifinos de tejidos vegetales incluidos en Lowicryl. Este producto comercial es una resina acrílica que polimeriza bajo la acción de luz ultravioleta. Sin embargo, esta metodología es muy costosa, ya que precisa un sistema de polimerización poco común en un laboratorio de rutina. En este sentido, el método propuesto aquí en secciones vegetales incluidos en glicolmetacrilato es sencillo, rápido y proporciona preparaciones histológicas de elevado contraste y sin precipitados inespecíficos. Además, el bloque de GMA presenta la ventaja adicional de no mostrar cambios volumétricos durante el corte con micrótopo, como lo hace el de parafina. Esto permite la realización de cortes seriados de igual espesor, lo cual adquiere especial importancia en estudios cuantitativos. De esta manera, este método de AgNOR, en combinación con ácido cítrico y microondas para secciones de glicolmetacrilato, presentaría ventajas para el desarrollo de estudios sobre

cuantificación de NORs en muestras vegetales, especialmente si dichos estudios se han de realizar con analizadores de imágenes asistidos por computadoras (Öfner *et al.*, 1995; Böcking & Rüschoff, 1999).

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa García de Dávila por su constante apoyo y por permitimos el uso de los equipos del Servicio a su cargo, pertenecientes al Hospital de Pediatría Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires. Asimismo, agradecemos a la firma Luis Marsán, representante de Leica Histological Products, por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARKHIPCHUK, V. V. & N. N. GARANKO. 2002. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. *Environ. Toxicol.* 17: 187-194.
- BÖCKING, A. & J. RÜSCHOFF. 1999. European consensus on standardized AgNOR analysis in cytopathology. *Ann. Cell Pathol.* 19: 51-52.
- CROMIE, C., E. BENBOW, R. STODDART & R. F. McMAHON. 1988. Preincubation with a glycine solution aids the demonstration of nucleolar region-associated protein. *Histochem. J.* 20: 722-724.
- DAS, N. K. & M. ALFERT. 1963. Silver staining of the nucleolar fraction, its origin and fate during the mitotic cycle. *Ann. Histochim.* 8: 109-114.
- DERENZINI, M. & D. PLOTON. 1991. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 150-164.
- DOLEŽEL, J., J. ĚIHALÍKOVÁ & O. V. ZAKCHLENJUK. 1989. Sequential estimation of nuclear DNA and silver staining of nucleoli in plant cells. *Stain Technol.* 64: 9-13.
- FATKHUTDINOVA, R. A., F. M. SHAKIROVA, A. V. CHEMERIS, B. E. SABIRZHANOV & V. A. VAKHITOV. 2002. NOR (nucleolar organizer region) activity in wheat species with different ploidy levels treated with phytohormones. *Genetika* 38: 1575-1579.
- GARCIA del MORAL, R. 1993. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. McGraw-Hill, Interamericana, Madrid.
- GOODPASTURE, C. & S. E. BLOOM. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- HIZUME, M., S. SATO & A. TANAKA. 1980. A highly reproducible method of nucleous organizer regions staining in plants. *Stain Technol.* 55: 87-90.
- HOROBIN, R. W. 2002. Biological staining: mechanisms and theory. *Biotech & Histochem.* 77: 3-13.
- HOWELL, W. M. & D. A. BLACK. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 36: 1014.
- JUNTES, P. 1996. Improvement of the method for demonstration of nucleolar organizer regions (NORs) in formalin fixed and paraffin embedded tissue using microwave pretreatment. *Pflugers Arch.* 431, Suppl. 2: 269-270.
- KHUONG, N. T. & I. SCHUBERT. 1985. Silver staining of nucleolus organizing regions in *Zea mays*. *Caryologia* 38: 331-334.
- LI Q., G. DANSCHER, W. U. SONNLEITNER & L. GRIMELIUS. 1995. Argyrophilic nucleolar organizer regions. A revised version of the Ag-NOR-staining technique. *Histochem. Cell Biol.* 104: 145-150.
- MARCANO, L., I. CARRUYO, A. DEL CAMPO & X. MONTIEL. 2002. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L.: an ultrastructural study. *Environ. Res.* 88: 30-35.
- MASZEWSKI, J. & M. KWIATKOWSKA. 1984. Number, size, and transcriptional activity of nucleoli during different periods of interphase in antheridial filaments of *Chara vulgaris* L. *Folia Histochem. Cytobiol.* 22: 9-19.
- MEDINA, F. J., A. CERDIDO & M. E. FERNANDEZ-GOMEZ. 1995a. Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillar, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp. Cell Res.* 221: 111-125.
- MEDINA, F. J., A. CERDIDO & A. MARCO. 1995b. Microwave irradiation improvements in the silver staining of the nucleolar organizer (Ag-NOR) techniques. *Histochemistry* 103: 403-413.
- MEDINA, F. J., A. CERDIDO & G. CARCER. 2000. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur. J. Histochem.* 44: 117-131.
- MORENO, F. J., D. HERNANDEZ-VERDUN, C. MASSON & J. BOUTEILLEN. 1985. Silver staining of the nucleolar organizer regions (NORs) on Lowicryl and cryoultrathin sections. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 389-399.
- MORENO, F. J., A. VILLAMARIN, G. GARCIA-HERDUGO & J. L. LOPEZ-CAMPO. 1988. Silver staining of the nucleolar organizer regions (NORs) in semithin Lowicryl sections. *Stain Technol.* 63: 27-32.
- MORENO, F. J., R. M. RODRIGO & G. GARCIA-HERDUGO. 1989. An experimental approach to nucleolar organization in plant cells: a morphological, cytochemical and quantitative study. *J. Cell Sci.* 94: 51-59.
- ÖFNER, D., M. AUBELE, S. BIESTERFELD, M. DERENZINI, J. GIMINEZ-MAS, P. HUFNAGL, D. PLOTON, D. TRERE & J. RÜSCHOFF. 1995. Guidelines of AgNOR quantification. Committee on AgNOR Quantification within ESP. *Virchows Arch.* 427: 341.
- OLSZEWSKA, M. J., T. SAKOWICZ, J. KAZMIERCZAK & P. LUCHNIAK. 1997. Enhanced nucleolar parameters in

- Vicia faba* L. induced by 5-azacytidine may be only partly attributed to DNA demethylation. *Folia Histochem. Cytobiol.* 35: 185-192.
- ORREA, S., V. H. TOMASI, A. SCHWINT & M.E. ITOIZ. 2001. Modified silver staining of nucleolar organizer regions to improve the accuracy of image analysis. *Biotech. & Histochem.* 76: 67-73.
- PLOTON, D., M. MENAGER, P. JEANNESSON, G. HIMBER, F. PIGEON & J. J. ADNET. 1986. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem. J.* 18: 5-14.
- RÜSCHOFF, J., K. PLATE, H. CONTRACTOR, H. KERN, R. ZIMMERMANN & C. THOMAS. 1990. Evaluation of nucleolar organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J. Pathol.* 161: 113-118.
- SATO, S. 1985. Ultrastructural localization of nucleolar material by a simple silver staining technique devised for plant cells. *J. Cell Sci.* 79: 259-269.
- SCHUBERT, I. 1984. Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (*Liliacea* s. lat.). Interferences from the specificity of silver staining. *Plant Syst. Evol.* 144: 291-305.
- VAZQUEZ NIN, G. H., O. M. ECHEVERRIA, G. ZAVALA, L. F. JIMENEZ-GARCIA, M. A. GONZALEZ & R. PARRA. 1986. Relations between nucleolar morphometric parameters and peak rRNA synthesis in animal and plant cells. *Acta Anat. (Basel)* 126: 141-146.
- TRERÉ, D. 2000. AgNOR staining and quantification. *Micron* 31: 127-131.
- WACHTLER, F., A. H. N. HOPMAN, J. WIEGANT & G. SCHWARZACHER. 1986. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei: studies with a new, non-autoradiographic in situ hybridization method. *Exp. Cell Res.* 167: 227-240.
- ZHANG, Y. 1995. Effects of aluminum chloride on the nucleus and nucleolus in root tip cells of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.* 335: 137-142.
- ZURITA, F., R. JIMENEZ, M. BURGOS & R. D. de la GUARDIA. 1998. Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. *J. Cell Sci.* 111: 1433-1439.

Recibido el 25 de Setiembre de 2003, aceptado el 26 de Noviembre de 2003.